

**Adhäsionsmechanismen von *Escherichia coli*
auf Titanoberflächen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Master of Science (M. Sc.) Nathalie Stefani

geboren am 13.09.1989 in Dinkelsbühl

Diese Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut (HKI) Jena, in der Abteilung Molekulare und Angewandte Mikrobiologie – Lehrstuhl für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, unter Leitung von Prof. Dr. Axel A. Brakhage angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel A. Brakhage (Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Marc T. Figge (Jena)
3. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Dobrindt (Münster)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 19.10.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
A EINLEITUNG	3
1 <i>Escherichia coli</i> – eine vielseitige Spezies.....	4
1.1 Physiologie und Lebensraum	4
1.2 Genomische Flexibilität.....	6
1.3 Adhäsion und Adhäsionszellkomponenten.....	6
1.3.1 Flagellen	7
1.3.2 Fimbrien	8
1.3.3 Curli	8
1.3.4 Nicht-fimbriale Adhäsine.....	9
1.3.5 Extrazelluläre polymere Substanzen	9
2 Biomaterial	9
2.1 Rauigkeit.....	10
2.2 Benetzbarkeit	11
2.3 Modifizierbarkeit von Titan.....	11
3 <i>In vitro</i> -Testsysteme für die Bakterien-Material-Interaktion.....	12
3.1 <i>In vitro</i> -Testsysteme zur Generierung adhärerter Bakterien.....	12
3.2 Quantifizierung adhärerter Bakterien als Maß der antibakteriellen Wirksamkeit einer Oberfläche.....	13
4 Einfluss von Nanostrukturen auf die bakterielle Adhäsion.....	14
5 Ziele dieser Arbeit	16
B MATERIAL UND METHODEN	18
1 Stämme und Materialien	18
1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	18
1.2 Medien und Zusätze.....	20
1.3 Plasmide	21
1.4 Oligonukleotide.....	22
1.4.1 Primer für NEBuilder® HiFi DNA Assembly (Gibson Assembly).....	22
1.4.2 qRT-PCR-Primer	22
1.4.3 Primer für Gendeletionen	25
1.4.4 Primer zur Klonierung in pUC18.....	26
1.5 Nanorraue Titanoberflächen	27
1.6 Kultivierungsbedingungen von <i>E. coli</i>	28
1.6.1 Motilitätstest.....	28

1.6.2	Kultivierung und Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	28
1.6.3	<i>In vitro</i> -Adhäsionsassay	28
1.6.4	Biofilmbildung zur Isolierung von RNA	29
1.6.5	Wachstumskurven	29
1.6.6	Biofilmbildung auf Festmedium	29
1.6.7	Biofilmbildung und Quantifizierung der Biomasse eines Biofilms.....	30
2	Molekularbiologische Methoden	31
2.1	Isolierung von Nucleinsäuren	31
2.1.1	Isolierung von DNA	31
2.1.2	Isolierung von RNA aus auf Titan-adhärierten <i>E. coli</i> spp.	31
2.1.3	Isolierung von RNA aus planktonischen <i>E. coli</i> spp.	32
2.2	Manipulation von Nucleinsäuren	32
2.2.1	Konzentrationsmessung von Nucleinsäuren	32
2.2.2	Restriktionsverdau.....	33
2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.2.5	Nahtlose Assemblierung von PCR-Fragmenten.....	33
2.2.6	PCR zur Erstellung der Rekombinationskassetten.....	33
2.2.7	Erzeugung chromosomaler Knockout-Mutanten durch Rekombination	33
2.2.8	Entfernen von DNA-Fragmenten aus dem <i>E. coli</i> -Genom mittels FLP-Rekombination ..	34
2.2.9	cDNA-Synthese	34
2.2.10	qRT-PCR	34
2.3	Gelelektrophorese.....	35
2.4	Transformation von DNA.....	35
2.4.1	Hitzeschocktransformation	35
2.4.2	Herstellung elektrokompeter Bakterien	35
2.4.3	Elektrotransformation	36
3	Mikroskopie	36
3.1	Fluoreszenzmikroskopie	36
3.1.1	Vorbereitung zur Quantifizierung der adhärennten Bakterien – Bildanalyse.....	36
3.1.2	Aufnahme einer kompletten Titanoberfläche für die Bootstrapping-Analyse.....	36
3.2	Rasterelektronenmikroskopie mit fokussierten Ionenstrahl (FIB-REM)	37
4	Bioinformatische Methoden, Statistik und Datenbanken.....	37
4.1	Bildanalyse der adhärennten Bakterien auf Titanplättchen	37
4.2	Schätzung der benötigten Bilder im <i>in vitro</i> -Adhäsionsassay (Bootstrapping)	38
4.3	<i>de novo</i> -Genomsequenzierung in <i>E. coli</i> K1683 mittels PacBio	39
4.4	<i>in silico</i> -Nachweis von Plasmiden in <i>E. coli</i> K1683.....	39
4.5	Genomvergleich.....	39

4.6	Orthologes Genclustering	39
4.7	RNA-Sequenzierung	40
4.8	Transkriptomanalyse	40
4.9	Genanreicherung GSEA	41
C	ERGEBNISSE	42
1	Etablierung eines <i>in vitro</i> -Adhäsionsassays	42
1.1	Genomische Expression von GFP zur erleichterten Detektion von <i>E. coli</i> in der Bildanalyse	44
1.2	Initiale Adhäsion und Inokulationszahlen	46
1.3	<i>In vitro</i> -Adhäsionsassay	46
2	Untersuchung des Bindungsverhaltens der <i>E. coli</i> -Stämme	47
2.1	Klinische <i>E. coli</i> -Isolate als Kandidaten	47
2.2	Errechnung der Probenanzahl zur Bestimmung eines antiadhäsiven Effekts	49
3	Bildanalysen des Adhäsionsverhaltens von <i>E. coli</i> -Bakterien auf nanorauen Titanoberflächen	50
3.1	Quantitative Bildanalyse	50
3.2	Qualitative Bildanalyse	52
4	Genomanalyse	54
4.1	<i>de novo</i> -Genomsequenzierung von <i>E. coli</i> KI683	54
4.2	Vergleichende Genomanalyse	56
4.3	Gemeinsame und einzigartige Gensets	56
5	Transkriptomanalysen	57
5.1	Etablierung der RNA-Isolierung	58
5.2	Genexpression adhärerter und planktonischer Bakterien	59
5.3	Verifizierung der RNA-Sequenzierungsdaten mittels qRT-PCR	61
5.4	Genexpression von Zellanhang-assoziierten und Biofilm-regulierenden Genen	63
5.5	Stamm-spezifische Adhäsionsmechanismen	65
5.5.1	Adhäsionsmechanismen von <i>E. coli</i> ATCC 25922	65
5.5.2	Adhäsionsmechanismen von <i>E. coli</i> KI683	67
5.5.3	Adhäsionsmechanismen von <i>E. coli</i> RV308	70
5.5.4	Vergleich der Adhäsionsstrategien	73
6	Beteiligung von Genen unbekannter Funktion am Adhäsionsgeschehen	74
6.1	Auswahl von Genen für Deletions- und Überexpressionsmutanten	74
6.2	Klonierungsstrategien der Deletions- und Überexpressionsmutanten	75
6.2.1	Deletionsstrategie	76
6.2.2	Überexpressionsstrategie	77
6.3	Wachstumsverhalten	77
6.4	Phänotypische Charakterisierung	80
6.5	Biofilmbildung	82
6.6	<i>yddM</i> als Regulator des Toxin-Antitoxin-Paars <i>higB/higA</i>	83

D DISKUSSION	85
1 Die Topographie nanorauer Oberflächen beeinflusst weder die Adhäsion noch die Genexpression der untersuchten <i>E. coli</i> -Stämme	86
1.1 Schwankungen der Bakterienzahlen pro Bild resultieren nicht aus der ungenügenden Anzahl von Bildern.....	86
1.2 Nanorauere Oberflächen im Bereich von 2 bis 16 nm affektieren die Anzahl adhärierter Bakterien nicht	88
1.3 FIB-SEM-Anwendung ist ungeeignet zur Begutachtung von Bakterien-Oberflächen-Querschnitten.....	90
1.4 Die Nanorauigkeit im Bereich 2 bis 16 nm hat keinen Einfluss auf die Genexpression	91
2 Adhäsionsmechanismen.....	93
2.1 Gesamt-RNA ist in sessilen Bakterien stabiler.....	94
2.2 Generelle Aspekte der Genexpression	94
2.3 Das Bakterium beeinflussende Stoffwechselwege während der Adhäsion	95
2.3.1 Zellanhänge werden für die schnelle, initiale Adhäsion gebraucht	95
2.3.2 Persistenz und Filamentbildung sind Teil der Überlebensstrategie von sessilen <i>E. coli</i> KI683	96
2.3.3 Quorum sensing in <i>E. coli</i> RV308 bestimmt das Adhäsionsverhalten	96
2.3.4 Die schnelle Anpassung an den Stickstoffmangel ist ein selektiver Vorteil	97
2.3.5 Erhöhte Kupferverträglichkeit vermittelt wahrscheinlich einen Virulenzvorteil	98
3 Nicht-charakterisierte Gene weisen auf ein unvollständiges Adhäsionsverständnis hin	99
4 Proteinanlagerungen	102
5 Abschließende Bemerkungen.....	103
LITERATURVERZEICHNIS	105
ANHANG.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
LISTE DER WISSENSCHAFTLICHEN PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	XII
DANKSAGUNG	XIII
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	XV
CD MIT ERGÄNZENDEN TABELLEN DER TRANSKRIPTOMANALYSE.....	XVI

ZUSAMMENFASSUNG

Ein komplexes, mikrobiologisches Phänomen ist die Biofilmbildung. Schätzungen zufolge gehen 80% aller medizinischen Infektionen von Biofilmen aus. Bakterielle Zellanhänge wie Fimbrien, Curli und Flagellen spielen während der Oberflächenbesiedlung eine entscheidende Rolle. Nanostrukturen auf Oberflächen als passive Strategie gegen eine Anhaftung von Bakterien haben in vergangenen Studien bereits antiadhäsive Effekte gezeigt. Der zugrunde liegende Adhäsionsmechanismus war jedoch nicht ausreichend aufgeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen, nanostrukturierten Oberflächen auf die bakterielle Adhäsion und die Erfassung der bakteriellen Adhäsionsmechanismen. Die zu testenden vier Nanorauigkeiten 2, 7, 12 und 16 nm (R_a) entsprechen der Größendimension von Zellanhängen und wurden aus dem meist genutzten und modifizierbaren Biomaterial Titan hergestellt. Für die Evaluierung einer rauigkeitsabhängigen Adhäsion wurden drei Stämme des Modellorganismus *Escherichia coli* verwendet. *E. coli* ATCC 25922 und KI683 sind klinische Isolate, während *E. coli* RV308 einen K-12-Laborstamm darstellt. Die drei *E. coli*-Stämme sind morphologisch verschieden: Während *E. coli* ATCC 25922 und KI683 zahlreiche Zellanhänge besitzen, bildet der Laborstamm RV308 keine Zellanhänge aus. Anhand von Bildanalysen wurde gezeigt, dass *E. coli* KI683 schwach adhärierte, wohingegen *E. coli* ATCC 25922 und RV308 deutlich stärker adhärierten. Die zahlreiche Adhäsion von *E. coli*-Bakterien ist demnach in einem statischen System unabhängig von Zellanhängen. Außerdem wurde keine rauigkeitsabhängige Adhäsion zwischen den vier nanostrukturierten Oberflächen beobachtet. Anhand von Transkriptomsequenzierungen der, auf den nanostrukturierten Oberflächen adhärierten *E. coli*-Bakterien konnte ebenfalls keine physiologische Reaktion auf die Nanostrukturen nachgewiesen werden. Die Adhäsionsmechanismen wurden im Wesentlichen stark von stamm-spezifischen Genen beeinflusst. Des Weiteren wurden an der Adhäsion beteiligte, noch nicht-charakterisierte Gene identifiziert. Deletionen und Überexpression der Gene *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* in den drei *E. coli*-Stämmen resultierten weder in derselben phänotypischen Ausprägung, noch in demselben Maß der Biofilmbildung. Die Deletion von *yddM* in *E. coli* ATCC 25922 und die Überexpression von *yddM* in *E. coli* K-12 RV308 führten jeweils zu einer erhöhten Biofilmbildung. YddM ist wahrscheinlich auch in der Regulation des Toxin-Antitoxin-Paares *higB/A* involviert. Die komplexe Netzwerkarchitektur der bakteriellen Adhäsion bleibt jedoch weiterhin zu entschlüsseln. Die in diesem Rahmen erzielten Ergebnisse können dabei als Grundlage für weitere Untersuchungen und zur Hypothesengenerierung genutzt werden, die sich mit spezifischen Adhäsionsmechanismen von *E. coli* spp. auseinandersetzen. Ein somit vertieftes Verständnis für verschiedene Adhäsionsmechanismen kann zu einer neuen Generation von wirksameren antiadhäsiven und antimikrobiellen Oberflächen führen.

SUMMARY

Biofilm formation is a complex, microbiological phenomenon. It has been estimated that 80% of all medical infections are caused by biofilms. Bacterial cell appendages such as fimbriae, curli and flagella play a critical role during the first contact between bacteria and surface and thus foster biofilm formation. Nanorough surfaces as passive strategy against bacterial adhesion have been shown to exhibit antiadhesive effects. However, the underlying adhesion mechanism was not sufficiently elucidated.

The aim of the present study was to investigate whether surfaces with different nanostructures influence bacterial adhesion and to shed light on the bacterial adhesion mechanisms. The four surfaces with nanostructures 2, 7, 12 and 16 nm (R_a) are in the range of cell appendages and made of the most used and modifiable biomaterial titanium. The role of nanoroughness-dependent adhesion was investigated by three strains of the model organism *Escherichia coli*. The clinical isolates *E. coli* ATCC 25922 and K1683 are equipped with cell appendages. By contrast, the laboratory strain RV308 does not produce cell appendages. However, *E. coli* K1683 poorly adhered to the surfaces, while *E. coli* ATCC 25922 and RV308 adhered significantly stronger. Hence, the presence of many cell attachments did not result in better adhesion. Additionally, no difference in adhesion between the four nanostructured surfaces was observed. Transcriptome sequencing of adhered *E. coli* bacteria on nanostructured surfaces revealed no physiological reaction in response to the different nanostructures. Adhesion mechanisms were in fact influenced by strain-specific genes. Furthermore, so far not characterised genes were found to be involved in adhesion. Deletion and overexpression of five selected genes, i.e., *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* and *yddM*, did not result in the same phenotypes and abilities to form biofilms. Deletion of *yddM* in *E. coli* ATCC 25922 and its overexpression in *E. coli* K-12 RV308 both resulted in increased formation of biofilms. YddM might be also connected to the regulation of the toxin/antitoxin pair *higB/higA*. However, the elucidation of the complex network systems of bacterial adhesion still needs further attention.

This work presents a basis for future studies and hypotheses that address specific adhesion mechanisms in *E. coli* spp. The deepened knowledge of different adhesion mechanisms is prerequisite for the generation of more effective antiadhesive and antimicrobial surfaces.

A EINLEITUNG

Bakterien kommen ubiquitär vor und können sich an nahezu jeder Oberfläche anlagern. Dieser sessile Lebensstil wird Biofilm genannt und birgt viele Überlebensvorteile. Was als Vorteil für die Mikroorganismen beginnt, endet oftmals nachteilig für den Menschen oder technische Einrichtungen. Karies (Peterson *et al.*, 2014), Implantat-assoziierte Infektionen (Arciola, Campoccia, & Montanaro, 2018), Harnwegsinfektionen (Anderson *et al.*, 2003), Beläge an Schiffsrümpfen, die den Widerstand und den Treibstoffbedarf erhöhen (Van Mooy *et al.*, 2014) und verstopfte Rohrleitungen, Tanks oder Filter bei der Trinkwasserversorgung (Fish *et al.*, 2015) sind nur einige Beispiele dafür. Biofilmbeläge als Forschungsgegenstand wurden das erste Mal im Jahr 1933 erwähnt (Henrici, 1933). Ab dem Jahr 1971 wurde die Biofilmforschung im marinen Umfeld in verschiedenen Arbeiten vorangetrieben (Marshall, Stout, & Mitchell, 1971; Fletcher & Floodgate, 1973; Geesey *et al.*, 1978), die das heutige Konzept der Biofilmbildung prägen. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist man bis heute nicht in der Lage die Bildung und Zusammensetzung eines Biofilms aussagekräftig vorherzusagen, zu kontrollieren oder gar zu verhindern (Seviour *et al.*, 2019). Die Schwierigkeit liegt in der Individualität und Heterogenität der Biofilme: je nach Spezies und sogar je nach Stamm und Umgebung müssen gesonderte Lösungsansätze gefunden werden (Muhammad *et al.*, 2020).

Um Oberflächen effektiv antimikrobiell auszustatten, muss ein tiefgreifenderes Verständnis über die Adhäsionsmechanismen von Mikroorganismen gewonnen werden. Die antimikrobiellen Eigenschaften aktueller Oberflächen werden über chemische Funktionalisierungen (Hook *et al.*, 2012), selbstorganisierende Monoschichten (Friedlander, Vogel, & Aizenberg, 2015) und spezifische Oberflächenstrukturen (Bazaka *et al.*, 2011) erzielt. Die Idee dahinter ist, die Anlagerung von Mikroorganismen von Anfang an zu verhindern und so die Ausbildung eines Biofilms zu minimieren oder zu vermeiden. Bakterien besitzen eine Vielfalt an sogenannten Adhäsinen, denen eine tragende Rolle bei der Adhäsion auf Oberflächen zukommt. Die bekanntesten Adhäsine sind Flagellen und Fimbrien, die bis zu 20 µm lang und im Fall von Flagellen bis zu 20 nm breit sind (Macnab, 2003). Für Oberflächen mit Strukturen im Größenbereich der Zellanhänge, also zwischen 2 und 20 nm, wird eine mechanische Inkompatibilität diskutiert. Diese soll sich zwischen den Zellanhängen und der Materialoberfläche ausbilden. Ein weiterer theoretischer Aspekt ist, dass eventuell weniger Kontaktpunkte zur Anhaftung zur Verfügung stehen könnten und damit eine verminderte Zelladhäsion bewirkt werden könnte. Obwohl es noch keine Studien über die bakterielle Adhäsion auf Oberflächen mit Strukturen im Größenbereich der Zellanhänge gibt, zeigen verschieden strukturierte Oberflächen im Nanometerbereich von 0,2 bis 21,7 nm bereits eine Korrelation zwischen der Rauigkeit und der Anzahl (Ivanova *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011, 2013; Lüdecke *et al.*, 2016) bzw. der Adhäsionskraft der

Bakterien (Spengler *et al.*, 2019). Die Rauigkeitsbereiche der nanostrukturierten Oberflächen aus den genannten Studien sind jedoch mit 0,1 - 6 nm engmaschig gefasst und decken nicht das gesamte Größenspektrum von Zellanhängen ab. Außerdem wird bei der Auswahl der Teststämme weder die biologische Vielfalt insgesamt, noch ein möglicherweise bedeutendes Stamm-spezifisches Verhalten berücksichtigt. In den meisten Studien wird ein Stellvertreter aus den sechs pathogenen Bakterienspezies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp. (ESKAPE) herangezogen, um Rückschlüsse auf die Gesamtheit pathogener Bakterien zu ziehen. Die hier durchgeführte Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen bioinerten, nanostrukturierten Oberflächen im Größenbereich der Zellanhänge von 2 bis 16 nm und von mehreren *E. coli*-Stämmen erlaubt dagegen sowohl einen antiadhäsiven Effekt von Nanostrukturen differenzierter nachzuweisen, als auch die Adhäsionsmechanismen der verschiedenen *E. coli*-Spezies nuancierter zu überprüfen. In den folgenden Kapiteln werden der Modellorganismus *Escherichia coli*, das nanostrukturierte Biomaterial Titan, sowie die Methoden, die zur Untersuchung der Interaktion zwischen Bakterium und Materialoberfläche genutzt werden, vorgestellt.

1 *Escherichia coli* – eine vielseitige Spezies

Escherichia coli ist der am besten untersuchte und erforschte Mikroorganismus der Welt. Die grundlegenden Aspekte des Lebens einschließlich des genetischen Codes, der Transkription, Translation und Replikation wurden für diesen Mikroorganismus abgeleitet. Die so errungenen Kenntnisse wurden in bahnbrechende molekularbiologische und biochemische Methoden umgesetzt, die *E. coli* heute zum Zugpferd der pharmazeutischen Produktion, der Gentechnik, der experimentellen mikrobiellen Evolution und der Biotechnologie macht (Crick *et al.*, 1961; Nirenberg *et al.*, 1965; Blount, 2015).

1.1 Physiologie und Lebensraum

E. coli ist ein fakultativ anaerobes, Gram-negatives Bakterium, das unter optimalen Bedingungen stäbchenförmig und durchschnittlich 2 µm lang und 0,5 µm breit ist (Abb. 1).

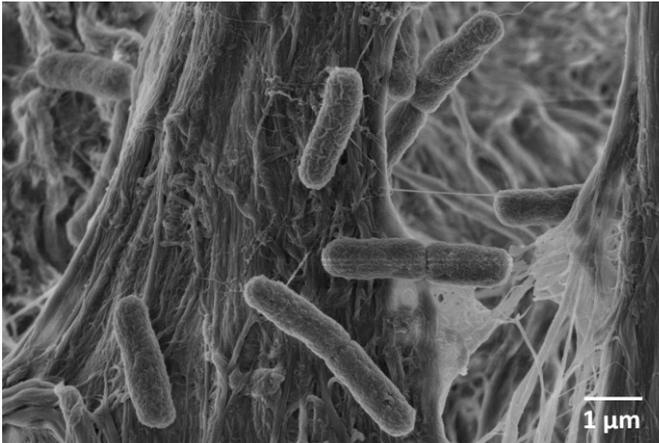


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *E. coli*-Bakterien ATCC 25922 mit der typischen, stäbchenförmigen Morphologie.

Phylogenetisch ist *E. coli* den *Enterobacteriaceae* zugeordnet und mit Pathogenen wie *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* und *Yersinia pestis* verwandt (Blount, 2015). Normalerweise ist *E. coli* ein, in der menschlichen und tierischen Darmflora vorkommendes benignes Bakterium, wo es mit mehreren Spezies in der dünnen Schleimschicht im Darm (lat. *intestinum*) einen Biofilm formt. Außerhalb des Menschen kommt *E. coli* in Erdböden, in Gewässern und in Lebensmitteln vor. Die erworbenen Überlebensstrategien in den variablen Umweltbedingungen führten wahrscheinlich zu mehreren Adaptionen, die die metabolische und regulatorische Flexibilität, die Verstoffwechslung von verschiedenen Nährstoffen und sogar die Ausbildung zu persistierenden Zellen verursachte (Leimbach, Hacker, & Dobrindt, 2013). Diese hohe Anpassungsfähigkeit führt auch zur Bildung von pathogenen *E. coli*-Stämmen. Sie verursachen eine breite Palette an menschlichen Krankheiten, die von Magen-Darm-Erkrankungen bis zu extraintestinalen Infektionen in den Harnwegen, dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem reichen (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004). Einige Stämme können Krebs (Arthur *et al.*, 2012) oder Implantat-assoziierte Infektionen (Crémet *et al.*, 2015) bewirken. Die Art der Infektion wurde namensgebend zur Einteilung von pathogenen *E. coli*-Stämmen, die grob in intestinale (IPEC) und extraintestinale *E. coli* (ExPEC) gruppiert wurden. Diese werden wiederum in Subgruppen nach ihrem Pathotypen untergliedert, deren Klassifizierung sich aus der manifestierten Krankheit, den Virulenzfaktoren und dem phylogenetischen Hintergrund ergeben (Leimbach *et al.*, 2013). Bekannte IPEC sind enterohämorrhagische (EHEC) oder enteropathogene *E. coli* (EPEC), während uropathogene (UPEC) oder Meningitis-assoziierte *E. coli* (MNEC) bekannte Vertreter der ExPEC-Gruppen sind (Kaper *et al.*, 2004).

1.2 Genomische Flexibilität

Die Fähigkeit, unterschiedliche Umweltbedingungen zu überleben, macht *E. coli* zu einem guten Kandidaten, um die Wechselwirkungen von Wirt und Bakterium differenzierter zu untersuchen. Der genetischen und phänotypischen Vielfalt liegen eine enorme Plastizität und Dynamik des *E. coli*-Genoms zugrunde, dessen Ausmaß erst durch den Beginn der Genomsequenzierungen seit 2002 aufgedeckt wurde. So wurde durch Genomsequenzierungen von 61 verschiedenen *E. coli*-Stämmen gezeigt, dass sich die untersuchten *E. coli*-Stämme nur etwa 20% der 16 000 erfassten Gesamtgene teilen (Lukjancenko, Wassenaar, & Ussery, 2010). Die gemeinsamen Gene werden zu einem Kerngenom zusammengefasst, während die individuellen Gene als flexibles Genom betrachtet werden, welches typischerweise größer als das Kerngenom ist. In der Fachliteratur anzutreffende, synonyme Begriffe für das flexible Genom sind entbehrliches, zusätzliches oder adaptives Genom. Die Summe der Gene aus dem Kerngenom und dem flexiblen Genom einer mikrobiellen Spezies wird einheitlich als Pangenom bezeichnet. Das flexible Genom inkludiert die Gene, die durch die verschiedenen Lebensstile erworben wurden. Die daraus erworbenen Fitnessvorteile und metabolische Flexibilität verleihen den Bakterien mitunter eine erhöhte Virulenz. Das flexible Genom beinhaltet neben einzelnen zusätzlichen Genen auch Prophagen und Transposons, die durch horizontalen Gentransfer weitergegeben werden. Der Erwerb und Verlust von Genen findet dabei meistens genau in denselben Stellen im Genom statt (Touchon *et al.*, 2009). Als Konsequenz ergeben sich auch variierende Größen der *E. coli*-Genome. Labor- bzw. K-12-Stämme besitzen durchschnittlich 4,5 Mb und 4000 Gene, während pathogene Stämme bis zu 6,2 Mb und 5900 Gene aufweisen (Lukjancenko *et al.*, 2010; NCBI, 2021). Durch die enorme Vielfalt bieten *E. coli*-Stämme einen fast unerschöpflichen Fundus neuer, mikrobiologischer Phänomene, die es zu entdecken und zu identifizieren gilt. Diese können an *E. coli* weitaus detaillierter untersucht werden, als es für jede andere Mikrobe möglich ist.

1.3 Adhäsion und Adhäsionszellkomponenten

Ein äußerst komplexes mikrobiologisches Phänomen ist die Biofilmbildung. Es wird geschätzt, dass 80% aller medizinischen Infektionen durch einen Biofilm verursacht werden (Tucson & Weibel, 2013). Hat sich ein Biofilm erst manifestiert, ist dieser selbst durch aggressive Reinigungs- und Desinfektionsmittel nicht zu beseitigen. Hinzu kommt, dass Bakterien innerhalb eines Biofilms hochresistent gegenüber Antibiotika sind (Flemming & Wingender, 2010). Bakterielle Adhäsion ist somit ein wichtiger Virulenzfaktor.

Ein Biofilm besteht aus einer Anhäufung von adhärierten Mikroorganismen und einem Gerüst aus den von Bakterien sekretierten Polysacchariden, Proteinen und Glycoproteinen- und Lipiden,

zusammenfassend extrazelluläre Matrix (ECM) genannt. Die ECM bildet sozusagen das „Haus der Biofilm-Zellen“, bietet einen mechanischen Schutz und dient zeitgleich der Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen (Flemming, Neu, & Wozniak, 2007; Seviour *et al.*, 2019). Abhängig von der chemischen und strukturellen Komposition kann der Biofilm schleimig, klumpig, glatt, rau, filamentös, flach oder mehrere Mikrometer dick werden (Flemming & Wingender, 2010). Jeder Biofilm beginnt mit der bakteriellen Initialadhäsion. *E. coli* kann, wie jedes andere Bakterium, auf nahezu allen Oberflächen adhären, seien es abiotische Materialien wie Glas, Metall oder Keramiken oder biotische Oberflächen wie Epithelzellen. Motile, sich aktiv bewegende, *E. coli*-Bakterien können sich mithilfe der Flagellen aktiv der Oberfläche nähern, während tote oder zellanhangslose Bakterien auch passiv durch Brownsche Bewegungen, Strömungen oder Sedimentation auf die Oberfläche gelangen. Wurde ein Oberflächenkontakt durch Zellanhänge und durch Nanodeformationen in der Zellmembran wahrgenommen, wird die Anhaftung durch die Produktion von weiteren Adhäsinen gefestigt. Adhäsine sind alle adhäsiven Strukturen eines Bakteriums und werden für *E. coli* in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.3.1 Flagellen

Flagellen sind die Zellorganellen, die den Motilitätsapparat der Bakterien ausmachen. Sie können mehr als 20 µm lang werden und sind im Durchschnitt 20 nm breit (Macnab, 2003). Ein Flagellum ist aus drei Einheiten aufgebaut: dem in der Zellmembran verankerten Basalkörper, der den Antrieb für die Rotation liefert, einem sogenannten Haken, der als eine Art Gelenk den Winkel der Rotation steuert und einem helikalen Filament aus Flagellin. Das *flhDC* Operon kodiert den Masterregulator, der über die Expression der einzelnen Strukturen entscheidet (Chevance & Hughes, 2008). Sobald sich Bakterien der Oberfläche nähern, ergeben sich anziehende und repulsive Kräfte an der Grenzfläche (Ren *et al.*, 2018). Wenn sich motile Bakterien einer Oberfläche annähern, sind es Flagellen als die längsten Zellanhänge, die den ersten Kontakt herstellen. Speziell für Flagellen in *E. coli* konnte festgestellt werden, dass sie vermehrt auf hydrophoben Oberflächen binden (Friedlander *et al.*, 2015) und gebraucht werden, um Abstände, die größer als die Bakterien sind, zu überbrücken. Dies indiziert eine Art Tastsinn, der Flagellen seit geraumer Zeit als mechanosensorische Detektoren klassifiziert (Friedlander *et al.*, 2013; Gordon & Wang, 2019). Generell wurde beobachtet, dass die Expression der Gene für die Flagellenbiosynthese nach der irreversiblen Initialadhäsion eingestellt wird, da der Motilitätsapparat im sessilen Zustand von den Zellen nicht mehr benötigt wird. In einigen Mikroumgebungen eines *E. coli*-Biofilms konnte aber festgestellt werden, dass einige Bakterien trotzdem Flagellen exprimierten. Hintergrund ist, dass Flagellen als strukturgebende Matrix im Biofilm genutzt werden indem die Bakterien sie als eine Art Anker zu benachbarten Zellen auswerfen, um sich eng aneinander zu ziehen und kompakte Aggregate zu bilden (Serra *et al.*, 2013b).

1.3.2 Fimbrien

Fimbrien sind lange, dünne Filamente, die 0,2 - 2 µm lang und 5 – 8 nm im Durchmesser werden (Olsén, Jonsson, & Normark, 1989; Wurpel *et al.*, 2013). Die Assemblierung und Ausschleusung nach außen zur Zellmembran erfolgt über das Chaperone-Usher-System (CU), einem hochkonservierten Sekretionssystem, das bei den meisten *Enterobacteriaceae* zu finden ist (Nuccio & Bäumlner, 2007; Wurpel *et al.*, 2013). Die prototypischen Fimbrien sind die Typ 1- und P-Fimbrien, die jeweils durch die *fim* und *pap* Gene kodiert werden. An der Spitze der Fimbrien befinden sich die eigentlichen Adhäsine, die als Rezeptoren an spezifischen Substraten binden. So bindet z. B. das FimH-Adhäsine spezifisch an Mannose-Moleküle, die sich auf eukaryotischen Zellen befinden (Pratt & Kolter, 1998). Außerdem gibt es noch einige andere CU-Fimbrien, z. B. F1C- und S-Fimbrien, die gehäuft in ExPEC, wie UPEC und MNEC, zu finden sind. Des Weiteren wurden noch 38 andere CU-assoziierte Zellanhänge in *E. coli*-Genomen gefunden, wie Yad, Yeh oder Yfc (Wurpel *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den prototypischen Fimbrien scheinen diese Fimbrien jedoch keine Rolle während der Biofilmbildung zu spielen, vermitteln aber als weitere Virulenzfaktoren eine spezifische Adhäsion zu verschiedenen Zellen (Elpers & Hensel, 2020). Daneben können einige Fimbrien auch an einer Vielzahl nicht-spezifischer Substrate binden, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist (Berne *et al.*, 2015).

1.3.3 Curli

Curli sind sehr feine, spiralförmige Fasern, die aus amyloiden Proteinen aufgebaut sind und einen Durchmesser von 2 – 8 nm bei variierenden Längen aufweisen (Olsén *et al.*, 1989; Chapman *et al.*, 2002). Curli-Fasern werden über die sogenannte Nukleation-Präzipitierung-Assemblierung generiert (Berne *et al.*, 2015), wobei CsgD als bidirektionaler Transkriptionsregulator die 13 Curli-Gene überwacht. CsgA dient hier als Hauptadhäsine, das aggregiert mit CsgB, einem weiteren Adhäsine, die langen Fimbrien ausbildet (Hufnagel, DePas, & Chapman, 2015). Die Produktion von Curli ist eng mit der Produktion von Zellulose verknüpft, da beide Synthesen vom globalen, sekundären Botenstoff bis-(3'-5') zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) reguliert werden (Serra, Richter, & Hengge, 2013a). Curli sind in der initialen Adhäsion, der Verfestigung, der Verankerung auf der Oberfläche und an der Biofilmbildung beteiligt (Prigent-Combaret *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2002; Tursi & Tükel, 2018). Für eine bessere Verankerung an der Oberfläche aggregieren die feinen Curli-Fasern zu einer gebündelten, starken Faser, die der Biofilmmatrix besonders bei der Ausreifung eine unterstützende Komponente verleiht (Prigent-Combaret *et al.*, 2000). Werden Curli von Bakterien vermindert exprimiert, ist sowohl die Adhäsion und Invasion von Wirtszellen als auch die Anhaftung auf abiotischen Oberflächen reduziert. Es können keine dreidimensionalen ECM gebildet werden und die Bakterien verbleiben als Einzelschicht oder als glatter, horizontaler Film auf der Oberfläche (Cegelski *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2013a).

1.3.4 Nicht-fimbriale Adhäsine

Nicht-fimbriale Adhäsine befinden sich in der äußeren Zellmembran und interagieren somit direkt mit der Umgebung (Berne *et al.*, 2015). Wichtig werden diese Strukturen vor allem bei Zellanhangsdefizienten Bakterien, die mit der Membran den ersten Oberflächenkontakt erkennen. Der bekannteste ist der Autotransporter Ag43, vom Gen *flu* kodiert, der ca. 10 nm außerhalb der äußeren Membran exponiert ist (Klemm *et al.*, 2004) und es ermöglicht, mit anderen Zellen in einer Art interzellulären „Handschüttel-Mechanismus“ zu aggregieren. Werden jedoch Typ 1-Fimbrien gebildet, blockieren diese durch ihre Größe die Funktion der kleinen Ag43-Autotransporter, die einen kleineren Aktionsradius haben (Hasman, Chakraborty, & Klemm, 1999). Den sprichwörtlich Kürzeren zieht Ag43 ebenso bei Bakterien mit einer Kapselschicht, die einer 0,2 – 1 µm breiten Ummantelung an Polysacchariden entspricht und somit Ag43 sterisch blockiert (Schembri, Dalsgaard, & Klemm, 2004). Normalerweise spielt sich die Produktion von Adhäsionskomponenten aber sehr koordiniert ab, weswegen entweder nur die Produktion von Ag43 oder Typ 1-Fimbrien gefördert wird (Schembri & Klemm, 2001). Andere bekannte Autotransporterproteine sind AIDA (Adhäsion involviert in diffuser Adhärenz) (Sherlock *et al.*, 2004) oder das neu entdeckte YeeJ (Martinez-Gil *et al.*, 2017).

1.3.5 Extrazelluläre polymere Substanzen

Die extrazelluläre Matrix eines Biofilms besteht aus einem breiten Spektrum extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), deren Zusammensetzung nicht eindeutig definiert ist. Es handelt sich um eine variable Mischung aus Proteinen, Nukleinsäuren wie extrazelluläre DNA (eDNA), Lipiden und Exopolysacchariden die von den Bakterien selbst hergestellt und sekretiert werden oder auch durch abgestorbene Zellen zur Verfügung stehen und in die ECM integriert werden (Seviour *et al.*, 2019).

Bei Exopolysacchariden wird zwischen kapsulären und aggregierenden Polysacchariden unterschieden. Während sich kapsuläre Polysaccharide (kodiert durch *kps* Locus) auf der Zelloberfläche befinden und eher eine Schutzfunktion bewirken, werden den aggregierenden Polysacchariden adhäsive und/oder kohäsive Eigenschaften zugeschrieben, die eine Adhäsion zu (Zell-)Oberflächen und eine Verfestigung der Adhäsion vermitteln (Berne *et al.*, 2015). Zu den, für *E. coli* typischen aggregierenden Polysacchariden zählen Zellulose (Gene *bcs*), Poly-β-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine (Gene *pga*) und Kolansäure (Gene *wca*). Der Großteil eines Biofilms besteht aus diesen Substanzen und ist wichtiger für die Ausreifung eines Biofilms als für die erste Adhäsion (Seviour *et al.*, 2019).

2 Biomaterial

Die Biomaterialwissenschaft ist eine interdisziplinäre Wissenschaft zwischen Materialwissenschaft und Biomedizin und hat sich vorrangig zu einem neuen Zweig der Materialwissenschaft entwickelt (Whitesides & Wong, 2011). Biomaterialien sind alle Materialien, die mit einem biologischen System in

Kontakt kommen und der Funktion dienen, geschädigtes Gewebe oder eine biologische Funktion zu unterstützen, zu erweitern oder zu ersetzen. Wo sich früher vordergründig auf die mechanischen Eigenschaften, die Langlebigkeit und die Biokompatibilität eines Biomaterials fokussiert wurde, wird in letzter Zeit die simultane bioaktive und antibakterielle Ausstattung der Oberflächen mittels Oberflächenmodifikationen angestrebt (Spriano *et al.*, 2018; Przekora, 2019). Ansätze sind hier z. B. Strukturierungen der Oberflächen im Nano- und Mikrometerbereich oder die Beschichtung mit antibakteriellen Agenzien. Strukturierte, raue Oberflächen erweisen sich als eine geeignete, passive Strategie, um die initiale Proteinadsorption, die Immunantwort, die Osseointegration und die Anhaftung von Bakterien zu beeinflussen (Crawford *et al.*, 2012). Die Oberflächenbeschaffenheit eines Materials selbst wird durch die Topographie beschrieben, die Aufschluss über die dreidimensionale Anordnung der Strukturen und die physiko-chemischen Eigenschaften einer Oberfläche gibt. Zwei wichtige Topographieparameter, die einen großen Einfluss auf die Zelladhäsion haben, sind die Rauigkeit und die Benetzbarkeit (Przekora, 2019).

2.1 Rauigkeit

Die Rauigkeit ist eine Teileigenschaft der Oberflächentopographie und beschreibt die vertikalen Ausmaße einer Struktur, von der Profilspitze bis zum benachbarten Profiltal. Die Rauigkeit wird durch mehrere Kenngrößen beschrieben, die aus einem Rauigkeitsprofil ausgelesen werden: arithmetischer Mittelwert der Profilorordinaten (R_a), größte Höhe des Profils (R_{max}) und quadratischer Mittelwert der Profilorordinaten (R_q) (Meerkam, 2014). Zur besseren Vergleichbarkeit von Studien wird die Kenngröße R_a angegeben. Mit den oben genannten Informationen wird aber ersichtlich, dass Oberflächen mit der Beschreibung zweidimensionaler Kenngrößen nicht eindeutig abgebildet werden können. Die Rauigkeit als Amplitudenparameter erfasst keine räumlichen Informationen, wie die Dichte von Spitzen oder Tälern, die Symmetrie oder die hierarchische Anordnung von Oberflächendetails, von den einzeln gezeigt wurde, dass sie die Adhäsion von Bakterien beeinflussen (Crawford *et al.*, 2012; Cheng, Feng, & Moraru, 2019). Bei Vergleichen von rauen Oberflächen sollte demnach immer berücksichtigt werden, dass die Kenngrößen einer Rauigkeit zwar übereinstimmen, sich die Topographien aber stark unterscheiden können. So können Oberflächen mit demselben R_a -Wert irreguläre bzw. zufällige, einheitliche oder hierarchische Strukturen beschreiben, die wiederum Formen von Säulen, Nadeln oder Kegeln mit verschiedenen Abständen haben können. Messungen mit einem Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope*, AFM) erlauben zusätzlich zu den Profilingaben mittels 3D-Konstruktionen, Rückschlüsse auf die Formgestalt der Topographie und liefern weitere Kenngrößen wie Oberflächenzunahme in % (R_{SA}) oder die Schiefe (Neigung des Profils) (Lüdecke *et al.*,

2013). Bei Rauigkeiten zwischen 1 und 100 nm spricht man von Nanostrukturen, während größere Rauigkeiten den Mikrostrukturen zugeordnet werden (Yurkov, Gubin, & Ovchenkov, 2009).

2.2 Benetzbarkeit

Die Benetzung ist das Verhalten einer Flüssigkeit beim Kontakt mit der Oberfläche eines Festkörpers, das von der spezifischen Oberflächenspannung der aufgetragenen Flüssigkeit, der Sauberkeit und der Rauigkeit der Oberfläche abhängt. Die Benetzbarkeit einer Oberfläche ist die zugehörige Eigenschaft der Oberfläche und wird über den Kontaktwinkel (KW) eines statischen Flüssigkeitstropfens quantifiziert, der die Oberfläche stark oder wenig benetzt. Tropfen auf Oberflächen, die einen KW unter 90° ausbilden, werden als hydrophile Oberflächen, während KW über 90° als hydrophobe und KW zwischen 150° und 180° als superhydrophobe Oberflächen bezeichnet werden. Hydrophobe Oberflächen sind auch durch den sogenannten Lotuseffekt bekannt. Hintergrund ist die Füllung der Hohlräume in den Tälern der Strukturen mit Flüssigkeit (hydrophil) oder Luft (hydrophob) (Wenzel, 1936; Genzer & Efimenko, 2006). Eingeschlossene Luft zwischen den Strukturen generiert eine Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche, die mit der Erhöhung der Rauigkeit in den Mikrometerbereich immer größer wird. Die Oberflächenspannung an der Grenzfläche ist zu groß, als dass sie von Zellanhängen oder anderen Mechanismen von Bakterien überwunden werden kann und übt dadurch einen antiadhäsiven Effekt aus (Yuan *et al.*, 2017). Um Korrelationen zwischen der Oberflächenrauigkeit und der Bakterienadhäsion eindeutig abzuleiten, muss der Effekt der Oberflächenenergie minimiert werden. Die Oberflächenenergie und die Topographie voneinander zu entkoppeln ist jedoch eine herausfordernde Aufgabe.

2.3 Modifizierbarkeit von Titan

Titan ist ein biokompatibles Metall, das besonders als Biomaterial und Legierung bei dentalen, Hüft- und Knieprothesen oder bei Herzklappen zum Einsatz kommt. Die Vorteile sind eine hohe Festigkeit im Verhältnis zum Eigengewicht, eine gute Osseointegration und die Möglichkeit der Oberflächenmodifikation. Zur Herstellung von Oberflächen mit unterschiedlichen Rauheiten können verschiedene Techniken wie Schleifen und Polieren (Barbour *et al.*, 2007), Strahlen (Ding *et al.*, 2015), Plasmaspritzen (Ong, Carnes, & Bessho, 2004), chemisches Ätzen (Blanquer *et al.*, 2016) oder vakuumbasierte Beschichtungsverfahren (Lüdecke *et al.*, 2013) verwendet werden. Zu letzterer Methode zählt die physikalische Gasphasenabscheidung (engl. *physical vapour deposition*, PVD), mit der gezeigt wurde, dass mit Titan definierte Nanostrukturen hergestellt werden können, ohne die Benetzbarkeit stark zu verändern (Lüdecke *et al.*, 2013). Bei der PVD-Methode kondensieren Titanmoleküle auf einer Oberfläche, die sich hierarchisch zu Strukturen auftürmen und durch die

Schichtdicke und Abscheidungsrate der Titanmoleküle alterniert werden können. Gelangt Titan nach dem Herstellungsprozess an die Luft, bildet sich auf der Oberfläche mit dem atmosphärischen Sauerstoff sofort eine 5 nm dicke Titandioxidschicht (Cai *et al.*, 2005). Diese Titandioxidschicht bildet die Grundlage der biokompatiblen Eigenschaft von Titan, da die Sauerstoffschicht mit Wasserionen und Serumproteinen interagiert und einer Korrosion vorbeugt (Damiati *et al.*, 2018). Solche Oberflächen sind daher ein geeignetes zweidimensionales Modellsystem, um die Wechselwirkungen zwischen Oberflächenrauigkeit und biologischem System zu untersuchen, ohne den Einfluss des Materials oder der Benetzbarkeit berücksichtigen zu müssen.

3 *In vitro*-Testsysteme für die Bakterien-Material-Interaktion

Zur Evaluierung der antiadhäsiven oder antibakteriellen Eigenschaften von Oberflächen, ist ein entsprechendes *in vivo*-Testsystem notwendig, das die Testorganismen und das Material zusammenbringt. Weder in der Mikrobiologie, noch in den Materialwissenschaften gibt es bislang standardisierte und akkreditierte Methoden für die experimentelle Ausführung und die Datenanalyse für diese *in vivo*-Testsysteme. Eine Vergleichbarkeit zwischen den Forschergruppen wird dadurch erschwert. Dieses Problem wurde erkannt und versucht in Richtlinien umzuwandeln (Lourenço *et al.*, 2012; Sjollem *et al.*, 2018; Dijck *et al.*, 2018). Mehrere Jahrzehnte der Forschung haben dazu beigetragen, die Grundlage für die Entwicklung von *in vitro*- und *in vivo*-Biofilmmodellen zu schaffen. Derzeit gibt es jedoch keine „all fit“ *in vitro*- oder *in vivo*-Biofilmmodelle (Guzmán-Soto *et al.*, 2021). Im Folgenden werden Methoden vorgestellt, die momentan genutzt werden, um die Testorganismen und das Material zusammenzubringen.

3.1 *In vitro*-Testsysteme zur Generierung adhärierter Bakterien

Bis heute wurden einige *in vitro*-Modellsysteme beschrieben, die klassische Mikrobiologie, Genetik, Mikroskopie und Biofilmmodelle kombinieren. Dazu gehören seit mehreren Jahrzehnten die aus Polystyrol bestehenden Multiwellplatten, einige Varianten von Biofilmreaktoren und von Fluidzellen (Azeredo *et al.*, 2017). Die zu testenden Plättchen werden je nach Testsystem horizontal oder vertikal in die Kavitäten (engl. *wells*) der Multiwellplatten oder in die Halterungen eingesetzt und von der Bakteriensuspension umgeben oder umspült.

Die Multiwellplatten werden meist als „geschlossene“ Systeme genutzt, wobei das Medium über den Inkubationszeitraum hinweg dasselbe bleibt und keiner Strömung ausgesetzt ist. Nachteilig ist dabei die Depletion der Nährstoffe und des Sauerstoffs, sowie die Akkumulation von Signalmolekülen und Metaboliten (Coenye & Nelis, 2010). Deswegen sind Multiwellplatten vermehrt bei kurzen Inkubationszeiten zwischen 30 Minuten und zwei Stunden in Gebrauch (Guzmán-Soto *et al.*, 2021).

Multiwellplatten sind einfach handhabbar, im Hochdurchsatz einsetzbar und benötigen keine spezialisierten Laborausrüstungen, da die meisten Geräte auf die Größe der Multitier-Platten genormt sind (Coenye & Nelis, 2010).

Andere Untersuchungen benötigen jedoch spezifische hydrodynamische Bedingungen, konstante Nährstoffzufuhr oder höhere Volumina an Biomasse, die die Multiwellplatten nicht fassen können. Hierfür sind verschiedene Biofilmreaktoren in Gebrauch, in denen die Bakteriensuspension auf die Testmaterialien anhand laminarer oder turbulenter Strömungen oder mittels Tropfen aufgebracht werden (Coenye & Nelis, 2010). Im Gegensatz zu Testsystemen mit Multiwellplatten sind Biofilmreaktoren „offene“ Systeme, in denen Nährmedium (semi-)kontinuierlich zugeführt und Abfallprodukte (semi-)kontinuierlich entfernt werden. Meistens werden Biofilmreaktoren für den konkreten Anwendungsfall eigens modifiziert und optimiert. Daneben gibt es noch Fluidzellen, die eine vielversprechende Plattform für zukünftige Biofilmstudien sind (Azeredo *et al.*, 2017). Dabei sind die Reaktoren mit Mikroskopeinheiten gekoppelt, die eine direkte Inspektion der Biofilmbildung erlauben. Diese offenen Systeme sind jedoch technisch komplexer als Multiwellplatten, benötigen längere Vorbereitungszeiten, und sind kostenintensiv. Sie eignen sich besonders für Untersuchungen an ausgebildeten Biofilmen über Tage oder Wochen hinweg. Weitergehende Informationen über die Biofilmreaktoren beleuchten die drei Reviews von Coenye & Nelis (2010), Azeredo *et al.* (2017) und Guzmán-Soto *et al.* (2021).

3.2 Quantifizierung adhärierter Bakterien als Maß der antibakteriellen Wirksamkeit einer Oberfläche

Nach dem Adhäsionsprozess bzw. der Entwicklung des Biofilms auf den zu testenden Oberflächen ist die Quantifizierung adhärierter oder eingebetteter Bakterien in einem Biofilm die Methode der Wahl, um die antibakterielle oder antiadhäsive Wirksamkeit einer Oberfläche zu ermitteln. Für die Auszählung existieren verschiedene Methoden, die auf mikro- und molekularbiologischen, chemischen und mikroskopischen Methoden beruhen (Azeredo *et al.*, 2017).

Die mikrobiologische Methode der Erfassung Kolonie-bildender Einheiten (engl. *colony forming units*, *cfu*) in Nährmedium ist die etablierteste Technik (Azeredo *et al.*, 2017). Die Kultivierung von periprothetischen Gewebeproben ist außerdem die Standardmethode für die mikrobiologische Diagnostik von Prothesengelenkinfektionen (Portillo *et al.*, 2013). Die gebundenen Bakterien werden mit Ultraschall (Liu, Bhatia, & Webster, 2017) oder mittels Schütteln (Stolzoff *et al.*, 2017) von der Oberfläche gelöst, auf Agarplatten kultiviert und anschließend die Anzahl der *cfus* gezählt. Alternativ wird das gesamte Testplättchen mit gebundenen Bakterien in Nährmedium kultiviert und die Bakteriendichte anhand der optischen Dichte photometrisch gemessen. Indirekt lässt sich so auf die

vormals gebundenen Bakterien schließen (Zhao *et al.*, 2015). Allerdings sind diese Methoden nur bedingt für die Quantifizierung adhärierter Bakterien geeignet, da sie nur kultivierbare Bakterien bestimmen können. Außerdem kann nicht sichergestellt werden, dass die adhärierten Bakterien sämtlich und ohne Schaden von der Oberfläche gelöst wurden.

Molekularbiologische Methoden, wie die Erfassung von DNA als Maß für die Anzahl der Bakterien, stellten sich als sehr fehlerbehaftet dar, da sekretierte eDNA die Messung stark verfälschen kann (Klein *et al.*, 2012). Chemische Methoden funktionieren über Anfärbungen der Biomasse. Häufig werden die Farbstoffe Kristallviolett und Resazurin, auch als Alamar Blau bekannt, genutzt (Azeredo *et al.*, 2017). Kristallviolett bindet an negativ geladenen Oberflächenmolekülen, wie EPS, und an den Bakterien selbst (Christensen *et al.*, 1985). Resazurin wird durch die zelluläre Stoffwechselaktivität in ein farbiges Produkt umgewandelt (O'Brien *et al.*, 2000; Vandecandelaere, Van Acker, & Coenye, 2016). Die gelösten Farbstoffe sind mit einem Spektralphotometer messbar und die gemessene Intensität proportional zur Quantität der Biomasse. Nachteile dieser kolorimetrischen Messungen sind die niedrige Nachweisgrenze und die fehlende Sensitivität, die es für die Ermittlung von einzelnen adhärierten Bakterien nicht anwendbar macht (Sandberg *et al.*, 2009). Für die Erfassung von wenigen, adhärierten Bakterien sind mikroskopische Methoden am geeignetsten. Anhand von Fluoreszenzfarbstoffen können die adhärierten Bakterien und Biofilme direkt unter dem Mikroskop identifiziert werden. Anhand einer repräsentativen Menge an Bildern kann auf die Gesamtanzahl der auf der Oberfläche angesiedelten Bakterien geschlossen werden. Qualitative Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) oder AFM begleiten oftmals die Charakterisierung der Bakterien-Material-Interaktion und visualisieren das Adhäsionsgeschehen an der Grenzfläche zwischen bakterieller Zellmembran und Oberfläche.

4 Einfluss von Nanostrukturen auf die bakterielle Adhäsion

Anhand dieser qualitativen und quantitativen Methoden wird die antibakterielle und antiadhäsive Wirksamkeit nanostrukturierter Oberflächen eruiert. Mehrere Studien fanden für *E. coli*, *S. aureus* und *Candida albicans* heraus, dass sich die Anzahl und die Adhäsionskraft der adhärierten Bakterien auf nanorauen Oberflächen im Vergleich zu den jeweiligen glatten Referenzen reduzierten (Li & Logan, 2004; Ivanova *et al.*, 2010, 2011; Singh *et al.*, 2011, 2013; Hsu *et al.*, 2013; Friedlander *et al.*, 2013; Lüdecke *et al.*, 2016; Spengler *et al.*, 2019; Dauben *et al.*, 2020). Dagegen konnten dieselben und andere Arbeitsgruppen mit *E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* wiederum keinen Einfluss auf das bakterielle Adhäsionsverhalten feststellen (Ivanova *et al.*, 2010, 2011; Rizzello *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2013a; Hsu *et al.*, 2013; Kallas *et al.*, 2020). Als mögliche reduzierende Effekte wurden die Deformation der bakteriellen Zellmembranen bei der Anhaftung, die wenigen, exponierten

Kontaktpunkte für eine Anhaftung oder die veränderte Oberflächenchemie diskutiert. Der Ansatz der Disruption der bakteriellen Zellwände durch Nanospitzen ist der Topographie von Libellenflügeln entlehnt (Ivanova *et al.*, 2013; Linklater *et al.*, 2018). Im Review von Cheng *et al.* (2019) wurden weitere Arbeiten betrachtet, aufgrund derer die Autoren zu dem Schluss kamen, dass trotz des Arbeitsvolumens, das bisher zu diesem Thema durchgeführt wurde, die Datenlage noch zu vage sei, um eindeutige Effekte der Oberflächentopographie auf die mikrobielle Adhäsion und die Biofilmbildung abzuleiten (Cheng *et al.*, 2019). Diese Uneinigkeit zeigt deutlich, dass weitere Untersuchungen der Bakterien-Material-Interaktion notwendig sind, um den Einfluss der Rauigkeit weiter zu entschlüsseln. Dafür gilt es, die physiologischen und morphologischen Reaktionen von adhärennten Bakterien auf nanostrukturierten Oberflächen besser zu verstehen. Vorangegangenen Studien ist gemein, dass die rauigkeitsabhängige, bakterielle Adhäsion durch Auszählen der adhärennten Bakterien und durch qualitative Bildanalysen bewertet wurden.

Seit Anfang der 2000er Jahre ermöglichen Transkriptom- und Proteomanalysen die Detektion der globalen Genexpression während eines bestimmten Zustands (Sauer, 2003; Dubois-Brissonnet, Trotier, & Briandet, 2016). Ein Transkriptom bzw. Proteom bezeichnet die gesamte transkribierte mRNA bzw. die gesamten Proteine einer Zelle, die zu einem bestimmten Zeitpunkt produziert wurden. Die Menge und die Sequenz der Transkripte bzw. Proteine werden durch eine RNA- bzw. Protein-Sequenzierung ermittelt. Danach werden die Transkripte und Proteine mit einem Referenzgenom oder -transkriptom verglichen und dadurch identifiziert (Pruitt, Tatusova, & Maglott, 2007). Durch die Menge des jeweiligen Transkripts und Proteins wird die Expression eines Gens ermittelt, die als Verhältnis zwischen zwei Konditionen angegeben wird. So wird das Transkriptmengenverhältnis eines Gens, von auf verschiedenen, rauen Oberflächen adhärennten Bakterien relativ zu planktonischen Bakterien und dadurch eine differentielle Genexpression festgestellt. Somit können Gene und Proteine ermittelt werden, die für den jeweiligen Zustand aktiviert wurden.

Mithilfe von Transkriptom- und Proteomanalysen wurden bereits physiologische Reaktionen auf verschiedenen Rauigkeiten gefunden. *E. coli* K-12-Bakterien, die auf Kohlenstoff-Nanoröhren gebunden waren, exprimierten viele Stressreaktionsproteine im Zusammenhang mit Zellmembranschäden und oxidativem Stress (Kang *et al.*, 2008). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen exprimierten *E. coli* K-12 TOP10-Bakterien auf Titandioxid-Nanosäulen ebenfalls Gene, die der oxidativen Stressantwort zugeordnet wurden. Außerdem wurde die Zellteilung gestört und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies erhöht (Jenkins *et al.*, 2020). Beim *E. coli* K-12-Stamm TG1, der auf 100 nm-rauen Goldsubstraten adhärennte, wurde der Rückgang von Typ 1-Fimbrien verzeichnet, während vermehrt Proteine, die dem Schutz der DNA und der Membran dienen, geringer exprimiert wurden (Rizzello *et al.*, 2011, 2012). Vorangegangenen Arbeiten ist gemein, dass *E. coli* K-12-

Stämme genutzt wurden. Die *E. coli* K-12-Stämme können jedoch *in vitro* nicht ausreichend das Virulenzpotential von pathogenen Stämmen abdecken (Reisner *et al.*, 2006). Denn K-12-Stämme besitzen, wie bereits erwähnt, weniger Gene als pathogene Stämme. Durch zusätzliche Gene können erworbene Überlebensstrategien und Adaptionsmechanismen umgesetzt werden, die sich fernab von Laborbedingungen entwickelt haben. Dazu gehören z. B. eine bessere Adhäsion und Biofilmbildung oder Immunevasion. Diese gilt es an klinisch relevanten Mikroorganismen zu entdecken und zu identifizieren.

5 Ziele dieser Arbeit

Die bakterielle Adhäsion und die nachfolgende Ausbildung eines Biofilms auf abiotischen und biotischen Oberflächen ist ein wesentliches Virulenzmerkmal von *E. coli*. Während der sogenannten initialen Adhäsion findet der erste Kontakt von Bakterien mit der Oberfläche statt. Diese Bakterien stellen das Bindeglied zwischen Substrat und Biofilm dar. Obwohl es noch immer viele Wissenslücken in der Bioadhäsion zu füllen gibt, ist bekannt, dass bakterielle Zellanhänge während der Initialadhäsion eine tragende Rolle spielen (Berne *et al.*, 2015; Kimkes & Heinemann, 2019). Eine mögliche antiadhäsive Strategie zur Unterbindung der Initialadhäsion und somit zur Ausbildung eines Biofilms, sind Oberflächen mit Nanostrukturen im Maßstab von Zellanhängen (2 – 20 nm im Durchmesser). Postuliert wird, dass eine mechanische Inkompatibilität zwischen den Oberflächenstrukturen und den Zellanhängen hervorgerufen wird, welche zu einer verminderten Adhäsion führt. Ferner wurde indiziert, dass die exponierten Spitzen der Oberflächenstrukturen nur wenige Kontaktpunkte zur Adhäsion vermitteln und die Anzahl adhärierter Bakterien vermindern (Lüdecke *et al.*, 2016). In Kollaboration mit dem Otto-Schott-Institut für Materialforschung wurden nanorau Titanoberflächen von 2, 7, 12 und 16 nm (R_a) generiert, die sich chemisch und morphologisch ähnlich sind. Diese Proben bildeten den Startpunkt dieser Arbeit.

Als **erstes Ziel** sollte ein *in vitro*-Adhäsionsassay mit geeigneten Parametern etabliert werden, der die nanorauen Titanoberflächen mit *E. coli*-Bakterien zusammenbringt und einer Initialadhäsion *in vivo* nahekommt. Auf diesem Adhäsionsassay basieren alle hier verwendeten Analysemethoden. **Zweitens** sollte eine Bildanalyse mit geeigneter Stichprobenanzahl entwickelt werden, mit der die adhärerten *E. coli*-Kandidaten auf den nanorauen Titanoberflächen quantifiziert und reduzierende oder begünstigende Effekte abgeleitet werden können. Als **drittes Ziel** sollten Transkriptomanalysen, der auf den verschiedenen nanorauen Titanoberflächen adhärerten und planktonischen *E. coli*-Bakterien durchgeführt und miteinander verglichen werden. Dadurch sollten einerseits putative „nanorau, sensitive Gene“ identifiziert und andererseits Adhäsionsmechanismen der *E. coli*-Stämme charakterisiert werden. Das **vierte Ziel** dieser Arbeit umfasste die Deletion und Überexpression

unbekannter Gene, die durch die Transkriptomanalysen eine Beteiligung an der Initialadhäsion indizierten und deren Funktion bisher unbekannt war. Die Mutanten sollten phänotypisch und auf ihre Biofilmbildung überprüft werden, um weitere, andere Gene während der Adhäsion und Biofilmbildung zu identifizieren.

B MATERIAL UND METHODEN

1 Stämme und Materialien

1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 1: Verwendete *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> -Stamm	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Referenz
NEB® Turbo	<i>F'</i> <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ <i>lacZM15/fhuA2</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>glnV galK16 galE15 R(zgb210::Tn10)</i> Tet ^S <i>endA1</i> <i>thi-1</i> Δ (<i>hsdS-mcrB</i>)5	New England Biolabs
RV308	Wildtyp-Stamm, K-12, Δ (<i>lac</i>) <i>chi74</i> , <i>galPO-308::IS2</i> <i>rpsL</i>	DSMZ
EC081	RV308 + pMK3c2GFPuv	Lüdecke <i>et al.</i> , 2014
NEB® Turbo <i>GFPuv_kan</i>	<i>precA_GFPuv_FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
RV308 Δ <i>manX::GFPuv_kan</i>	Δ <i>manX::recA_GFPuv_FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
KI539	Klinisches Isolat*, Wildtyp-Stamm	Kirchhoff <i>et al.</i> , 2018
KI544	Klinisches Isolat*, Wildtyp-Stamm	Kirchhoff <i>et al.</i> , 2018
KI545	Klinisches Isolat*, Wildtyp-Stamm	Kirchhoff <i>et al.</i> , 2018
KI579	Klinisches Isolat*, Wildtyp-Stamm	Kirchhoff <i>et al.</i> , 2018
KI673	Klinisches Isolat*, Wildtyp-Stamm	Kirchhoff <i>et al.</i> , 2018
KI683	Klinisches Isolat*, O6:H1, Wildtyp-Stamm	Kirchhoff <i>et al.</i> , 2018
ATCC 25922	Klinisches Isolat, O6:H1, Wildtyp-Stamm	DSMZ
XLblue1	pSIJ8	Jensen <i>et al.</i> , 2015
ATCC 25922+ pRed/ET	ATCC 25922, pBAD, <i>redα</i> , β , γ , Tet ^R	Diese Arbeit
KI683+ pRed/ET	KI683, pBAD, <i>redα</i> , β , γ , Tet ^R	Diese Arbeit
RV308+ pRed/ET	RV308, pBAD, <i>redα</i> , β , γ , Tet ^R	Diese Arbeit
ATCC 25922 Δ <i>bolA::kan</i>	Δ <i>bolA::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
KI683 Δ <i>bolA::kan</i>	Δ <i>bolA::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
RV308 Δ <i>bolA::kan</i>	Δ <i>bolA::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
ATCC 25922 Δ <i>ygeV::kan</i>	Δ <i>ygeV::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
KI683 Δ <i>ygeV::kan</i>	Δ <i>ygeV::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
RV308 Δ <i>ygeV::kan</i>	Δ <i>ygeV::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
ATCC 25922 Δ <i>yaiY::kan</i>	Δ <i>yaiY::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
KI683 Δ <i>yaiY::kan</i>	Δ <i>yaiY::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit
RV308 Δ <i>yaiY::kan</i>	Δ <i>yaiY::FRT_pGB2_kan_FRT</i>	Diese Arbeit

ATCC 25922 $\Delta ybgS::kan$	$\Delta ybgS::FRT_pGB2_kan_FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta ybgS::kan$	$\Delta ybgS::FRT_pGB2_kan_FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta ybgS::kan$	$\Delta ybgS::FRT_pGB2_kan_FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 $\Delta yddM::kan$	$\Delta yddM::FRT_pGB2_kan_FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta yddM::kan$	$\Delta yddM::FRT_pGB2_kan_FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta yddM::kan$	$\Delta yddM::FRT_pGB2_kan_FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 $\Delta bolA$	$\Delta bolA::FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta bolA::kan$	$\Delta bolA::FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta bolA$	$\Delta bolA::FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 $\Delta ygeV$	$\Delta ygeV::FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta ygeV$	$\Delta ygeV::FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta ygeV$	$\Delta ygeV::FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 $\Delta yaiY$	$\Delta yaiY::FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta yaiY$	$\Delta yaiY::FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta yaiY$	$\Delta yaiY::FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 $\Delta ybgS$	$\Delta ybgS::FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta ybgS$	$\Delta ybgS::FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta ybgS$	$\Delta ybgS::FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 $\Delta yddM$	$\Delta yddM::FRT$	Diese Arbeit
KI683 $\Delta yddM$	$\Delta yddM::FRT$	Diese Arbeit
RV308 $\Delta yddM$	$\Delta yddM::FRT$	Diese Arbeit
ATCC 25922 OE <i>bolA</i>	pUC18_lac_bolA, Amp ^R	Diese Arbeit
KI683 OE <i>bolA</i>	pUC18_lac_bolA, Amp ^R	Diese Arbeit
RV308 OE <i>bolA</i>	pUC18_lac_bolA, Amp ^R	Diese Arbeit
ATCC 25922 OE <i>ygeV</i>	pUC18_lac_ygeV, Amp ^R	Diese Arbeit
KI683 OE <i>ygeV</i>	pUC18_lac_ygeV, Amp ^R	Diese Arbeit
RV308 OE <i>ygeV</i>	pUC18_lac_ygeV, Amp ^R	Diese Arbeit
ATCC 25922 OE <i>yaiY</i>	pUC18_lac_yaiY, Amp ^R	Diese Arbeit
KI683 OE <i>yaiY</i>	pUC18_lac_yaiY, Amp ^R	Diese Arbeit
RV308 OE <i>yaiY</i>	pUC18_lac_yaiY, Amp ^R	Diese Arbeit
ATCC 25922 OE <i>ybgS</i>	pUC18_lac_ybgS, Amp ^R	Diese Arbeit
KI683 OE <i>ybgS</i>	pUC18_lac_ybgS, Amp ^R	Diese Arbeit
RV308 OE <i>ybgS</i>	pUC18_lac_ybgS, Amp ^R	Diese Arbeit
ATCC 25922 OE <i>yddM</i>	pUC18_lac_yddM, Amp ^R	Diese Arbeit
KI683 OE <i>yddM</i>	pUC18_lac_yddM, Amp ^R	Diese Arbeit
RV308 OE <i>yddM</i>	pUC18_lac_yddM, Amp ^R	Diese Arbeit

* Die klinischen *E. coli*-Isolate wurden zwischen 2012 und 2014 am Universitätsklinikum Jena aus Blut von Sepsis-Patienten entnommen (Kirchhoff *et al.*, 2018).

Bei der Bezeichnung „FRT_pGB2_kan_FRT“ handelt es sich um Mutanten, denen durch das phagenbasierte Red/ET-Rekombinationssystem eine Integrationskassette im Zielgen eingefügt wurde (Zhang *et al.*, 1998; Muyrers *et al.*, 1999). Unter Verwendung des pSIJ8-Plasmids wurde dieses entfernt (Jensen *et al.*, 2015). Daraufhin bleibt eine 84 bp große Nukleotidsequenz übrig, die die FRT-Sequenz als Narbe hinterlässt.

1.2 Medien und Zusätze

Tab. 2: Verwendete Medien und Pufferlösung.

Medien	Bestandteile	Konzentrationen
LB-Medium (Agar) (Luria/Miller)	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	(1,5% Agar)	15 g/l
	(0,3% Agar)	3 g/l
lac-SBF (Pasinli <i>et al.</i> , 2010)	NaCl	5,2599 g/l
	NaHCO ₃	2,2682 g/l
	KCl	0,3728 g/l
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,3049 g
	Na ₂ SO ₄	0,071 g/l
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,3675 g/l
	Na ₂ HPO ₄	0,1419 g/l
	Natrium-L-Laktat	2,4653 g/l
	1 M Milchsäure	1,5 – 2 ml bis pH 7,4
Terrific-Broth-Medium	Casein, enzymatisch verdaut	12 g/l
	Hefeextrakt	24 g/l
	K ₂ HPO ₄	12,54 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,31 g/l
SOB-Medium (SOC)	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	MgCl ₂	0,96 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	KCl	0,186 g/l
	(Glucose)	(20 mM)
Mannose MacConkey-Agar	MacConkey-Agar	50 g/l
	D-Mannose	1% (m/V)

Lac-SBF ist ein protein-freies Medium, das die Ionenkonzentrationen des Blutes imitiert (Pasinli *et al.*, 2010). Dabei wird einerseits vermieden, dass eine bakterielle Bindung durch protein-spezifische

Adsorptionen zustande kommt, und andererseits, dass die Nanostruktur maskiert und die Bakterien-Oberflächen-Wechselwirkung beeinflusst wird. Die nachfolgenden Zusätze wurden nach Bedarf den oben genannten Medien hinzugefügt.

Tab. 3: Verwendete Zusätze zu den Anzuchtmedien.

Funktion	Zusatz	Konzentration
Antibiotikum	Carbenicillin (amp/carb)	100 µg/ml
	Kanamycin (kan)	25 µg/ml* bzw. 50 µg/ml**
	Tetracyclin (tet)	3 µg/ml
Curli-Detektion	Kongorot	40 µg/ml
	Coomassie Blau	10 µg/ml
plac-Induktion	IPTG	1 mM
Blau-Weiß-Selektion	X-Gal	40 µg/ml
pBAD-Induktion	L-Arabinose	0,3% (m/V)
prhaBAD-Induktion	Rhamnose	50 mM

* *low copy*-Plasmide ** *high copy*-Plasmide

1.3 Plasmide

Tab. 4: Verwendete und hergestellte Plasmide.

Plasmid	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Referenz
pRedET	pBAD, <i>redα, β, γ</i> , Tet ^R	GeneBridges, Heidelberg, D
pMK3c2GFPuv	plac, <i>GFPuv</i> , Kan ^R	Lüdecke <i>et al.</i> , 2014
pMK_pT7_mCherry	pT7, <i>mCherry</i> , Amp ^R	Invitrogen, Schwerte, D
pUC57_pRecA_mOrange2	pRecA, <i>mOrange2</i> , Amp ^R	Biomatik, Toronto, Kanada
pRecA_GFPuv_pGB2_kan_FRT	pRecA, <i>GFPuv</i> , Kan ^R , Amp ^R	C. Telle, 2016, Leibniz-HKI
pSIJ8	prhaBAD, FLP-Rekombinase, Amp ^R	Jensen <i>et al.</i> , 2015
pUC18	Amp ^R	Norrandner <i>et al.</i> 1983
pUC18_A_bolA	Amp ^R , plac, <i>bolA</i> aus ATCC 25922	Diese Arbeit
pUC18_K_bolA	Amp ^R , plac, <i>bolA</i> aus KI683	Diese Arbeit
pUC18_R_bolA	Amp ^R , plac, <i>bolA</i> aus RV308	Diese Arbeit
pUC18_A_ygeV	Amp ^R , plac, <i>ygeV</i> aus ATCC 25922	Diese Arbeit
pUC18_K_ygeV	Amp ^R , plac, <i>ygeV</i> aus KI683	Diese Arbeit
pUC18_R_ygeV	Amp ^R , plac, <i>ygeV</i> aus RV308	Diese Arbeit
pUC18_A_yaiY	Amp ^R , plac, <i>yaiY</i> aus ATCC 25922	Diese Arbeit
pUC18_K_yaiY	Amp ^R , plac, <i>yaiY</i> aus KI683	Diese Arbeit
pUC18_R_yaiY	Amp ^R , plac, <i>yaiY</i> aus RV308	Diese Arbeit

pUC18_A_ybgS	Amp ^R , plac, <i>ybgS</i> aus ATCC 25922	Diese Arbeit
pUC18_K_ybgS	Amp ^R , plac, <i>ybgS</i> aus KI683	Diese Arbeit
pUC18_R_ybgS	Amp ^R , plac, <i>ybgS</i> aus RV308	Diese Arbeit
pUC18_A_yddM	Amp ^R , plac, <i>yddM</i> aus ATCC 25922	Diese Arbeit
pUC18_K_yddM	Amp ^R , plac, <i>yddM</i> aus KI683	Diese Arbeit
pUC18_R_yddM	Amp ^R , plac, <i>yddM</i> aus RV308	Diese Arbeit

1.4 Oligonukleotide

1.4.1 Primer für NEBuilder® HiFi DNA Assembly (Gibson Assembly)

Tab. 5: Primer für Gibson Assembly.

Name	Zielsequenz	Sequenz (5' → 3')
oJW0292	Backbone-AmpR-Prec fw	CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG
oCT005	Backbone-AmpR-Prec rv	TTTGCTAGCGCTCATGGTGGGTACCTCCTTTGAATTC
oCT006	<i>GFP</i> fw	AAGGAGGTACCCACCATGAGCGCTAGCAAAGGAG
oCT003	<i>mCherry</i> rv	AGGGTTAATTTTACTTGTACAGCTCGTCCA
oCT004	Backbone-FRT-ORI fw	TGGACGAGCTGTACAAGTAA
oJW0291	Backbone-FRT-ORI rv	CGTTCCACTGAGCGTCAGACC

1.4.2 qRT-PCR-Primer

Tab. 6: Verwendete Primer in der qRT-PCR für den Vergleich Adhäsion an 2 nm Oberfläche vs. planktonisch. *E. coli* ATCC 25922 = *A. E. coli* KI683 = *K. E. coli* RV308 = R.

Name	Gen	Sequenz (5' → 3')
ATCC 25922		
oNS156	<i>arcA_for</i>	ATCACCAAACCGTTCAACC
oNS157	<i>arcA_rev</i>	GTTCTTCGCTGACAGTACC
oNS052	<i>napF_for</i>	CCCGAATCGCTATTTTCTCC
oNS053	<i>napF_rev</i>	CATTCAACTGACTGATACGCC
oNS54b	<i>bsmA_for</i>	AGTAACGGACCATCCGAAGAG
oNS55b	<i>bsmA_rev</i>	GAACCATCGTGCTTACGCTACC
oNS58b	<i>ydhY_for</i>	TTGATAGCGGCACAGTAGG
oNS59b	<i>ydhY_rev</i>	CTGAGCCATCGTTGAAGTTG
oNS066	<i>iscR_for</i>	ATTTGAGCGACCGCCTTAC
oNS067	<i>iscR_rev</i>	AGACACATCCAGCACTTCC
oNS068	<i>cusF_for</i>	GCTTTAATGCCAGGCTAAC
oNS069	<i>cusF_rev</i>	CCAGATCAACACCTTTTACCAC
oNS070	<i>cusC_for</i>	AACGATCAAATCAGCGCC
oNS071	<i>cusC_rev</i>	CATCCAGCACTTCCAGATAAC
oNS086	<i>artJ_for</i>	ATCGTTTACCACGCCCTAC
oNS087	<i>artJ_rev</i>	GCCGTTTTCCATCCCAATAC
oNS108	<i>ydhH_KA_for</i>	TGGGTCTGGTGGTAATGGTG
oNS109	<i>ydhH_KA_rev</i>	CCGACGAAAATACTTAGCACAG

oNS132	<i>ybgS_KA_for</i>	ATGAAGAGCACAAGAACACC
oNS133	<i>ybgS_KA_rev</i>	TCGACATCATTGTTGATGCC
oNS158b	<i>pykA_for</i>	CCAAAATCCGTGTATCCACC
oNS159ab	<i>pykA_rev</i>	TGTCGCCTTCACCTTACC
KI683		
oNS54b	<i>bsmA_for</i>	AGTAACGGACCATCCGCAAGAG
oNS55b	<i>bsmA_rev</i>	GAACCATCGTGCTTACGCTACC
oNS052	<i>napF_for</i>	CCCGAATCGCTATTTTCTCC
oNS053	<i>napF_rev</i>	CATTCAACTGACTGATACGCC
oNS056	<i>metE_for</i>	ACACACAAATCCACACTCAC
oNS057	<i>metE_rev</i>	AGCAACTCCATGTCGGAAC
oNS074	<i>tdcF_for</i>	CTTCGATGAACATCAGGCG
oNS075	<i>tdcF_rev</i>	GGCTTCAATTTCCAACCTCAC
oNS078	<i>tdcD_for</i>	GGACACGCTGCTTCATTAC
oNS079	<i>tdcD_rev</i>	TGACCAGACGACGAATTAAC
oNS082	<i>rplC_for</i>	TAACCTCTGTCTCACCGC
oNS083	<i>rplC_rev</i>	ACCTGCCATTTTCTTGCC
oNS086	<i>artJ_for</i>	ATCGTTTACCACGCCCTAC
oNS087	<i>artJ_rev</i>	GCCGTTTTCCATCCCAATAC
oNS088	<i>phoH_for</i>	AGTTTGCTCCCTATTTTCGTC
oNS089	<i>phoH_rev</i>	AATTTCCACCTTCCCTATTTCC
oNS108	<i>yehH_KA_for</i>	TGGGTCTGGTGGTAATGGTG
oNS109	<i>yehH_KA_rev</i>	CCGACGAAAATACTTAGCACAG
oNS132	<i>ybgS_KA_for</i>	ATGAAGAGCACAAGAACACC
oNS133	<i>ybgS_KA_rev</i>	TCGACATCATTGTTGATGCC
RV308		
oNS154	<i>gyrA_R_for</i>	CATCGACCCGATCATCGAAC
oNS155	<i>gyrA_R_rev</i>	TGCCACGGATTAGCAACCAG
oNS152	<i>bssS_for</i>	TCAGACTCATCCGCTCGTAG
oNS153	<i>bssS_rev</i>	GACCAACTTCAGTCCCTTCC
oNS54b	<i>bsmA_for</i>	AGTAACGGACCATCCGCAAGAG
oNS55b	<i>bsmA_rev</i>	GAACCATCGTGCTTACGCTACC
oNS066	<i>iscR_for</i>	ATTTGAGCGACCGCCTTAC
oNS067	<i>iscR_rev</i>	AGACACATCCAGCACTTCC
oNS190b	<i>fadI_R_for</i>	ATCACCCGAGAACAGCAAG
oNS191b	<i>fadI_R_rev</i>	GGGATAAAGGCAGTCATCAC
oNS192b	<i>ydcW_R_for</i>	GCACATCATCAGCCATACC
oNS193b	<i>ydcW_R_rev</i>	TGCTTCAATATCCGCATCATC
oNS194b	<i>purH_R_for</i>	TGAAAGCAAAGAAGCCGCC
oNS195b	<i>purH_R_rev</i>	TCGCCGTAACGCATATCCAG
oNS198	<i>amtB_R_for</i>	GGTGGGCGCGTATCTGATAG
oNS199	<i>amtB_R_rev</i>	CCCGGCGTTAAAGCCAAACC
oNS200	<i>pyrC_R_for</i>	TACTGGTGCATGGTGAAGTG
oNS201	<i>pyrC_R_rev</i>	GCATCTTTGGTGGTGTATGTG
oNS046	<i>ydhW_for</i>	AGTTCATTGCCAGCATTCC
oNS047	<i>ydhW_rev</i>	CAGTTCCTCTTCTGCAACC

Tab. 7: Verwendete Primer in der qRT-PCR für den Vergleich Adhäsion an 2 nm vs. 7 nm Oberfläche von *E. coli* ATCC 25922.

Name	Gen	Sequenz (5'→ 3')
ATCC 25922		
oNS156	<i>arcA_for</i>	ATCACCAAACCGTTCAACC
oNS157	<i>arcA_rev</i>	GTTCTTCGCTGACAGTACC
oNS038	<i>yqgB_for</i>	TTGGAGCGTCAGCATTAC
oNS039	<i>yqgB_for</i>	CAGCCTGGAAGTGCATAA
oNS042	<i>metF_for</i>	TCCAGAAGCGAAAAGTGCC
oNS043	<i>metF_rev</i>	CGACATCGAAGAAGAACTGAG
oNS044	DR76_RS24660_for	GCAGCACCGCATTATTAC
oNS045	DR76_RS24660_rev	CAGCCCGACAGAAAATGAAG
oNS048	DR76_RS26075_for	TTAACTACAATGATGTGACTTTTTAC
oNS049	DR76_RS26075_rev	GCATGTCAACCACAAATCTATC
oNS068	<i>cusF_for</i>	GCTTTAATGCCAGGCTAAC
oNS069	<i>cusF_rev</i>	CCAGATCAACACCTTTTACCAC
oNS036	<i>tnaC/L_for</i>	CATATATGTGTGACCTCAAAA
oNS037	<i>tnaC/L_rev</i>	GCGGTGATCGACAAT
oNS040	<i>yqgC_for</i>	TGCAAAGCAGAGATGCAGA
oNS041	<i>yqgC_rev</i>	CGTGGAGGTGATACGAAATAATGA

Tab. 8: Verwendete Primer in der qRT-PCR für den Vergleich Biofilm vs. planktonisches Wachstum (24 h) von *E. coli* ATCC 25922 und RV308.

Name	Gen	Sequenz (5'→ 3')
ATCC 25922		
oNS156	<i>arcA_for</i>	ATCACCAAACCGTTCAACC
oNS157	<i>arcA_rev</i>	GTTCTTCGCTGACAGTACC
oNS211	<i>yddM_A_for</i>	ATTCAGGAATCACTGGACGAAC
oNS212	<i>yddM_A_rev</i>	AACTGCCGATCACCACAGAC
oNS245b	<i>higA_for</i>	ACGAGGAACAATACACCCAG
oNS246b	<i>higA_rev</i>	ACACACCAGATCCAGCAAG
oNS247	<i>higB_A_for</i>	GCACATCATTCTAAAGCGCC
oNS248	<i>higB_A_rev</i>	CCGATACAATGAGTGTAGAGCC
RV308		
oNS154	<i>gyrA_R_for</i>	CATCGACCCGATCATCGAAC
oNS155	<i>gyrA_R_rev</i>	TGCCACGGATTAGCAACCAG
oNS217	<i>yddM_R_for</i>	ATGGAAATTGCTCCCTCAAC
oNS218	<i>yddM_R_rev</i>	TTTTCTGCCTCTGCCAGAC
oNS245b	<i>higA_for</i>	ACGAGGAACAATACACCCAG
oNS246b	<i>higA_rev</i>	ACACACCAGATCCAGCAAG
oNS249	<i>higB_R_for</i>	CTGGGGAACACGATTGCTAAG
oNS250	<i>higB_R_rev</i>	CGTAATTCATTGCCCCAAC

1.4.3 Primer für Gendeletionen

Tab. 9: Verwendete Primer für die Gendeletionen in *E. coli* spp.: ATCC 25922 = A, KI683 = K, RV308 = R.

Name	Gen	Sequenz (5' → 3')
oNS010	<i>manHS_for</i>	GTTGATACATGGGGAGGCAGCCCGTTCAATGCTGCCAGCCGCATT GTCGT <u>ACGACGGCCAGTGAATTCGAG</u>
oNS015	<i>manHS_rev</i>	CGAGCATTGGAATGTTAACGCCTGCAATGACTTCATAATGCTCTTT GTCG <u>GCCCATGAGGCCAGTAATAC</u>
oNS096	<i>bolA_Rec_for</i>	GATACGTGAGCGGATAGAAGAAAAATTAAGGGCGGCGTTCCAA CCCGTATA <u>AATTAACCTCACTAAAGGGCGG</u>
oNS097	<i>bolA_Rec_rev</i>	AGCCGGCTGGGACATTGTGACGATAGCTTTCATCCACTACTTCGA GGATAC <u>GACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS164	<i>ygeV_Rec_for</i>	CAACGTCTTCAATGATCGACTTTTAAGTAAGTCTGGAAGGTAAAG CTATGA <u>AATTAACCTCACTAAAGGGCGG</u>
oNS165	<i>ygeV_Rec_KA_rev</i>	GGCCTGAATTCAGGCCGATTCTCAGAGGTTATGTGTTTAAACAAC TCATATA <u>ACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS166	<i>ygeV_Rec_R_rev</i>	GGCCTGAATTCAGGCCGATTCACTGAGGTTATGTGTTTAAACAAC TCATATA <u>ACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS168_rec	<i>yaiY_Rec_for</i>	CGCTGGTATCACACCAGAAGAGAAGCAGATGACTTCCGGAGGTTT TTATGA <u>AATTAACCTCACTAAAGGGCGG</u>
oNS169	<i>yaiY_Rec_KA_rev</i>	GTTTTAGGCAGCATCTGGCAACGTAATCTTACTGGCGGCGATGT CGCCATA <u>ACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS170	<i>yaiY_Rec_R_rev</i>	GTTTCAGGCCGATCTGACAATGTAAACTTACTGGCGGCGATGT CGCCATA <u>ACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS202	<i>ybgS_Rec_for</i>	CTGTTGGAAGAGGTTATCCGACATAACGACCATAACAGGAGCATC CTATGA <u>AATTAACCTCACTAAAGGGCGG</u>
oNS203	<i>ybgS_Rec_KA_rev</i>	GCTCTCCATTATTGGCTATTTTCGAGGGTACTGCGTGGTACCGTC GGT <u>TACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS204	<i>ybgS_Rec_R_rev</i>	GCTCTCCATTATTGGCTATTTTGCAGGGTACTGCGTGGTACCGT CGG <u>TACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS207	<i>yddM_Rec_KA_for</i>	TTCGTCATGGCGATGCATACATACTGGATTACGAGGACTATCACT GATGA <u>AATTAACCTCACTAAAGGGCGG</u>
oNS208	<i>yddM_Rec_KA_rev</i>	CAAATGGCGCTTTATAAAGTGCCATTTTTTTATTGCGTAACCCAGAC GGCGT <u>ACGACTCACTATAGGGCTC</u>
oNS213	<i>yddM_Rec_R_for</i>	CATGTTCCGGTTCGAGCATCGCACACTCTCCAACATGAAATGGCTA AATGA <u>AATTAACCTCACTAAAGGGCGG</u>
oNS214	<i>yddM_Rec_R_rev</i>	TAAATGGCGCTTTATAAAGTGCCATTTTTTTATTGCGTAACCCAGAC GGCGT <u>ACGACTCACTATAGGGCTC</u>

Die unterstrichenen Sequenzen dienen der Amplifizierung der Integrationskassette. Die 48 – 50 bp davor sind die homologen Regionen zum jeweiligen Zielgen.

Tab. 10: Verwendete Primer zur Überprüfung von Deletions- und Überexpressionsmutanten in *E. coli* spp. ATCC 25922 = A, KI683 = K, RV308 = R.

Name	Gen/Zielsequenz	Sequenz (5' → 3')
oGB1	<i>manX_for</i>	CACCACTAAAGGCGTGCTGT
oGB3	<i>kan_for</i>	TATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
oGB4	<i>manX_rev</i>	TGGAGCCGCTTTTGGTGCT
oIN3	<i>pGB2_rev</i>	ACCTTGTCGTATTATACTATGCCGAT
oNS012	<i>Seq_man_for</i>	GCTCAGTTGGCAAACTCGAC
oNS016	<i>Seq_man_rev</i>	GTGCTTTCACGCCTTCACGGC
oNS032	<i>amp_for</i>	ACTTTATCCGCCTCCATCC
oNS033	<i>amp_rev</i>	TGCCTTCCTGTTTTTGCTC

oNS034	<i>kan_for</i>	GGATCGGCCATTGAACAAG
oNS035	<i>kan_rev</i>	GCAAGGTGAGATGACAGGAG
oNS098	<i>bolA_upstream_for</i>	TCAGCGTTGTCCGAGGAGATA
oNS099	<i>bolA_downstream_rev</i>	ACTGGAAAAGCGCCGACAG
oNS182	<i>ygeV_upstream_for_KA</i>	AACTTGCCGCTGTAATTCTC
oNS183	<i>ygeV_downstream_rev_KA</i>	CAAAACCACGCGAAAAACC
oNS184	<i>ygeV_upstream_for_R</i>	ACCGCCGTAATTCTCATATTG
oNS185	<i>ygeV_downstream_rev_R</i>	CACGCGAGAAGCCATTAAC
oNS186	<i>yaiY_for_upstream</i>	GTCAGACTTGCCATAAGCC
oNS187	<i>yaiY_rev_downstream</i>	GAAAGCCCAGAAAATCACCC
oNS205	<i>ybgS_for_upstream</i>	CCGACATAACGACCATAACAG
oNS206	<i>ybgS_rev_downstream</i>	ACTCCGCTCTCCCATTATTG
oNS209	<i>yddM_KA_for_upstream</i>	TCAATGGCGATGCATACATAC
oNS210b	<i>yddM_KA_rev_downstream</i>	GTTGCGTTTGCATCAGTTTC
oNS215	<i>yddM_R_for_upstream</i>	AGCATCGCACACTCTCCAAC
oNS216	<i>yddM_R_for_downstream</i>	GATAAGCGTAGCGCATCAGG
oNS188	<i>bolA_inside_rev</i>	ACCCTTCCACTCCTTAATAG
oNS168	<i>ygeV_inside_rev</i>	GATAGAGCGTAGCAATGCC
oNS189	<i>yaiY_inside_rev</i>	ACACCTAAACCAATTTCCACC
oNS133	<i>ybgS_inside_rev_KA</i>	TCGACATCATTGTTGATGCC
oNS135b	<i>ybgS_inside_rev_R</i>	TTTGGTCATTCCGTCATTGTTC
oNS211	<i>yddM_inside_for_KA</i>	ATTCAGGAATCACTGGACGAAC
oNS217	<i>yddM_inside_for_R</i>	ATGGAAATTGCTCCCTCAAC
oNS242	FRT_rev	CTTCTAGAGAATAGGAACTTC
oNS243	pUC18_seq_for	AAACGACGGCCAGTGCCAAG
oNS244	pUC18_seq_rev	TGCTTCCGGCTCGTATGTTG

1.4.4 Primer zur Klonierung in pUC18

Tab. 11: Verwendete Primer zur Integration von Zielgenen in pUC18-Plasmide. *E. coli* ATCC 25922 = A, *E. coli* K1683 = K, *E. coli* RV308 = R.

Name	Zielsequenz	Sequenz (5' → 3')
oNS227	<i>bolA_RE_for</i>	GGTGGAGAAATTCATGATACGTGAGCGGATAG
oNS228b	<i>bolA_RE_rev</i>	ACTACTGAGCTCTTACGCGATGCTTCCTGC
oNS229	<i>ygeV_RE_KA_for</i>	GGTGGAGAAATTCATGGAGCTTGCGACTAC
oNS230	<i>ygeV_RE_R_for</i>	GGTGGAGAAATTCATGGAGCTTGCTACTACGC
oNS231	<i>ygeV_RE_KAR_rev</i>	GCCGCCGAGCTCTTATGTGTTTAACAACCTC
oNS232	<i>yaiY_RE_for</i>	GTTGGAGAAATTCATGGCTGATTTACCCTGTC
oNS233	<i>yaiY_RE_rev</i>	ACTATTGAGCTCTTACTGGCGGCGATGTCCG
oNS234	<i>ybgS_RE_for</i>	GGCGGCGAAATTCATGAAAATGACAAAACCTGTCTGGC
oNS235	<i>ybgS_RE_rev</i>	ACCACTGAGCTCTTACTGCGTGGTACCGTC
oNS236	<i>yddM_RE_KA_for</i>	GGTGGAGAAATTCATGAAAATGGCCAATCATCCC
oNS237	<i>yddM_RE_R_for</i>	GGTGGAGAAATTCATGGATTATTGTTGCGTAG
oNS238	<i>yddM_RE_rev</i>	ACTACTGAGCTCTTATTGCGTAACCAGACG

Die kursiven Sequenzen bedeuten die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SacI*.

1.5 Nanoraue Titanoberflächen

Die nanoraue Titanoberflächen wurden mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (engl. *physical vapour deposition*, PVD) vom Kollaborationspartner, dem Otto-Schott-Instituts für Materialforschung (OSIM) am Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena, entwickelt und hergestellt (Michaela Schürmann, Thomas Dauben). Ein dünner Titanfilm wurde auf Borosilikatplättchen (\varnothing 15 mm, Dicke 0,7 mm; Borofloat® B33; Jena 4H Engineering GmbH, Jena, D) abgeschieden, die fortan als Titanplättchen bezeichnet werden. Ein inerter Titandioxidfilm entsteht nach Kontakt von Titan mit atmosphärischem Sauerstoff (Sidambe, 2014). Spezifische Nanorauigkeiten wurden generiert, indem die Abscheidungsrate, die Schichtdicke des Titanfilms und das Ätzen mit 2 – 10 M NaOH variiert wurden. Topographische Merkmale (R_a , R_q , RSA, R_{max} , Schiefe und Kurtosis) der nanoraue Titanplättchen wurde mit einem Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscopy*, AFM; Dimension 3100, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, US) charakterisiert (Tab. 12, Abb. 2).

Tab. 12: Merkmale der TiO_2 -Plättchen, die mittels PVD und variierenden Abscheidungsraten, Schichtdicken und Ätzen mit 2 – 10 M NaOH hergestellt wurden. Die Rauigkeitwerte R_a , R_q , RSA, R_{max} , Schiefe und Kurtosis wurden anhand eines von AFM erzeugten $1\ \mu m \times 1\ \mu m$ -Bilder berechnet (Michaela Schürmann, Thomas Dauben, OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena).

Bezeichnung	R_a [nm]	R_q [nm]	RSA [%]	R_{max} [nm]	Schiefe	Kurtosis	Kontaktwinkel [°]
2 nm	$1,6 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,4$	$3,4 \pm 1,0$	$17,4 \pm 5,2$	$0,33 \pm 0,18$	$3,4 \pm 0,3$	$63,2 \pm 3,3$
7 nm	$6,5 \pm 1,0$	$8,2 \pm 1,3$	$5,3 \pm 2,4$	$57,3 \pm 12,7$	$0,20 \pm 0,19$	$3,1 \pm 0,4$	$47,9 \pm 6,9$
12 nm	$12,6 \pm 1,3$	$15,8 \pm 1,7$	$22,8 \pm 4,3$	$108,8 \pm 18,2$	$0,10 \pm 0,11$	$3,0 \pm 0,4$	$45,6 \pm 5,5$
16 nm	$15,4 \pm 1,8$	$18,4 \pm 2,3$	$25,0 \pm 2,8$	$129,8 \pm 14,6$	$0,01 \pm 0,24$	$3,0 \pm 0,4$	$42,8 \pm 3,5$

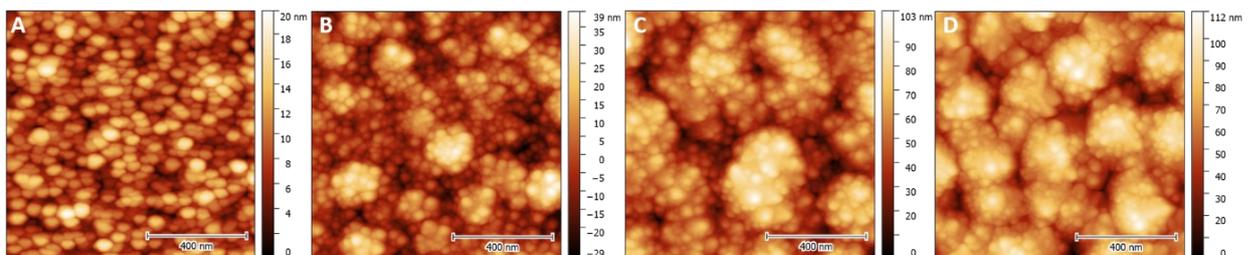


Abb. 2: Repräsentative AFM-Höhenbilder der TiO_2 -Oberflächen mit den Rauigkeiten von 2 nm (A), 7 nm (B), 12 nm (C) und 16 nm (D). AFM-Aufnahmen von Michaela Schürmann und Thomas Dauben am OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena, erstellt.

Zur Vereinfachung wurden den Titanplättchen kurze Bezeichnungen nach den R_a -Werten gegeben. Die Oberflächen wurden mittels Photoelektronenspektroskopie (engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) auf die Elementkomposition überprüft. Die Plättchen besitzen verschiedene Morphologien, sind sich aber chemisch ähnlich und frei von NaOH-Resten. Vor dem Gebrauch wurden die Titanplättchen in eine 24-Multiwellplatte geklebt (Greiner CELLSTAR®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich), wozu ein 6:1-Gemisch aus Silastic Medical Adhesive (Dow Corning, Midland, MI, US): Sigma 204 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) verwendet wurde, um sicher zu stellen, dass sich die Bakterien nur auf der

oberen Seite anlagerten. Der Kleber härtete für mindestens 12 h an der Luft aus. Anschließend wurden die Titanplättchen für 10 min in 70% (V/V) Ethanol bei RT sterilisiert und dreimal mit MilliQ-Wasser gespült.

1.6 Kultivierungsbedingungen von *E. coli*

1.6.1 Motilitätstest

Die Motilität der Stämme wurde mit LB-Agarplatten mit 0,3% (m/V) Agar geprüft. Durch die sehr weiche Konsistenz können motile Bakterien durch das Medium schwimmen und verursachen eine kreisförmige Trübung um die Inokulationsstelle, während nicht-motile Bakterien nur eine feste Kolonie um die Inokulationsstelle bilden. Somit ist die Ausweitung der Trübung ein Maß der Schwimmkapazität der einzelnen Bakterienstämme. Für die Tests wurden jeweils 2,5 µl Übernachtskultur in die Mitte einer LB-Agarplatte gegeben, wobei mithilfe der Pipettenspitze der Agar bis zur Hälfte eingestochen wurde. Die Platten wurden für 17 h bei 37 °C inkubiert und anschließend fotografiert (Alphamager® HD, proteinsimple, San Jose, US). Die Experimente wurden in technischen Duplikaten und biologischen Triplikaten durchgeführt.

1.6.2 Kultivierung und Kryokonservierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte je nach benötigtem Volumen in 15 ml-, 50 ml-Gefäßen oder ab 10 ml in Schüttelkolben mit Schikanen, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C und 200 rpm. Im Falle einer Transformation mit einem Temperatur-labilen Replikationsursprung (pRED/ET, pSIJ8) wurden die Bakterien bei 28 °C kultiviert. Gegebenenfalls fand eine Zugabe von Antibiotika bei der Kultivierung plasmidtragender *E. coli* statt (Tab. 3 und Tab. 4). Für die Kryokonservierung von *E. coli*-Stämmen wurde eine Einzelkolonie über Nacht (16 – 18 h) in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen inkubiert und anschließend 1 ml in ein CRYOBANK™-Gefäß (Mast Diagnostics GmbH, Reinfeld, D) überführt. Darin sind poröse Kügelchen enthalten, deren vergrößerte Oberfläche eine effektive Anlagerung der Bakterien ermöglicht, die dann ohne Kryomedium für lange Zeit bei -80 °C gelagert werden können. Die Stämme wurden für 1 min mit den Kügelchen inkubiert, anschließend wurde überschüssiges Medium entfernt und das CRYOBANK™-Gefäß bei – 80 °C gelagert. Für eine Reaktivierung wurde ein Kügelchen in entsprechendes Medium überführt und wie angegeben inkubiert.

1.6.3 *In vitro*-Adhäsionsassay

Um die Bakterien und die Oberflächen in Kontakt zu bringen, wurde ein *in vitro*-Adhäsionsassay etabliert, der für alle weiteren Methoden Anwendung fand. Für den *in vitro*-Adhäsionsassay wurden pro Experiment der jeweilige Stamm aus der Kryokonserven über Nacht inkubiert. 100 µl der Übernachtskultur wurden in 10 ml auf 37 °C vorgewärmte LB-Medium pipettiert und die Kultur wurde

für 2,5 h bis zu einer $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ (Infinite M200 promultimode plate reader, TECAN, Schweiz) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden für 2 min bei 3000 x g abzentrifugiert und die so entstandenen Pellets in 5 ml auf 37 °C vorgewärmtes lac-SBF oder LB-Medium resuspendiert und für die entsprechende Anwendung (Bildanalyse, RNA-Isolierung, REM-Analyse oder qRT-PCR) in 1 ml lac-SBF oder LB-Medium pro Titanplättchen verdünnt. Die Titanplättchen wurden mit der Bakteriensuspension auf einem Plattenschüttler (PST-60HL, bioSan, Riga, Lettland) für 1 h bei 37 °C und 260 rpm inkubiert.

1.6.4 Biofilmbildung zur Isolierung von RNA

Biofilme der Stämmen *E. coli* ATCC 25922 WT, $\Delta yddM$, OEyddM und pUC18 und *E. coli* RV308 WT, $\Delta yddM$, OEyddM und pUC18 wurden wie in B1.6.7 beschrieben generiert. Nach der 24-stündigen Inkubationsphase, wurde der planktonische Überstand der technischen Replikate in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß gesammelt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und sofort in 300 μ l Trizol resuspendiert. Der zurückgebliebene Biofilm in den Wells der 96-Multiwellplatte wurde dreimal mit Leitungswasser geflutet, um planktonische Bakterien zu entfernen. Daraufhin wurden pro Well 200 μ l Trizol zugefügt, es wurde 5 min inkubiert, die Biofilme wurden mit Impfösen gelöst und das Biofilm-Trizol-Gemisch der technischen Replikate in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die RNA-Isolierung aus Bakterien der planktonischen und Biofilm-Fraktion erfolgte wie in Abschnitt B2.1.3 beschrieben mit angepassten Volumina.

1.6.5 Wachstumskurven

Um die Auswirkung der Gen-Deletionen und -Überexpressionen auf die Lebensfähigkeit der *E. coli*-Stämme zu überprüfen, wurden Wachstumskurven erstellt. Hierfür wurden jeweils 200 μ l einer auf eine $OD_{600} = 0,01 - 0,02$ eingestellten (Infinite M200 promultimode plate reader, TECAN, Schweiz) Übernachtskultur in 96-Multiwellplatten (96-MicroWell™, Nunc™, 732-2721, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, US) transferiert. Über das Programm *Kinetic Absorption* wurden die Kulturen bei 37 °C für 15 h inkubiert, wobei alle 10 min für 5 s geschüttelt wurde (*Kinetic cycle* 10 min, *Shaking: Duration* 5 s, *orbital, Amplitude* 1 mm, *Waiter* 10 min). Die Experimente wurden in technischen Duplikaten und biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Wachstumsraten μ [min^{-1}] wurden anhand der Formel $\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0)$ berechnet, wobei t_0 die Anfangszeit und t die Endzeit der exponentiellen Phase und x_0 und x_t die korrespondierenden Zellzahlen der OD_{600} -Werte sind.

1.6.6 Biofilmbildung auf Festmedium

Die Bewertung eines veränderten Phänotyps der Stämme erfolgte durch Makrokolonien auf LB-Agarplatten. Den LB-Agarplatten wurden, wie in Tab. 3 beschrieben, Kongorot und Coomassie Blau zugefügt. 5 μ l Bakteriensuspension einer Übernachtskultur des zu testenden Stammes wurde auf die LB-Agarplatte getropft. Danach wurden die angeimpften LB-Agarplatten für einen Zeitraum von 48 h

bei 37 °C inkubiert und die Färbung, die Form und die Oberflächenbeschaffenheit der Makrokolonien bewertet. Werden von den Bakterien Curli-Fasern gebildet, so bindet der Indikatorfarbstoff Kongorot daran und verursacht rote Kolonien. Werden keine Curli-Fasern gebildet, so bleibt die Kolonie weiß. Exopolysaccharide wie PGA, Zellulose oder Kolansäure verursachen auf den Makrokolonien raue Strukturen, die von kleinen Blasen bis zu komplexen 3D-Strukturen reichen können. Ansonsten bleibt die Oberfläche der Makrokolonien glatt und rund. Die Experimente wurden in technischen und biologischen Duplikaten durchgeführt.

1.6.7 Biofilmbildung und Quantifizierung der Biomasse eines Biofilms

Die Quantifizierung von an Polystyrol-Oberflächen gebundenen Biofilmen erfolgte über eine Kristallviolett-Färbung. Kristallviolett bindet an negativ geladenen Oberflächenmolekülen, wie EPS, und färbt den Biofilm, sowie die gebundenen Bakterien selbst, an. Die photometrisch gemessene Intensität des gelösten Farbstoffs ist proportional zur Quantität des Biofilms (Christensen *et al.*, 1985). Die zu testenden Stämme wurden aus einer Übernachtskultur mit LB-Medium auf eine $OD_{600} = 0,05$ eingestellt (Infinite M200 promultimode plate reader, TECAN, Schweiz). 200 µl dieser Kultur wurden in 96-Multiwellplatten (96-MicroWell™, Nunc™, 732-2721, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, US) transferiert, abgedeckt und bei 37 °C für 24 h inkubiert, damit sich am Boden und am Rand ein potentieller Biofilm ausbilden konnte. Dann wurde nochmals die Absorption bei OD_{600} gemessen (G). Nachdem die Platte dreimal mit Leitungswasser geflutet wurde, um planktonische Bakterien zu entfernen, wurden die Biofilme in den 96-Multiwellplatten ohne Deckel bei 60 °C für 30 min hitzefixiert, dann 30 min mit 200 µl 0,1% (m/V) Kristallviolett-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, D; in Wasser gelöst) angefärbt und dreimal mit Leitungswasser geflutet, um überschüssiges Kristallviolett zu entfernen. Abschließend wurde das gebundene Kristallviolett mit 200 µl 95% (V/V) Ethanol gelöst und bei OD_{595} (AB) gemessen. Die spezifische Biofilmbildung wurde leicht abgeändert von Crémet *et al.* (2013) übernommen: $SBF = (AB - CW_{600}) / (G - CW_{595})$ mit CW als Negativkontrolle (LB-Medium). Negative SBF-Werte wurden als 0 gewertet. Die äußeren Wells der 96-Mikrowellplatten wurden mit destilliertem Wasser gefüllt, um den Rand-Effekt (engl. *edge effect*) zu minimieren. Die Experimente wurden in technischen und biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Mittelwerte der Kontrollen wurden als Normalisierungswert herangezogen (Graphpad Prism8).

2 Molekularbiologische Methoden

2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.1.1 Isolierung von DNA

Tab. 13: Isolierung von DNA aus verschiedenen Quellen.

Isolierung von	Hersteller
DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen	Quick-DNA Microprep Kit, Zymo Research, Freiburg
DNA-Fragmente aus Enzymreaktionen	
Plasmide aus <i>E. coli</i> -Stämmen	NucleoSpin Plasmid EasyPure Mini Kit, Macherey-Nagel, Düren, D
HMW genomische DNA (PacBio Sequenzierung)	MagAttract HMW DNA Kit, Qiagen, Hilde, D
LMW genomische DNA (schnell)	NucleoSpin™ Microbial DNA Mini Kit, Macherey-Nagel, Düren, D
DNA-Fragmente aus Agarosegelen	NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel, Düren, D

Die DNA wurde in Nuklease-freien, DEPC-behandeltem Wasser (DEPC-Treated Water, Invitrogen, Waltham, MA, US) eluiert.

2.1.2 Isolierung von RNA aus auf Titan-adhärirten *E. coli* spp.

Die RNA-Isolierung von adhärirten *E. coli*-Bakterien auf Titanplättchen erfolgte von mindestens fünf Titanplättchen, die mit 10^8 Bakterien/ml beimpft waren. Nach dem *in vitro*-Adhäsionsassay wurden die planktonischen Bakterien in den Multiwellplatten durch sofortiges Abpipettieren und dreimaliges Waschen mit 1 ml lac-SBF-Puffer entfernt. Die adhärirten Bakterien wurden anschließend mit 300 µl RNAlater®-Lösung überlagert. Die Proben wurden 12 – 16 h bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben vom Kleber gelöst, gemeinsam in ein 50 ml-Gefäß überführt und kurz abzentrifugiert, um die restliche RNAlater-Lösung zu entfernen. Die Proben wurden mit 3 ml Trizol überschichtet und 1 min mittels Vortex (Vortex Genie 2T, neoLab, Heidelberg) geschüttelt. Das Proben-Trizol-Gemisch wurde anschließend bei 95 °C für 5 min erhitzt, um die Zellen zu lysieren und wieder für 1 min mittels Vortex (Vortex Genie 2T, neoLab, Heidelberg, D) geschüttelt. Anschließend wurde das Proben-Trizol-Gemisch bei 14 500 x g für 5 min bei 2 °C zentrifugiert (Avanti J-26S XP, Beckman Coulter, Brea, CA, US), dann wurden 2,7 ml Trizol abgenommen und in ein neues 50 ml-Gefäß überführt. Für die Ausfällung wurden 2,7 ml Ethanol_{abs.} hinzugefügt und für 10 s mittels Vortex gemischt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Directzol MicroPrep Kit von Zymo Research mit einem zusätzlichen *prewash*-Schritt und zwei weiteren *RNA-Wash*-Schritten, um etwaig verschleppte Mikrob Bestandteile des Borosilikatglases und Titans in der Membran zusätzlich zu reinigen. Es wurde zweimal mit 6 - 10 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Der DNase-Verdau erfolgte mit Epicentres Baseline-ZERO™ DNase (Lucigen®, Middleton, WI, US) für 30 min bei 37 °C mit einem

Reaktionsvolumen von 23 μl und anschließender Inaktivierung der DNase mittels Stopplösung bei 65 °C für 10 min. Die Stopplösung wurde nur für die Gesamt-RNA von *E. coli* K1683 genutzt, während für die Gesamt-RNA von *E. coli* ATCC 25922 und RV308 keine genutzt wurde und gleich mit der RNA-Ausfällung begonnen wurde. Die RNA-Ausfällung erfolgte mit einem Co-Fällungsmittel. Dafür wurde die RNA-Lösung mit 1/10 3 M Natriumacetat versetzt, vermischt, 30 μg lineares Polyacrylamid (6 μl , Co-Precipitant, Bioline, London, UK) dazu gegeben, vermischt, 2,5 Volumen Absolut-Ethanol zugefügt und vermischt. Das Gemisch wurde für 30 min bei -80 °C gekühlt, dann für 15 min bei 2 °C und 18 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, das Pellet mit 70%igem Ethanol gespült und 5 min bei 2 °C und 18 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet. Die gesamte RNA wurde in 30 μl RNase-freien DEPC-behandelten Wasser (DEPC-Treated Water, Invitrogen, Waltham, MA, US) resuspendiert, die Konzentration der Gesamt-RNA spektrophotometrisch gemessen und die RNA sofort bei -80 °C gelagert. Für RNA-Seq-Experimente wurden jeweils 3 x 10 Proben aus drei unabhängigen Experimenten analysiert, damit 30 Proben pro Kondition (2 nm und 7 nm) zur Verfügung standen. Die drei biologischen Replikate wurden zusammengeführt und in zwei technische Replikate geteilt. Die weitere Qualitätsanalyse mit dem Agilent Bioanalyser erfolgte bei der StarSEQ GmbH, Mainz.

2.1.3 Isolierung von RNA aus planktonischen *E. coli* spp.

Nach dem *in vitro*-Adhäsionsassay wurden 10 x 100 μl der planktonischen Bakterien über den Titanplättchen sofort abpipettiert und in einem 50 ml-Gefäß gesammelt. Die Lösung wurde für 3 min bei 4000 x g zentrifugiert, das Pellet in 1 ml RNAlater®-Lösung resuspendiert und für 12 – 16 h bei 4 °C gelagert. Zur weiteren Bearbeitung wurde das Gemisch für 3 min bei 4000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Trizol resuspendiert und das restliche Versuchsprotokoll wurde wie in Abschnitt B2.1.2 mit angepassten Volumina durchgeführt.

2.2 Manipulation von Nukleinsäuren

2.2.1 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Plasmiden, PCR-Fragmenten, LMW gDNA, cDNA und RNA wurde am NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) gemessen. Für die Bestimmung wurde stets 1 μl eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung von HMW gDNA erfolgte über Agarosegele, wobei 2 μl Probe aufgetragen und die Konzentration anhand eines DNA-Größenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt wurde.

2.2.2 Restriktionsverdau

PCR-Produkte, Plasmid- und genomische DNA wurden mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt, D) und den vom Hersteller angegebenen Puffern in 20 – 50 µl für mindestens 1 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Um Plasmid-DNA zu ligieren, wurde das Rapid DNA Ligation Kit nach Herstellerangaben eingesetzt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US).

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mittels PCR in einem Biometra® T Advanced Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) oder in einem Mastercycler® nexus (Eppendorf, Hamburg, D) amplifiziert. Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) wurde zur Amplifizierung von routinemäßigen Screens von Kolonien genutzt. Kolonien wurden zuerst in 15 µl Wasser resuspendiert und hiervon 1 µl für die PCR genutzt. Um die Effizienz der qRT-PCR-Primer vor dem eigentlichen qRT-PCR-Experiment zu überprüfen, wurden eine qualitative PCR mit den spezifischen qRT-PCR-Primer, der MyTaq™ Red (Bioline, London, UK) und 10 ng gDNA oder cDNA als Vorlage durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Merkmale der Primerqualität waren die Größe, Dichte, Schärfe und Exklusivität der Banden.

2.2.5 Nahtlose Assemblierung von PCR-Fragmenten

Die nahtlose Assemblierung von verschiedenen DNA-Fragmenten wurde mithilfe des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt, D) ermöglicht, das auf der Überlappung homologer Regionen basiert (Gibson *et al.*, 2009). Die Plasmide (Tab. 4) und die dazugehörigen Primer (Tab. 5) wurden über die webbasierte Software NEBuilder Assembly Tool (<http://nebuilder.neb.com/#!/>) entworfen. 2 µl des Ansatzes wurden in *E. coli* NEB® Turbo-Zellen transformiert.

2.2.6 PCR zur Erstellung der Rekombinationskassetten

Die Integrationskassetten für die Deletionsmutanten wurden mit der PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Kyoto, Japan) unter Verwendung der in Tab. 9 aufgeführten Primern nach Herstellerangaben amplifiziert, mittels Agarosegel-Elution aufgereinigt, mit DpnI verdaut und nochmals mittels Agarosegel-Elution aufgereinigt. Die Positionen der flankierenden, homologen Sequenzen variieren und sind in den entsprechenden Abschnitten erläutert.

2.2.7 Erzeugung chromosomaler Knockout-Mutanten durch Rekombination

Die spezifische Integration von DNA-Fragmenten in das Genom von *E. coli* erfolgte nach Anleitung des Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Kits (GeneBridges, Heidelberg, D) mit wenigen Änderungen. Dabei

wurden *E. coli*-Bakterien mit dem Plasmid pRed/ET in 10 ml LB_{tet}, bei 30 °C für 2 h bis zur OD₆₀₀ = 0,2 - 0,3 inkubiert und anschließend mit 300 µl L-Arabinose induziert (pBAD-Promoter). Gleichzeitig wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht, um die Produktion der Rekombinationsproteine einzuleiten. Nach einstündiger Inkubation wurden die Bakterien elektrokompent gemacht (s. B2.4.2) und in 3 x 50 µl Ansätze geteilt. Daraufhin wurden 300 ng der linearen Integrationskassette für die Transformation verwendet und die Zellen wurden 3 h bei 37°C unter 300 rpm inkubiert (SmartBlock™, Eppendorf, Hamburg, D; Corning® mini bioreactor, Merck, Darmstadt, D). Im Anschluss wurden 20 und 80 µl der *E. coli*-Suspensionen auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. *E. coli*-Klone wurden mittels Kolonie-PCR und Primern aus Tab. 10 untersucht.

2.2.8 Entfernen von DNA-Fragmenten aus dem *E. coli*-Genom mittels FLP-Rekombination

Das FLP-Rekombinationssystem modifiziert spezifisch DNA-Fragmente zwischen FRT-Sequenzen. Diese Methode wurde verwendet, um Selektionsmarker aus dem Genom von *E. coli* zu entfernen. Hierfür wurde das Plasmid pSIJ8 wie im Protokoll bei Jensen *et al.* (2015) angewendet. Dabei wurden elektrokompente *E. coli*-Zellen mit dem genomisch integrierten Selektionsmarker mit Plasmid pSIJ8 transformiert und auf LB_{kan/carb}-Agarplatten bei 28 °C inkubiert. Mittels Kolonie-PCR verifizierte positive Klone wurden in LB_{kan/carb}-Medium für 2 h bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Bakterienpellet in LB_{carb} mit 50 mM Rhamnose aufgenommen und für 6 h bei 30 °C inkubiert. Innerhalb der 6 h entfernte die Rhamnose-induzierte FLP-Rekombinase den Selektionsmarker zwischen den FRT-Sequenzen und hinterließ nur eine FRT-Sequenz als Footprint zurück.

2.2.9 cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde von adhären und planktonischen Bakterien, wie in den Abschnitten B2.1.2 und B2.1.3 beschrieben, isoliert. Um die komplementären cDNA-Einzelstränge zu synthetisieren, wurde dem Maxima™ H Minus Protokoll (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, US) mit den folgenden Zusätzen gefolgt: 100 ng RNA, 0,5 µm *random hexamer primers* (Invitrogen, Waltham, MA, US), 0,5 mM dNTP Mix (Bioline, London, UK), Thermo Polreaction buffer, 1 U RNaseOUT™ RNase Inhibitor (Invitrogen, Waltham, MA, US) und 10 U Maxima™ H Minus Reverse Transcriptase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Der Reaktionsansatz wurde im Temperaturprofil 10 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert. Das Gemisch wurde bei -20 °C gelagert oder sofort in der qRT-PCR eingesetzt.

2.2.10 qRT-PCR

Eine qRT-PCR-Analyse wurde im QuantStudio™ 3 System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) in 20 µl-Reaktionen in 96-Multiwellplatten (FrameStar® 96 Well Skirted, PCR Plate, 4ti-0961) mit Hilfe des MyTaq™ HS Mix (Bioline, London, UK), EvaGreen® (Biotium, Hayward, CA, US), spezifischen Primern aus Tab. 6 bis Tab. 8 und 50 ng gepoolter cDNA pro Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die

Multiwellplatten mit druckempfindlicher, selbstklebender Folie fest versiegelt (Applied Biosystems® MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems™, Waltham, MA, US). Die Primer-Effizienz wurde vorher mit Hilfe von Standardkurven berechnet, wobei gDNA-Mengen ab 100 ng seriell 1:5 verdünnt wurden. Es wurden sechs Punkte mit jeweils drei Replikaten herangezogen und Primer mit Primer-Effizienzen zwischen 80 – 105% verwendet. Als interne Kontrolle und Normalisierung für die Genexpression wurde *arcA* für *E. coli* ATCC 25922 und KI683 und *gyrA* für *E. coli* RV308 verwendet. Für die vergleichende CT-Methode ($\Delta\Delta CT$) zur Verifizierung der differentiell exprimierten Gene, die durch Transkriptomanalysen identifiziert worden waren, wurde für *E. coli* ATCC 25922 und KI683 die planktonische Fraktion als Kalibrator herangezogen, sowie für *E. coli* RV308 die adhärenente Fraktion. Für die qRT-PCR-Experimente wurden biologische und technische Triplikate eingesetzt.

2.3 Gelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe und findet in horizontalen Gelen statt. Die Agarosekonzentration betrug für Nukleinsäuren über 0,5 kb 1%, für unter 0,5 kb 1,5% in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,5, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) und 0,01% Ethidiumbromid. Die Proben wurden, falls nötig, mit 1/6 Vol. Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem passenden Größenstandard auf das Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 80 – 130 V. Die Visualisierung der DNA mittels UV-Licht erfolgte im Alphamager® HD (proteinsimple, San Jose, US).

2.4 Transformation von DNA

2.4.1 Hitzeschocktransformation

Die Transformation von *E. coli* via Hitzeschock erfolgte nach Angaben der Hersteller der chemisch kompetenten *E. coli* NEB® Turbo-Zellen.

2.4.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Um bei *E. coli* eine Elektrokompetenz zu erzeugen, muss die Umgebung der Zellen von jeglichen Salzen befreit sein, um bei einem Elektroschock die Permeabilität der Zellmembranen zu erhöhen (Tu *et al.*, 2016). Deshalb wurden 100 μ l *E. coli*-Bakterien aus der exponentiellen Phase pelletiert und in 1 ml MilliQ-Wasser resuspendiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Für die sofortige Verwendung wurden die Zellen im letzten Schritt in 50 μ l MilliQ-Wasser resuspendiert, für eine spätere Verwendung in 50 μ l 10%iger (V/V) Glycerollösung in MilliQ-Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Elektrotransformation

Für eine Elektroporation wurden die (aufgetauten) *E. coli*-Bakterien mit DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 mm (Biozym, Hessisch Oldendorf, D) transferiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporator (Eporator[®], Eppendorf, Hamburg, D) bei 1700 V für 5 ms. Zu der Zellsuspension in der Küvette wurde sofort 1 ml 37 °C warmes SOC-Medium zugegeben. Die Lösung wurde in ein 50 ml Gefäß überführt (Corning[®] mini bioreactor, Merck, Darmstadt, D) und bei 37 °C je nach Anwendung für 1 – 3 h inkubiert. Im Anschluss wurden 20 und 80 µl auf entsprechende Selektionsagarplatten ausplattiert und es wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3 Mikroskopie

3.1 Fluoreszenzmikroskopie

3.1.1 Vorbereitung zur Quantifizierung der adhärenierten Bakterien – Bildanalyse

Sechs Titanplättchen pro Rauigkeit und Bakterienstamm wurden pro Experiment genutzt, die jeweils mit 2×10^4 Bakterien/ml bzw. /Oberfläche beimpft waren. Die Impfmenge wurde durch Auszählen (Neubauer-Zählkammer) bestimmt und mit einer Verdünnungsreihe bestätigt. Die Titanplättchen mit den adhärenierten Bakterien (=Probe) wurden dreimal mit 1 ml lac-SBF gespült (mittels Hoch- und Herunterpipettieren) und in eine gesonderte 24-Multiwellplatte mit vorgelegten 1 ml Histofix (4% (V/V) Paraformaldehyd in 1xPBS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US) für 30 min fixiert. Die Proben wurden einmal mit MilliQ-Wasser gespült. Um die Bakterien anzufärben, wurden die Proben nach Zugabe von 1 ml Hoechst 33258 (10 µg/ml in lac-SBF) 30 min in Dunkelheit inkubiert. Nach einmaligem Eintauchen in Wasser, Lufttrocknung und Aufkleben auf Objektträger, wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Die Visualisierung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Microscope AxioImager M2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit einem 20x-Objektiv und dem DAPI-Filtermodul. Es wurden 15 zufällige 12 Bit-Bilder à $710.52 \times 532.38 \mu\text{m}^2$ (1388×1040 Pixel) pro Titanplättchen aufgenommen, die eine repräsentative Fläche von 3,2% der Gesamtfläche widerspiegeln.

3.1.2 Aufnahme einer kompletten Titanoberfläche für die Bootstrapping-Analyse

Um die Anzahl der Bilder abzuschätzen, die für ein repräsentatives Abbild der adhärenierten Bakterien auf den Titanplättchen benötigt werden, wurde ein Bootstrapping-Ansatz verfolgt (Efron, 1979). Dazu wurde ein ganzes Titanplättchen mit adhärenierten Bakterien mit dem Fluoreszenzmikroskop (BZ-X800, Keyence, Osaka, Japan) mit dem 20x-Objektiv à $720 \times 540 \mu\text{m}^2$ (960×720 Pixel) vollständig gescannt und mittels *Stitching*-Funktion zu einem Gesamtbild zusammengefügt (BZ-X800 Analysis v1.1.1.8).

3.2 Rasterelektronenmikroskopie mit fokussierten Ionenstrahl (FIB-REM)

Titanplättchen, mit einer Inokulationsmenge von 10^8 Bakterien/ml in lac-SBF bzw. LB-Medium, wurden rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Für jeden Stamm und jede Rauigkeit wurden pro Experiment zwei Titanplättchen genutzt. Zur Vorbereitung wurden die Titanplättchen mit adhärenierten Bakterien (=Proben) dreimal in MilliQ-Wasser getaucht, um planktonische und lose Bakterien zu entfernen, und anschließend 15 min in 1x PBS inkubiert. Die Proben wurden danach mit 2,5% (V/V) Glutaraldehyd (Glutardialdehydlösung 25%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US; gelöst in MilliQ-Wasser) für einen Zeitraum von 12 h fixiert. Nachdem das Fixierungsmittel 15 min mit MilliQ-Wasser abgewaschen wurde, wurden die Proben schrittweise mit einer ansteigenden Ethanolkonzentration in Wasser (V/V, 20%, 40%, 60%, 80% and 90%) à 15 min Inkubationszeit dehydriert. Nach dem letzten Schritt wurden die Proben zweimal in Ethanol_{abs.} jeweils 30 min inkubiert. Die chemische Trocknung erfolgte mit einem Hexamethyldisilazan (HMDS)-Ethanol-Gemisch mit ansteigender HDMS-Konzentration (V/V, 25%, 50%, 75%) und 3 – 5 min Inkubationszeit pro Gemisch. Die Proben wurden an der Luft getrocknet und mit Wolfram beschichtet (ca. 2 nm) (S150B, Edwards Ltd, Crawley, UK). Mithilfe des REMs AURIGA 60 CrossBeam® FIB-SEM scanning electron microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) wurden Bilder mit Vergrößerungen von 1 000x bis 70 000x bei 4 kV und einer Distanz von 3.3 mm angefertigt (Heidrun Garlipp, OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena). Querschnitte der adhärenierten Bakterien wurde mit dem fokussierten Ionenstrahl (engl. *focused ion beam*, FIB) bei Vergrößerungen zwischen 33 000x und 80 000x bei 5 kV und einer Distanz von 5,1 mm aufgenommen (Ralph Wagner, OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena).

4 Bioinformatische Methoden, Statistik und Datenbanken

4.1 Bildanalyse der adhärenierten Bakterien auf Titanplättchen

Die aus dem *in vitro*-Adhäsionsassay stammenden Bilder (s. Abschnitt B3.1.1) wurden mit ImageJ (FIJI v1.52p) (Schindelin *et al.*, 2012) analysiert (Bianca Hoffmann, Leibniz-HKI, Angewandte Systembiologie). Die RGB-Bilder wurden zuerst in eine 8 Bit-Grauskala konvertiert und mittels *UnsharpMask* mit einem *mask radius* von 3 und *mask weight* geschärft. Rauschen (engl. *noise*) wurde durch die *Despeckle*-Funktion unterdrückt. Um potentielle Bakterien vom Hintergrund zu separieren, wurden die Bilder mit der *k-means Clustering*-Funktion segmentiert und mit $k = 2$, *cluster center tolerance* = 0,0001 und *randomization seed* = 48 eingestellt. Die daraus resultierenden Grauskala-Bilder mit zwei Objektklassen wurden mit einem Schwellenwert (engl. *threshold*) von 1 binarisiert, womit der Hintergrund in schwarz und die Bakterien in weiß umgewandelt wurden. Objekte, die sich nicht am Rand befanden und zwischen 2 und 100 Pixel groß waren, wurden mit der *Analyze Particle*-

Funktion quantifiziert. Da Bakterien als regelmäßige, stäbchenförmige bis runde feste Objekte erscheinen, wurden Artefakte aufgrund der morphologischen Merkmale und entsprechender Grenzwerte ausgeschlossen ($perimeter \geq 35$ Pixel, $circularity \leq 0.5$, $aspect\ ratio \geq 3$, $roundness \leq 0.4$ und $solidity \leq 0.7$). Objekte, auf die weniger als drei der Parameter zutrafen, wurden von der weiteren Analyse exkludiert. Die Anzahl der Bakterien wurde für jedes Bild exportiert und für die statistische Auswertung verwendet. Die statistische Analyse wurde mit R v3.6.1 (R Core Team, 2018) durchgeführt. Da die absolute Anzahl der Bakterien auf den Oberflächen zwischen den Experimenten variierte, wurde die Anzahl der Bakterien auf den *E. coli*-Stamm ATCC 25922, adhärert auf 2 nm-Titanplättchen, normalisiert und in Prozent angegeben. Der Mittelwert dieser Bedingung entspricht dabei 100%. Ergebnisse aus den unabhängigen Experimenten wurden kombiniert und als Anzahl der Bakterien pro Bild zu Boxplots zusammengefasst. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur und den paarweisen Effektgrößen nach Hedges' g ermittelt.

4.2 Schätzung der benötigten Bilder im *in vitro*-Adhäsionsassay (Bootstrapping)

Das Gesamtbild aus dem Abschnitt B3.1.2 wurde anhand eines Bootstrapping-Versuchs weiter prozessiert (Bianca Hoffmann, Leibniz-HKI, Angewandte Systembiologie). Um das runde Titanplättchen mit adhärerten Bakterien aus dem Gesamtbild zu extrahieren, wurde das Titanplättchen mit einem Kreis als interessierende Region (engl. *region of interest*, ROI) markiert und ausgeschnitten. Alle Pixel innerhalb der ROI wurden auf 0 gestellt. Die Belichtung wurde vereinheitlicht, indem der Hintergrund mit einem *mask radius* = 110 Pixel eingestellt wurde. Das Bild wurde mit einem Schwellenwert = 4 binarisiert und verbleibende Artefakte am Rand des ROI wurden manuell entfernt. Agglomerierte Partikel wurden durch die *watershed*-Funktion gesplittet. Alle Objekte kleiner als 4 Pixel und größer als die Mittelwertgröße plus das Zweifache der Standardabweichung aller Objekte wurden von der Analyse exkludiert. Verbleibendes Rauschen wurde durch die *Remove Outliers*-Funktion mit einem Radius von 2 entfernt. Das so vorbereitete Gesamtbild wurde dann in nicht-überlappende Einzelbilder mit den Größenangaben des Originalexperimentes à 1388 x 1040 Pixel geschnitten. Es wurden nur ganze Einzelbilder genutzt. Die durch die *Analyze Particles*-Funktion bestimmte Anzahl der Bakterien wurde für die statistische Auswertung herangezogen. Die statistische Auswertung basierte auf der Bootstrapping-Anwendung, bei der aus einer Probe verschieden viele Stichproben gezogen werden, um daraus eine theoretische Verteilung abzuleiten (Efron, 1979). Hier wurde eine definierte Anzahl Einzelbilder als Stichprobe gezogen, wobei das Einzelbild nach Zählung wieder zurückgelegt wurde. Die Stichprobengröße rangierte von 1 bis 50 und jedes Mal wurde der Mittelwert der Bakterienanzahl ermittelt. Dieser Prozess wurde 1000x pro Stichprobengröße wiederholt und der gebildete Mittelwert

und das gebildete Konfidenzintervall abgespeichert. Der Mittelwert und das Konfidenzintervall der Anzahl der Bakterien pro Stichprobengröße wurde visualisiert und genutzt, um darzustellen, wie gut der repräsentative Mittelwert eine Anzahl Bilder mit dem annähernden realen Mittelwert der ganzen Titanoberfläche korrespondiert.

4.3 *de novo*-Genomsequenzierung in *E. coli* KI683 mittels PacBio

Da die Genomsequenz von *E. coli* KI683 für die Interpretation der RNA-Sequenzierungsdaten notwendig war, wurde diese durch PacBio-Sequenzierung (Genewiz, South Plainfield, NJ, US) ermittelt. Die Sequenzierdaten (Stefani *et al.*, 2020) wurden in der DDBJ/ENA/GenBank-Datenbank unter der Studiennummer PRJEB34704 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB34704>) hinterlegt. Die Rohdaten der Sequenzen sind unter der Zugangsnummer ERX3577898 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/ERX3577898>) abrufbar.

4.4 *in silico*-Nachweis von Plasmiden in *E. coli* KI683

Zur Prüfung eines möglichen plasmidialen Ursprungs der beiden Contigs 2 und 3, wurden die Sequenzen in das webbasierte Programm *PlasmidFinder* 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (Carattoli *et al.*, 2014) eingespeist und die Einstellungen wie folgt übernommen: *Select database = Enterobacteriaceae*, *Selection threshold for minimum % identity = 95%* und *Select minimum % coverage = 60%*.

4.5 Genomvergleich

Für den Genomvergleich wurden die Genomsequenzen der Stämme ATCC 25922 (GCF_00743255.1), KI683 (GCF_902505025.1) und RV308 (GCF_000952955.1) (Krempel *et al.*, 2014) im Dateiformat *.fasta von der NCBI-Datenbank heruntergeladen. Die Sequenzen wurden in NUCMER version 4.0.0beta2 (Delcher *et al.*, 2002) eingespeist und verglichen (Tongta Sae-Ong, Leibniz-HKI, Systembiologie und Bioinformatik).

4.6 Orthologes Genclustering

Um den gemeinsamen und Stamm-spezifischen Genpool der *E. coli*-Stämme zu identifizieren, wurden die entsprechenden Genannotationen der drei Stämme ATCC 25922 (GCF_00743255.1), KI683 (GCF_902505025.1) und RV308 (GCF_000952955.1) (Krempel *et al.*, 2014) im Dateiformat *.faa von der NCBI-Datenbank heruntergeladen. Die Genannotationen wurden zum orthologen Genclustering in das webbasierte Programm OrthoVenn2 (<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net/task/create>) (Xu *et al.*, 2019) hochgeladen und mit den Einstellungen *E-value = 1e-5*, *Inflation value = 1,5* und eingeschalteter

Annotation und *Protein similarity* prozessiert (Tongta Sae-Ong, Leibniz-HKI, Systembiologie und Bioinformatik).

4.7 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung „zählt digital“ RNA-Moleküle aus und erfasst somit relevante biologische Änderungen in der Genexpression von Mikroorganismen in einem bestimmten Zustand. Aus der gepoolten Gesamt-RNA aus jeweils drei Replikaten der adhären und planktonischen Bakterien wurden 1 µg Gesamt-RNA von *E. coli* ATCC 25922, 0,6 µg von *E. coli* KI683 und 1 µg für *E. coli* RV308 für die Bibliothekenvorbereitung prozessiert. Die rRNA-Depletion, Bibliothekenerstellung und die *next generation*-RNA-Sequenzierung wurden von der StarSEQ GmbH (Mainz, D) durchgeführt. Für die rRNA-Depletion der Gesamt-RNA der Stämme ATCC 25922 und KI683 wurde das Illumina Ribo-Zero rRNA Depletion Kit (Illumina, San Diego, CA, US) angewendet, für die Gesamt-RNA des Stammes RV308 das RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit (Invitrogen, Waltham, MA, US). Die Bibliotheken aller Proben der drei Stämme wurde mit dem NEBNext® Ultra™ II directional RNA Library Kit for Illumina® (New England Biolabs, Frankfurt, D) erstellt und mit dem Illumina®NextSeq 500-System (Illumina, San Diego, CA, US) sequenziert. Die Proben von *E. coli* ATCC 25922 und KI683 wurden 2 x 75 nt sequenziert, die 10 Mio. bzw. 50 Mio. gepaarte *reads* und 4,5 Gb bzw. 7,5 Gb pro Probe produzierten. Die Proben von *E. coli* RV308 wurden 2 x 150 nt sequenziert, die 25 Mio. gepaarte *reads* und 3,75 Gb pro Probe ergaben. Die insgesamt 16 RNA-Sequenzierdaten wurden in der DDBJ/ENA/GenBank-Datenbank unter der Studiennummer PRJEB39155 hinterlegt (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB39155>).

4.8 Transkriptomanalyse

Die *reads* aus der RNA-Sequenzierung wurden für eine differentielle Genexpression mit dem *in house*-entwickelten RNA-Seq-Protokoll GEO2RNA-seq, Version 0.100.1 (Seelbinder *et al.*, 2019), in R Version 3.5.1 (R Core Team, 2018) geschrieben und weiter verarbeitet (Thomas Wolf, Tongta Sae-Ong, Leibniz-HKI, Systembiologie und Bioinformatik). Das Protokoll enthält alle Schritte zur Vorverarbeitung der rohen *reads* aus der RNA-Sequenzierung bis zur Analyse von differentiell exprimierten Genen, einschließlich der Tabellen und Visualisierungen der Daten für Zwischen- und finale Ergebnisse. Für differentiell exprimierte Gene wurden folgende Grenzwerte festgelegt: $FDR < 1\%$ und $\log_2 FC > 1$ oder $\log_2 FC < -1$. Die Programme wurden mit voreingestellten Parametern genutzt und die entsprechenden Referenz-Genomannotationen der drei Stämme ATCC 25922 (GCF_00743255.1), KI683 (GCF_902505025.1) und RV308 (GCF_000952955.1) (Krempel *et al.*, 2014) für das Mapping verwendet. Für die Stämme *E. coli* ATCC 25922 und KI683 wurden drei Vergleiche (adhären Bakterien auf 2 und 7 nm-rauen Oberflächen und planktonisch) und für den Stamm RV308 zwei Vergleiche (adhären

Bakterien auf 2 nm-rauen Oberflächen und planktonisch) berechnet. Die Tabellen der Transkriptomsequenzierungsdaten befinden sich auf der CD (Tab. S1 – S3).

4.9 Genanreicherung GSEA

Das Hauptprinzip einer Genset-Anreicherungsanalyse (GSEA) besteht darin, in einer Reihe von Genen oder Proteinen einer *omics*-Analyse die biologische Funktion zu deduzieren und zu prüfen, inwiefern diese überpräsentiert sind. Für die Transkriptomanalysen wurde das webbasierte Programm GSEA-Pro v3 (<http://gseapro.molgenrug.nl/>) verwendet. Hierfür wurden die Genloci und korrespondierenden \log_2 FC getrennt in hoch- und herunterregulierte differentiell exprimierte Gene aus der Transkriptomanalyse herangezogen, das jeweilige RefSeq-Genom gewählt, als *Single list with values* und eingeschalteter Funktion *Auto detect threshold values* prozessiert. Da die Genome von *E. coli* KI683 und RV308 nicht in der Datenbank vorhanden waren, wurde der FACoP-Webserver (<http://facop.molgenrug.nl/>) genutzt, um eine entsprechende Genomvorlage zu erstellen. Die Tabellen der GSEA befinden sich auf der CD (Tab. S4 – S6).

C ERGEBNISSE

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Interaktion zwischen *E. coli*-Bakterien und Titanoberflächen mit Oberflächenstrukturen von $R_a = 2 - 16$ nm. Zellanhänge von Bakterien sind für die Initialadhäsion auf biotischen und abiotischen Oberflächen wichtig, da sie als Anker dienen und auf mechanische Strukturen reagieren können (Berne *et al.*, 2015; Gordon & Wang, 2019). Zellanhänge selbst weisen Durchmesser zwischen 2 nm im Fall von Curli (Craig, Pique, & Tainer, 2004), 5 – 8 nm für Typ 1, S- und P-Fimbrien (Olsén *et al.*, 1989) und 20 nm für Flagellen auf (Macnab, 2003). Somit könnten Oberflächenstrukturen im Maßstab von Zellanhängen eine mechanische Inkompatibilität zwischen den Oberflächenstrukturen und den Zellanhängen hervorrufen. Außerdem wurde eine vermehrte Adhäsion von Mikroorganismen auf Titanplättchen mit einer Rauigkeit von unter 2 nm festgestellt (Ivanova *et al.*, 2010, 2011; Webb *et al.*, 2013a), wohingegen für Titanplättchen mit einer Rauigkeit von über 16 nm eine geringere Adhäsion verzeichnet wurde (Singh *et al.*, 2013). Neben diesen Daten liegen derzeit kaum weitere Erkenntnisse über das bakterielle Adhäsionsverhalten auf Oberflächen mit einer Rauigkeit zwischen 2 und 16 nm vor. Daher sollte in dieser Arbeit die Adhäsion verschiedener *E. coli*-Stämme auf Oberflächenstrukturen mit einer Rauigkeit von 2 bis 16 nm bildanalytisch und durch genetische Analyse der *E. coli*-Stämme, insbesondere innerhalb der initialen Adhäsion, charakterisiert werden. Das nachfolgende Kapitel ist in sechs Teile gegliedert. Zuerst wird der *in vitro*-Adhäsionsassay und dessen Parameter beschrieben, mit dessen Hilfe geeignete *E. coli*-Kandidaten ermittelt wurden. Im zweiten Teil werden sowohl die verschiedenen Bindungstypen, als auch die verschiedenen Ausprägungen von Zellanhängen der verwendeten *E. coli*-Stämme vorgestellt. Diese *E. coli*-Stämme sind ideale Kandidaten, um die Wirksamkeit von Nanostrukturen nuancierter zu überprüfen. Der dritte Teil behandelt die quantitative Bildanalyse der drei ausgewählten *E. coli*-Stämme auf den vier verschiedenen nanorauen Titanoberflächen. Der vierte Teil beinhaltet vergleichende Genomanalysen der *E. coli*-Stämme, während der fünfte Teil die Ergebnisse der vergleichenden Transkriptomanalysen zwischen sessilen und planktonischen *E. coli*-Bakterien beschreibt. Der sechste und letzte Teil behandelt Einzelgendeletionen und -überexpressionen in den *E. coli*-Stämmen und der Einfluss der analysierten Gene auf die Adhäsion und Biofilmbildung.

1 Etablierung eines *in vitro*-Adhäsionsassays

Bis *dato* wurden einige *in vitro*-Modellsysteme für die Testung mikrobieller Adhäsion beschrieben. In dieser Arbeit werden, wie in den meisten Studien, Multiwellplatten genutzt, um die zu testenden Titanplättchen mit verschiedenen Oberflächenrauigkeiten mit ausgewählten Mikroorganismen

zusammen zu bringen. Neben den Mikroorganismen und dem zu testenden Material, sind sowohl die Methode zur Detektion adhärerter Bakterien auf den Oberflächen, als auch Umgebungsfaktoren, wie das Medium und die Inkubationszeit, wichtige Parameter, welche die Interaktion zwischen Testorganismus und Material beeinflussen und hier vor Testbeginn eruiert wurden. Um eine Anlagerung von Mediumproteinen zu vermeiden, die zu einer Maskierung der Rauigkeiten führen könnten, und den physischen Kontakt zwischen Bakterien und der Oberfläche zu gewährleisten, wurde als proteinfreier Puffer die Laktat-gepufferte simulierte Körperflüssigkeit (lac-SBF) gewählt. Dieser Puffer imitiert die Ionenkonzentrationen im Blut (Pasinli *et al.*, 2010).

1.1 Genomische Expression von GFP zur erleichterten Detektion von *E. coli* in der Bildanalyse

Zur Quantifizierung der adhärenierten Bakterien auf den Oberflächen durch eine Bildanalyse ist ein geeignetes Reportersystem nötig. Dafür wurden beispielhaft in *E. coli* RV308 Fluoreszenzproteine exprimiert, wobei das für das Fluorophor kodierende Gen unter einem starken konstitutiven Promoter genomisch integriert ist. Hierfür wurde die Integrationskassette mit der Gibson assembly® Klonierungsstrategie (Gibson *et al.*, 2009) generiert (Abb. 3).

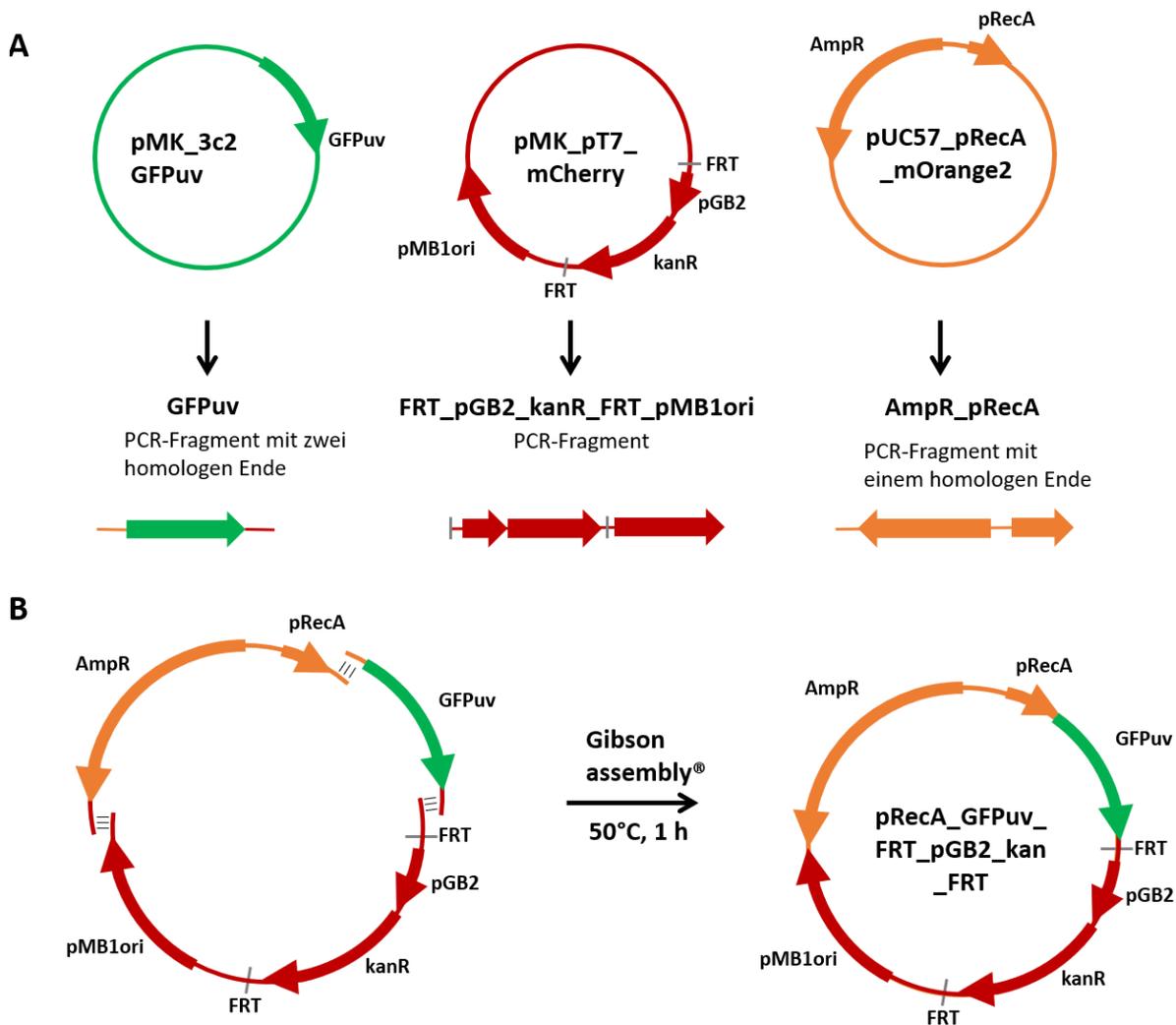


Abb. 3: Klonierungsstrategie (Gibson assembly®) zur Herstellung von Plasmiden aus DNA-Fragmenten. **Assemblierung des Plasmids pRecA_GFPuv_FRT_pGB2_kan_FRT.** A) DNA-Fragmente wurden mittels PCR und überlappenden DNA-Sequenzen amplifiziert. B) Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden gemischt und für 1 h bei 50°C inkubiert. 2 µl der Reaktion wurden für die Transformation in *E. coli* NEB genutzt. Das Plasmid wurde nach der Transformation von *E. coli* von einer das Plasmid enthaltenden Kolonie isoliert, aufgereinigt und sequenziert.

Das Plasmid pRecA_GFPuv_RT_pGB2_kanR_FRT (Projektarbeit 2017, Carl Telle, Leibniz-HKI) diente als Vorlage für die Amplifizierung der Kassette für die genomische Integration (Abb. 4A). Diese setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: dem starken, konstitutiven Promoter des *recA* Gens (Oxgene, 2016), dem Fluoreszenzprotein GFPuv, dem Promoter des Granzym B-Gens pGB2 und dem

Kanamycin-Resistenzgen *kanR* mit flankierenden FLP *recognition target* (FRT)-Sequenzen. Die FRT-Sequenzen ermöglichten die Entfernung des Resistenzmarkergens nach Selektion. Als Zielsequenz wurde das Gen *manX*, aus dem Mannose-Transport kodierenden Locus *manXYZ* ausgewählt, da es wahrscheinlich auch nach Disruption die bakterielle Adhäsion nicht beeinflusst. Die genomische Integration erfolgte über das phagenbasierte Red/ET-Rekombinationssystem (Zhang *et al.*, 1998). Die Verifizierung des veränderten Genotyps nach Integration der Kasette in das Genom von *E. coli* RV308 erfolgte sowohl mit Primern, die die flankierenden Sequenzen der Integrationskasette erkennen (oGB1/oGB4), als auch mit solchen, die innerhalb der Integrationskasette binden (oIN3, oGB3).

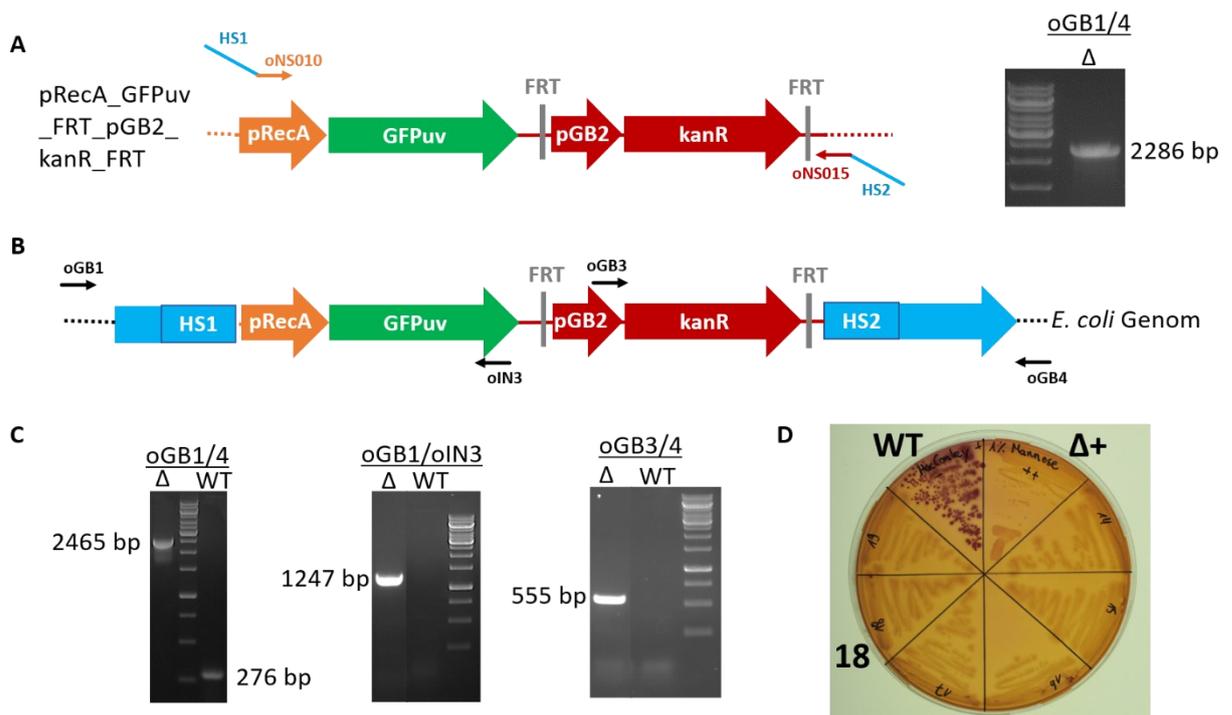


Abb. 4: Deletionsstrategie mittels Red/ET-vermittelter Rekombination zur genomischen Integration eines Fluoreszenzprotein-kodierenden Gens. A) PCR-Amplifizierung einer linearen DNA-Integrationskasette mit homologen (HS) Sequenzen zum Zielgen *manX*. HS1 umspannt die Basenpaare 69 – 119 bp und HS2 119 – 169 bp nach dem Startcodon. B) Durch den Red/ET-Rekombinationsprozess wird das Zielgen (blau) durch das Kanamycin-Resistenzgen (*kanR*) unter der Kontrolle des Granzym B-Promoters (*pGB2*) und zwei flankierenden FLP *recognition target* (FRT) ersetzt. C) Die Verifizierung der genomischen Integration erfolgt durch drei Primerpaare, die zu drei unterschiedlich großen PCR-Fragmenten führen (gezeigt auf den Bildern der Agarosegele). D) Der neue Stamm *E. coli* RV308 Δ *manX*::*RecA_GFPuv_FRT_pGB2_kan_FRT* Klon Nr. 18 baut keine Mannose ab und bleibt wie die Positivkontrolle *E. coli* HS993 Δ *manX*::*FRT_pGB2_kan_FRT* (Δ +) weiß (MacConkey-Agar mit 1% (m/V) Mannose). Der Abbau von Mannose durch den Wildtyp ist durch rot gefärbte Kolonien angezeigt. WT = Wildtyp. Δ = Deletion.

Die Funktionalität des durch DNA-Sequenzierung (oNS012/oNS016) nachgewiesenen, korrekt integrierten Fluoreszenzproteins GFPuv im Klon *E. coli* RV308 Δ *manX*::*RecA_GFPuv_FRT_pGB2_kan_FRT* Nr. 18 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie geprüft. Es konnte nur ein schwaches Fluoreszenzsignal festgestellt werden, das mit fortschreitender Adhäsion auf den Oberflächen weiter nachließ (Daten nicht gezeigt). Eine qRT-PCR-Analyse bestätigte, dass die genomische Einzelkopie von GFPuv fünffach geringer exprimiert wurde als plasmidal exprimiertes GFPuv mit *pRecA_GFPuv_FRT_pGB2_kanR_FRT* (Abb. 5). Diese sehr geringe Produktion des Grün-

Fluoreszierenden Proteins GFPuv sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase erforderte die nachträgliche Umstellung der Reportmethode auf eine Anfärbemethode der adhärenen Bakterien mit dem blauen Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33528 (s. Abschnitt B1.6.3).

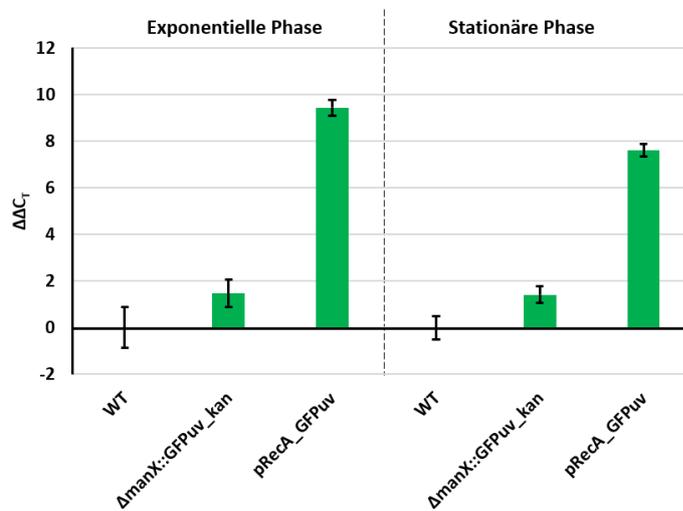


Abb. 5: qRT-PCR zum Nachweis des Fluoreszenzproteins (GFPuv)-kodierenden Gens von verschiedenen Genotypen von *E. coli* RV308.

1.2 Initiale Adhäsion und Inokulationszahlen

Im nächsten Schritt wurde die Inkubationsdauer, die noch als initiale Adhäsion gilt, und die Zahl der Bakterien, mit der die Oberflächen in Kontakt kommen, eruiert. Da die Oberflächen für eine prophylaktische Wirksamkeit gegen bakterielle Kontaminationen untersucht wurden, wurde die Inokulationszahl auf 20 000 Bakterien pro Oberfläche (1,76 cm²) limitiert. Die Studienlage über initial adhärenen Bakterien bei Implantat-assoziierten Infektionen ist rar, jedoch konnten 1 cfu pro cm² auf Oberflächen in einem Operationssaal nachgewiesen werden (Verkkala *et al.*, 1998) und 270 Bakterien pro cm² führten zu einer Kontaminierung einer Wunde (Fitzgerald, 1979). 1000 cfu pro cm² wurden zur Evaluierung von antimikrobiellen Oberflächen empfohlen (Sjollema *et al.*, 2018). Dieser Empfehlung konnte aufgrund des hier untersuchten, gering bindenden *E. coli*-Stammes K1683 jedoch nicht umgesetzt werden. Deshalb wurden 10 000 Bakterien pro cm² veranschlagt. Ein fester Zeitpunkt, zu welchem Bakterien auf einer Oberfläche adhären, existiert nicht. Es handelt sich um einen Zeitrahmen, der je nach Spezies variiert. Spätere Analysen zeigten, dass 1 h Inkubationszeit ausreichte, um Initialadhäsionen, also einzeln adhärenen Bakterien, zu beobachten (Abb. 7B).

1.3 *In vitro*-Adhäsionsassay

Nachdem die essentiellen Parameter für den *in vitro*-Adhäsionsassay eruiert und validiert worden waren, wurde dieser als Basis für alle kommenden Anwendungen wie Bildanalyse, REM, FIB-SEM, RNA-Isolierung und qRT-PCR verwendet (Abb. 6).

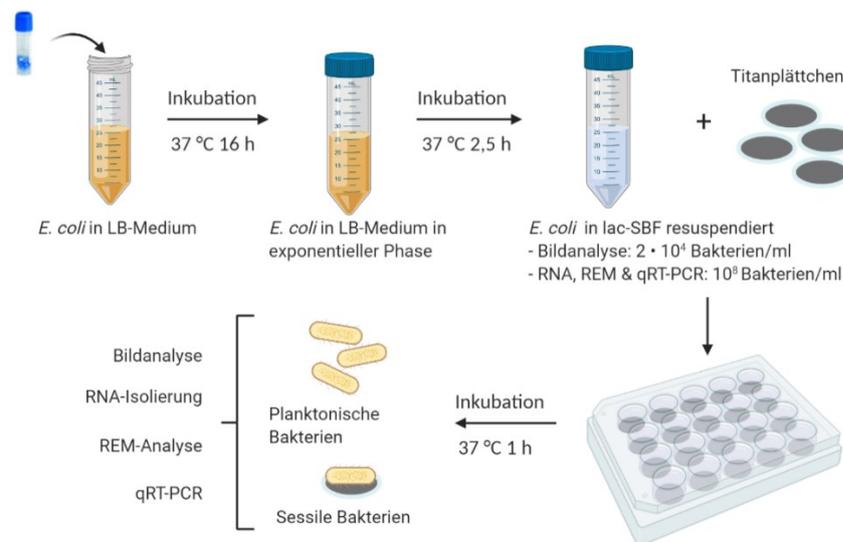


Abb. 6: Illustriertes Protokoll des *in vitro*-Adhäsionsassays. *E. coli*-Stämme wurden aus Kryokonserven über Nacht reaktiviert und inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und für 2,5 h bis zur $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend für eine RNA-Isolierung, eine REM-Analyse und eine qRT-PCR auf 10^8 Bakterien/ml und für eine Bildanalyse auf $2 \cdot 10^4$ Bakterien/ml verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Proben je nach Anwendung weiterverarbeitet. Erstellt mit BioRender.com.

Eine Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 2,5 h) inkubiert. Je nach Anwendung wurde die Bakteriensuspension nochmals mit entsprechendem Medium lac-SBF oder LB verdünnt. Generell wurden jeweils 1 ml der verdünnten Bakteriensuspension auf die Oberflächen, die sich in 24-Multiwellplatten befanden, aufgebracht und für 1 h inkubiert. Danach wurden die Oberflächen, wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, für die weiteren Anwendungen prozessiert. Technische Details sind dem Abschnitt B1.6.3 zu entnehmen.

2 Untersuchung des Bindungsverhaltens der *E. coli*-Stämme

Nach der erfolgreichen Etablierung eines *in vitro*-Adhäsionsassays wurde das Adhäsionsverhalten von *E. coli*-Bakterien auf verschiedenen nanorauen Oberflächen getestet. Um ein breites Spektrum an Bindungstypen der Spezies *E. coli* zu testen, wurden neben dem K-12 Stamm RV308 auch klinische Isolate untersucht. *E. coli*-Stämme variieren geno- und phänotypisch so stark, dass z. B. nur 1000 bis 2200 Gene zum Kerngenom zählen, wohingegen das Pangenom 13 000 bis 16 000 Gene umfasst (Rasko *et al.*, 2008; Lukjancenko *et al.*, 2010). Diese enorme Diversität verleiht den Bakterien möglicherweise individuelle Adhäsionsmechanismen.

2.1 Klinische *E. coli*-Isolate als Kandidaten

Es wurden *E. coli*-Stämme ausgewählt, die von Patienten mit nachgewiesener (Uro-)Sepsis isoliert worden waren, da solche Stämme am wahrscheinlichsten in Implantat-assoziierten Infektionen auftreten (Crémet *et al.*, 2012). Für eine erste Charakterisierung des Adhäsionsverhalten wurden die

E. coli-Kandidaten auf 2 nm-rauen Titanoberflächen mittels Bildanalyse ausgezählt (Abb. 7A) und mittels REM visualisiert (Abb. 7B).

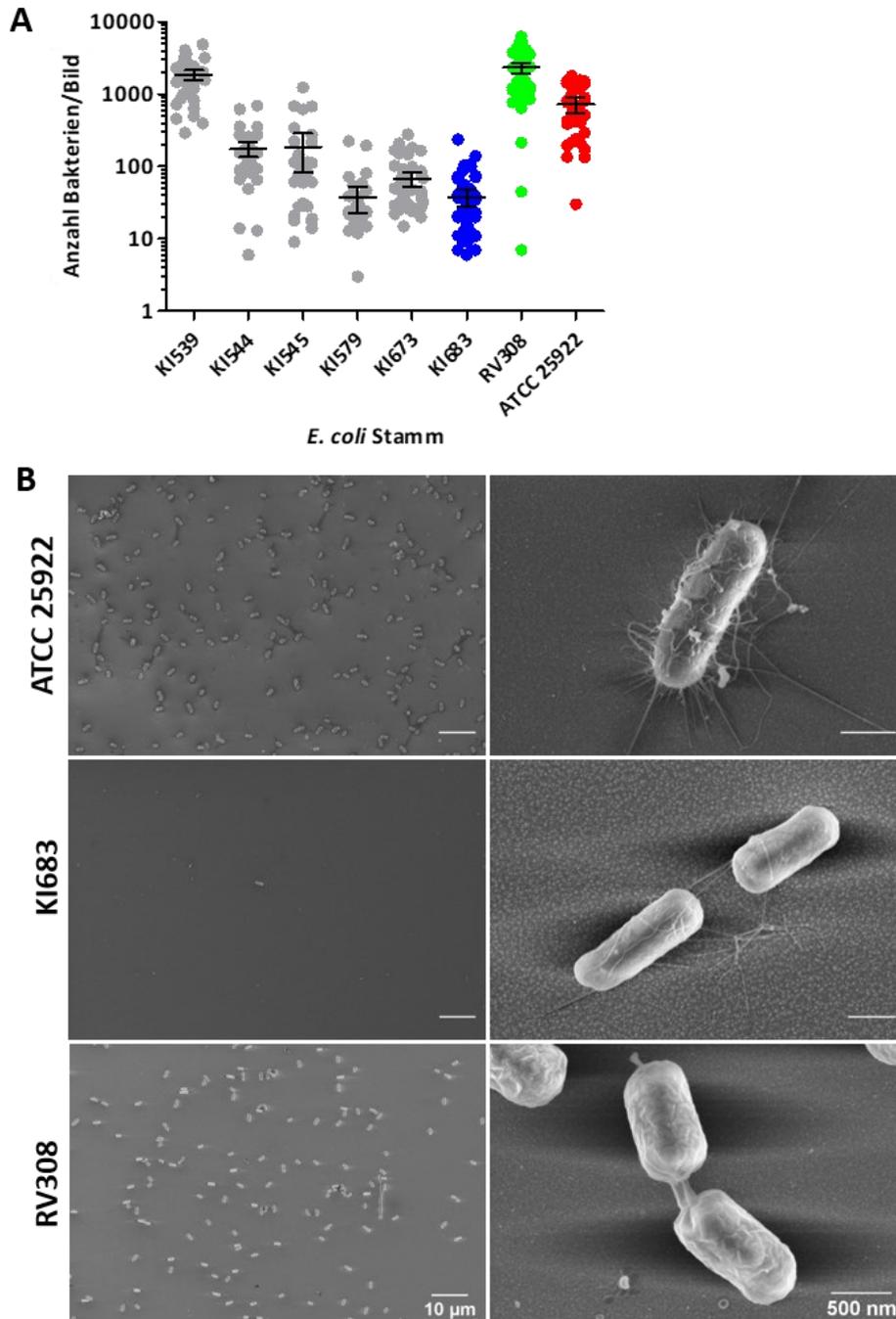


Abb. 7: Bildanalyse zur Vorauswahl von *E. coli*-Stämmen. A) Bildanalyse verschiedener *E. coli* spp. auf 2 nm-rauen Titanoberflächen. B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der adhärten *E. coli*-Bakterien ATCC 25922, KI683 und RV308 auf 2 nm rauen Titanoberflächen nach 1 h Inkubation in LB-Medium.

Die fünf klinischen *E. coli*-Isolate KI544, KI545, KI579, KI673 und KI683 zeichneten sich durch eine geringe Anhaftung aus, während der Stamm KI539 und der Laborstamm RV308 in hohen Zahlen auf den Oberflächen adhärten. Um die Testgruppe um ein Isolat mit einem hohen Bindungspotential zu ergänzen, wurde der *E. coli*-Stamm ATCC 25922 hinzugezogen. Dieser wird in der Literatur als starker

Biofilmbilder beschrieben (Naves *et al.*, 2008; Crémet *et al.*, 2012) und war in den publizierten *in vitro*-Adhäsionsassays als stark anhaftend charakterisiert worden. Von den Stämmen KI539, KI544, KI545, KI579, KI673 und KI683 wurde nur der Stamm KI683 ausgewählt, der hier stellvertretend für ein geringes Bindungspotential steht. Hintergrund war, dass es sich bei den Stämmen KI539, KI544, KI545 und KI579 um multiresistente, Gram-negative (3MRGN, gegen drei Antibiotikagruppen unempfindlich) *E. coli*-Stämme, oder solche, die ein erweitertes Spektrum an Betalaktamasen besitzen (ESBL), handelt. Zudem kodieren die Stämme KI683 und KI673 mehr Virulenzfaktoren als die anderen Stämme (persönliche Korrespondenz mit Jürgen Bohnert, Uniklinikum Jena). Außerdem wurde *E. coli* KI683 mit demselben Serotyp O6:H1 wie *E. coli* ATCC 25922 klassifiziert (persönliche Korrespondenz mit Jürgen Bohnert, Uniklinikum Jena). Dies zeigt eine nähere Verwandtschaft an. Schlussendlich wurden für weitere Untersuchungen die zwei klinischen *E. coli*-Isolate ATCC 25922 und KI683 und als K-12 Referenzstamm *E. coli* RV308 gewählt. Da die Nanostrukturen der Titanoberflächen speziell auf die Größe von Zellanhängen wie Curli, Fimbrien und Flagellen ausgerichtet wurden, wurde das Vorhandensein solcher Zellanhänge mittels REM-Aufnahmen genauer untersucht (Abb. 7B). Während der Stamm ATCC 25922 zahlreiche Zellanhänge aufweist, besitzt der Stamm KI683 nur einige wenige und der Stamm RV308 scheinbar gar keine Zellanhänge. Die Oberflächen-gebundenen Bakterien ATCC 25922 (Abb. 7B, links) liegen zwar einzeln vor, sind aber durch die zum Teil 10 µm langen Zellanhänge miteinander verbunden. Anhaftungen von *E. coli* KI683 sind sehr selten und bestätigen die Klassifizierung als gering bindendes Bakterium (Abb. 7B, Mitte). An den wenigen adhärerten Bakterien von *E. coli* KI683 wurden Zellanhänge gefunden, die anscheinend als Anker und Verbindung zu anderen Bakterien dienen (Abb. 7B, Mitte). Dahingegen befanden sich an den Bakterien von *E. coli* RV308 (Abb. 7B, rechts) keinerlei Zellanhänge, dafür aber eine minimale Schleimschicht an der Auflagefläche des Bakteriums. Die REM-Bilder zeigen ebenfalls, dass die Bakterien aller drei Stämme eine normale, stäbchenförmige Morphologie besitzen und der Länge nach flach auf den Oberflächen adhäreren. Dabei war noch zu beobachten, dass die Zellen der beiden klinischen Isolate kleiner und dünner sind als die des Laborstamms RV308. Interessanterweise bildete der Stamm RV308 bis zu diesem Zeitpunkt keinerlei Zellanhänge aus, adhärerte aber trotzdem moderat bis ähnlich stark wie *E. coli* ATCC 25922.

2.2 Errechnung der Probenanzahl zur Bestimmung eines antiadhäsiven Effekts

Nachdem eine Auswahl an *E. coli*-Stämmen mit verschiedenen Bindungstypen gefunden worden war, wurden diese mit den Titanoberflächen konfrontiert. Zunächst wurde eine Pilotstudie des *in vitro*-Adhäsionsassays mit einer kleinen Stichprobe ($n = 3$, $N = 2$) durchgeführt, um die Effektstärke zu bestimmen (Stefanie Dietrich, Carl-Magnus Svensson, Leibniz-HKI, Angewandte System-biologie). Die

Effektstärke bestimmt, wie viele Oberflächen verschiedener Rauigkeiten getestet werden müssen, um von einer echten, die Adhäsion reduzierende oder steigernde Wirkung der Rauigkeit auszugehen (Sullivan & Feinn, 2012). Die Effektstärken-Analyse ergab, dass 22 Stichproben optimal und sechs Stichproben ausreichend wären, um von einem echten Wirksamkeitseffekt der antiadhäsiven

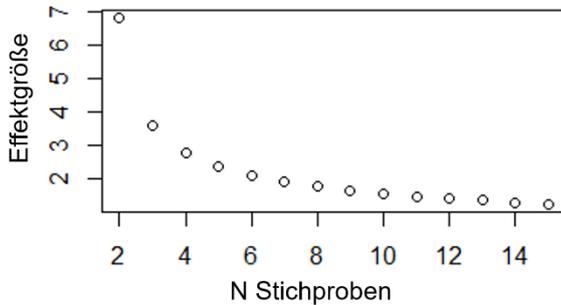


Abb. 8: Effektstärken-Analyse nach Cohens d . Die Effektstärke gibt vor, wie viele Proben für die Bildanalyse genutzt werden sollten um das Ausmaß der Wirkung des Faktors Nanorauigkeit zu bestimmen.

Eigenschaften zu auszugehen (Abb. 8). Bei sechs Stichproben muss der Mittelwertunterschied zwischen zwei Nanorauigkeiten zwei Standardabweichungen betragen, bei 22 Stichproben nur eine halbe Standardabweichung. Da 22 Oberflächen pro Rauigkeit und Stamm (Gruppe) pro Versuch nicht verfügbar waren, wurden sechs Oberflächen pro Gruppe herangezogen.

3 Bildanalysen des Adhäsionsverhaltens von *E. coli*-Bakterien auf nanorauen Titanoberflächen

Nachdem der *in vitro*-Adhäsionsassay etabliert und die drei zu untersuchenden *E. coli*-Stämme ausgewählt worden waren, wurde das Adhäsionsverhalten von *E. coli*-Bakterien auf nanorauen Titanoberflächen untersucht. Für diese Auswertung wurden drei Methoden der Bildanalyse angewendet, die in diesem Kapitel vorgestellt werden.

3.1 Quantitative Bildanalyse

Das Bindeverhalten der ausgewählten Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 auf 2 bis 16 nm-rauen Titanoberflächen wurde getestet und die Anzahl Oberflächen-gebundener Bakterien pro Rauigkeitswert mittels Bildanalyse quantifiziert (Abb. 9, Abb. A1).

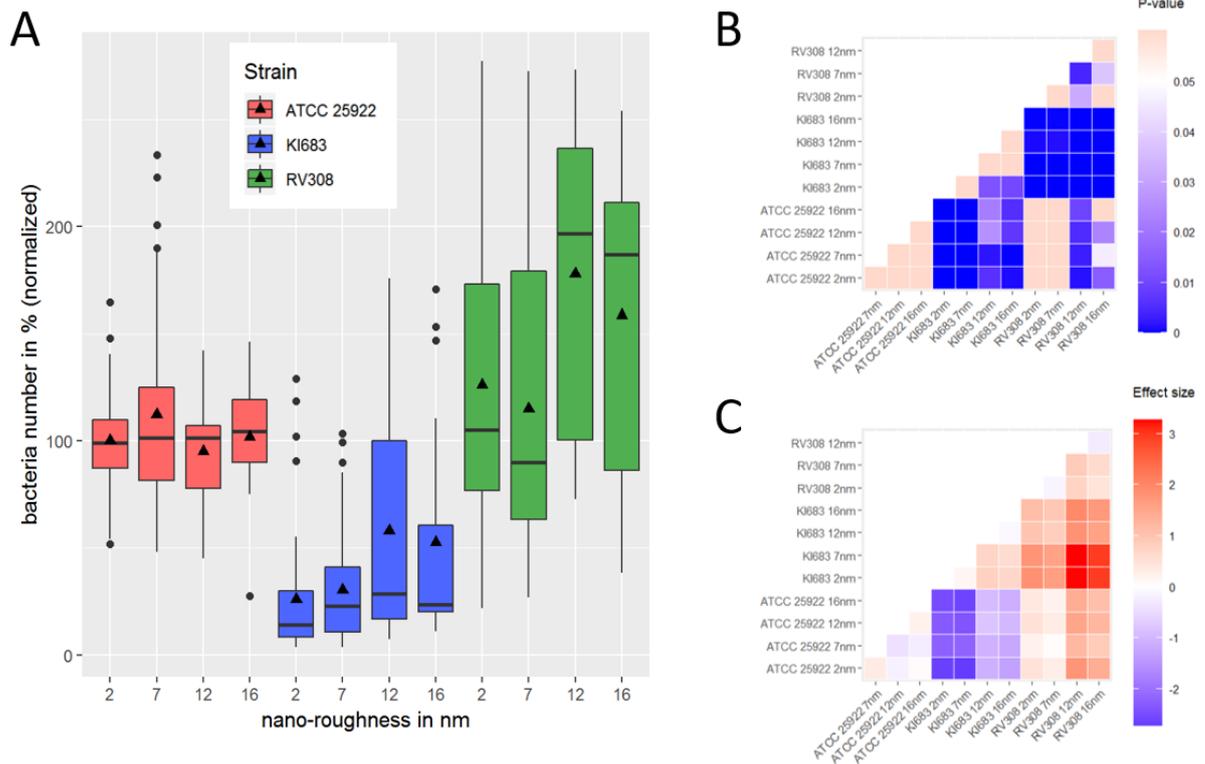


Abb. 9: Bildanalyse der adhärerten *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 auf 2, 7, 12 und 16 nm-rauen Titanoberflächen. Kreise sind Ausreißer und Dreiecke sind Mittelwerte. A) Bakterien wurden pro nanoraue Titanoberfläche ($n = 6$ pro Gruppe, $N =$ für 2 und 7 nm; $n = 6$, $N = 3$ für 12 und 16 nm) quantifiziert. Die Werte sind auf ATCC 25922 normalisiert. B) p-Wert zwischen den Gruppen nach Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur. C) Effektgrößen zwischen den Gruppen mittels Hedges' g. Bildanalyse in Zusammenarbeit mit Bianca Hoffmann (Leibniz-HKI, Angewandte Systembiologie).

E. coli ATCC 25922 (rot) und RV308 (grün) adhärten stark, während *E. coli* KI683 (blau) sehr schwach band (Abb. 9A). Betrachtet man die Adhäsion des Stammes ATCC 25922 auf den vier Rauigkeiten, so ist kein Einfluss der Rauigkeit auf die Adhäsion zu erkennen. Es lagen weder eine statistische Signifikanz (Abb. 9B), noch ein relevanter Effekt (Abb. 9C) vor. Fast dasselbe Muster zeigt sich bei Stamm KI683 (Abb. 9A). Zwar zeigten die p-Werte beim Vergleich der Rauigkeiten von 2 zu 12 und 16 nm unter 0,05 an (Abb. 9B), jedoch waren die Effekte genauso gering wie bei dem statistisch nicht-signifikanten Vergleich der Rauigkeiten von 2 zu 7 nm und wurden somit als irrelevant betrachtet (Abb. 9C). Der Stamm RV308 variierte stark von Versuch zu Versuch (Abb. A1), woraus sich die breite Streuung für alle vier Rauigkeiten ergab. Es macht den Anschein, dass die niedrigen Rauigkeiten von 2 und 7 nm eine verminderte Adhäsion vermitteln. Besonders sticht hier der Vergleich der Rauigkeiten von 7 zu 12 nm hervor. Allerdings ist hier wieder zu sehen, dass sich die Effektstärke nicht von denen der anderen Vergleiche unterscheidet (Abb. 9C), z. B. der Rauigkeiten von 2 zu 12 nm. Daher wird auch der Laborstamm RV308 nicht durch eine veränderte Topographie quantitativ beeinflusst.

Insgesamt konnte für keinen der Stämme, der durch die Power Analyse ermittelte, notwendige Unterschied von einer halben Standardabweichung nachgewiesen werden. Außerdem variiert der Trend in den Einzelversuchen merklich und auch die Werte der sechs Proben innerhalb einer Gruppe

schwanken um den Faktor 2 (Abb. A1). Es sind statistisch schwache Effekte erkennbar, die sich im biologischen Kontext wahrscheinlich jedoch nicht bemerkbar machen würden.

3.2 Qualitative Bildanalyse

Parallel zur Quantifizierung wurden mittels REM die adhärenierten Bakterien auf den vier Nanostrukturen visualisiert (Abb. 10).

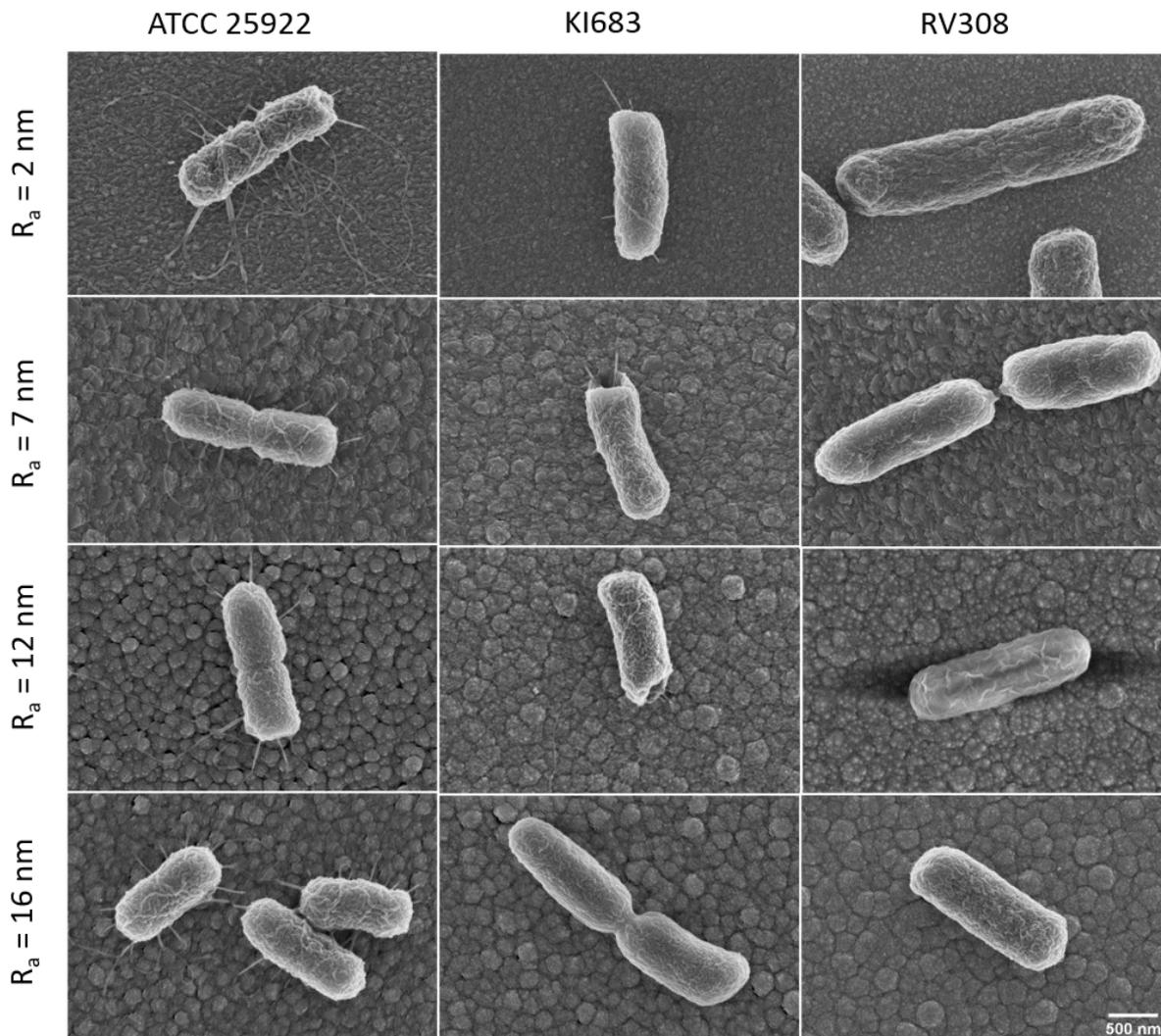


Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der adhärenierten *E. coli*-Bakterien ATCC 25922, KI683 und RV308 auf 2 bis 16 nm-rauen Titanoberflächen nach 1 h Inkubationszeit in lac-SBF-Puffer. REM-Bilder in Zusammenarbeit mit Heidrun Garlipp (OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena) erstellt.

Die adhärenierten *E. coli*-Bakterien ATCC 25922, KI683 und RV308 auf den Oberflächen mit den Rauigkeiten von 2, 7, 12 und 16 nm weisen dieselbe Morphologie auf. Die Ausprägung der vielen, für den Stamm ATCC 25922 charakteristischen Zellanhänge änderte sich nicht mit steigender Rauigkeit. Dasselbe gilt für das Bakterium *E. coli* KI683, das durch die wenigen Zellanhänge gekennzeichnet ist, und für *E. coli* RV 308, das keine Zellanhänge aufweist. Insgesamt induzierte keine der vier Nanostrukturen eine morphologische Änderung in den drei *E. coli*-Stämmen. Eine mechanische

Inkompatibilität zwischen den Nanostrukturen und den Zellanhängen kann damit ausgeschlossen werden.

In vorherigen Studien (Lüdecke *et al.*, 2016; Dauben *et al.*, 2020) wurde die initiale Adhäsion auf nanostrukturierten Oberflächen mit der Anzahl der Peakdichte *via* Nanokontaktpunkte in Verbindung gebracht. Nanokontaktpunkte würden eine geringere Auflagefläche der Bakterien verursachen und somit zu geringeren Adhäsionskräften führen. Querschnittssektionierungen mittels fokussiertem Ionenstrahl (engl. *focused ion beam*, FIB) konnten jedoch nicht bestätigen, inwiefern die Zelloberfläche der Bakterien mit der Titanoberfläche interagiert (*E. coli* ATCC 25922 repräsentativ für alle drei Stämme, Abb. 11).

ATCC 25922

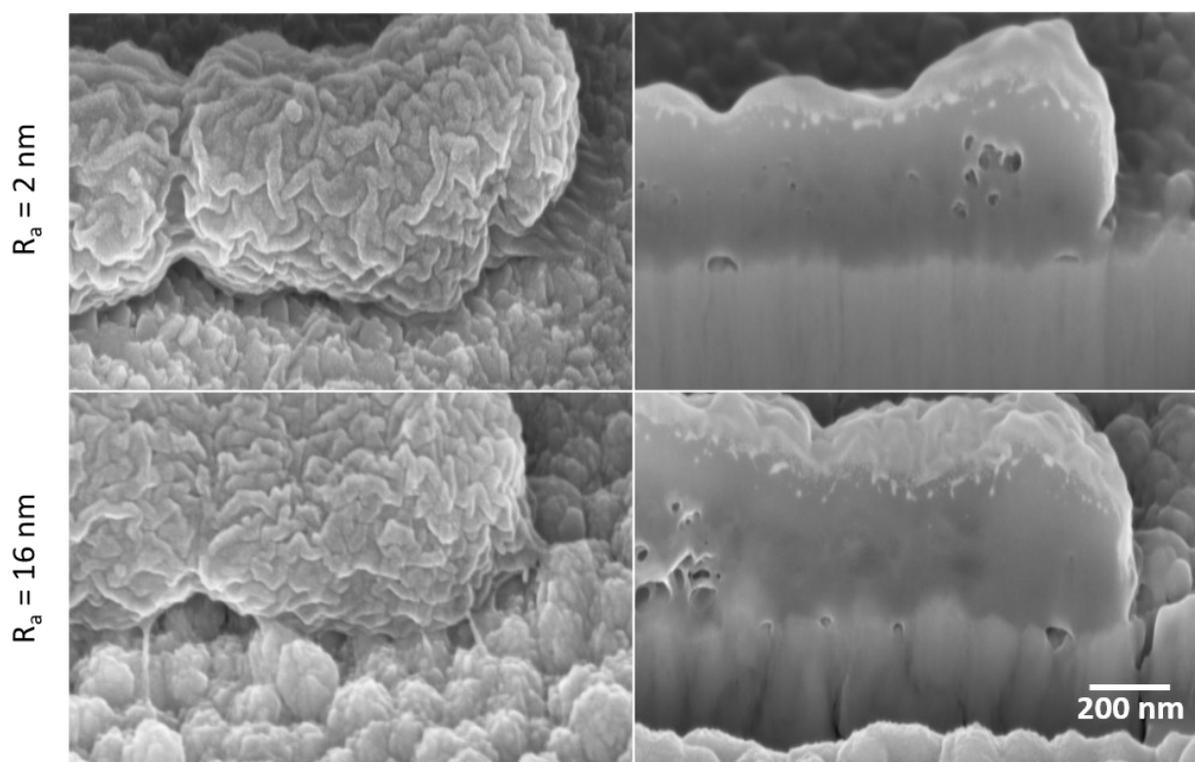


Abb. 11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* ATCC 25922 auf 2 und 16 nm-rauen Titanoberflächen nach 1 h Inkubation. Querschnitte der Zellen wurden mit einem fokussierten Ionenstrahl erzeugt. REM-FIB-Sektionierung und -Bilder in Zusammenarbeit mit Ralph Wagner (OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena).

Der Materialkontrast von Titan (hell) und Bakterium (dunkel) ist in den Querschnitten deutlich zu erkennen. Unabhängig von der Rauigkeit ist eine, sich weitgehend an die Titanoberflächen anpassende Zelloberfläche zu erkennen. Es sind nur wenige Hohlräume an der Grenzfläche erkennbar. Nanokontaktpunkte sind nicht ersichtlich.

Zusammengefasst haben die Nanorauigkeiten von 2 bis 16 nm in diesem Testsystem keinen Einfluss auf die Stärke der Adhäsion der drei untersuchten *E. coli*-Stämme. Unerwartet und interessant ist jedoch, dass der Laborstamm ohne Zellanhänge zahlreicher an die Plättchen band als der starkbindende Stamm ATCC 25922. Die Resultate wiesen deutlich auf ein Stamm-spezifisches, von

Nanostrukturen des Größenbereichs von 2 bis 16 nm unabhängiges Adhäsionsgeschehen hin. Als Konsequenz daraus stellt sich die Frage, welche Eigenschaften einem Bakterium ein hohes oder niedriges Anhaftungspotential an Oberflächen verleihen? Um Antworten auf diese Frage zu erhalten, wurden Genom- und Transkriptomanalysen durchgeführt.

4 Genomanalyse

Ein Genomvergleich deckt den Verwandtschaftsgrad und die Anzahl funktioneller Gene zwischen den drei *E. coli*-Stämmen ATCC 25922, KI683 und RV3078. Ein annotiertes Genom dient zudem als Referenz für Transkriptomanalysen. Das Genom des klinischen Isolats KI683 wurde im Gegensatz zu den anderen zwei bekannten Stämmen ATCC 25922 und RV308 noch nicht sequenziert. Daher wurde als Teil dieser Arbeit eine *de novo*-Sequenz des Genoms von *E. coli* KI683 erstellt und diese mit denjenigen der anderen Stämme verglichen.

4.1 *de novo*-Genomsequenzierung von *E. coli* KI683

Die *de novo*-Genomsequenzierung von *E. coli* KI683 (Stefani *et al.*, 2020) wurde mittels Einzel-Molekül-Echtzeit (SMRT)-Sequenzierung (Pacific Bioscience, PacBio) durchgeführt. Die PacBio-Technik generiert DNA-Abschnitte (engl. *reads*) von 10 bis 15 kb womit auch repetitive und komplexe Regionen akkurat assembliert werden können (Eid *et al.*, 2009). Voraussetzung dafür ist, dass die zu sequenzierende, genomische DNA aus langen Fragmenten besteht, wie für die, aus sieben 300 µl *E. coli* KI683-Bakterienkulturen isolierte DNA gezeigt (Abb. 12).

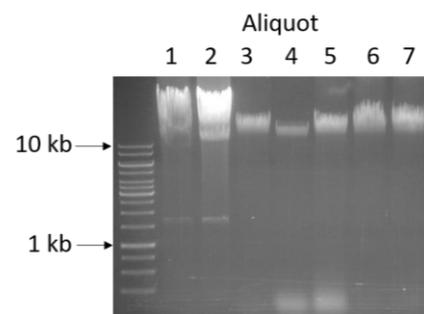


Abb. 12: Isolierte genomische DNA von sieben *E. coli* KI683-Kulturen.

Für die Sequenzierung wurden die fünf DNA-Aliquote 1, 2, 3, 6 und 7 ausgewählt, die zusammen 14,144 µg DNA beinhalten. Bei einer Genomsequenzierung nach PacBio werden die langen DNA-Abschnitte anhand überlappender Nukleotidsequenzen miteinander verbunden (engl. *assembly*) (Trapnell *et al.*, 2010). Diese assemblierten DNA-Fragmente werden weiter zu längeren DNA-Abschnitten (engl. *contiguous*; Contig) verknüpft (Dark, 2013). Diesen Sequenzen werden wiederum Funktionen mittels Genomannotation zugeordnet. Die Daten der Genomsequenzierung von *E. coli* KI683 sind in nachfolgender Tabelle hinterlegt (Tab. 14).

Tab. 14: *De novo*-Genomsequenzierung von *E. coli* KI683 mittels PacBio.

Metrik	Wert
Vor Assemblierung	
Anzahl an <i>reads</i>	747 843
Gesamtlänge aller <i>reads</i>	9 670 299 538 bp
Mittelwert der <i>read</i> Länge	12 931 bp
Max. <i>read</i> Länge	70 688 bp
Nach Assemblierung	
Contig 1	5 110 765 bp
Contig 2	114 238 bp (zirk.)
Contig 3	18 712 bp
Abdeckung	1 457x
Gesamtgröße des Genoms	5 243 715 bp
Nach Annotation	
GC-Gehalt	51%
Gene	5143
Kodierende DNA-Sequenzen (CDS)	4834
tRNAs	91
Transfer-messenger RNA (tmRNA)	1

Es blieben drei Contigs übrig, die nicht assembliert werden konnten. Contig 1 ist die chromosomale DNA von *E. coli* KI683. Die zwei kleineren Contigs - besonders das zirkularisierte - wiesen auf extrachromosomale DNA hin. Eine *in silico*-Suche von Plasmiden („plasmidfinder“, (Carattoli *et al.*, 2014)) detektierte innerhalb von Contig 2 mit 96,63 bis 99,61% Übereinstimmung ein IncFIB/FII/Col156-Plasmid, das dem Plasmid pUTI89 ähnlich ist. Eine BLASTn-Analyse ergab, dass Contig 2 zu 99,94% dem 114 230 bp dem großen pUTI89 aus dem uropathogenen *E. coli*-Stamm UTI89 (Chen *et al.*, 2006) und zu 99,93% dem 114 231 bp großen pRS218 aus dem neonatalen Meningitisverursachenden *E. coli*-Stamm RS218 (Wijetunge *et al.*, 2014) ähnlich ist. Die 106 offenen Leserahmen kodieren für Virulenzfaktoren, Fitness-assoziierte Gene und über die Hälfte davon für unbekannte oder hypothetische Proteine. Es sind keine Antibiotikaresistenzen enthalten (Wijetunge *et al.*, 2014). Innerhalb von Contig 3 wurden keine Ähnlichkeiten zu anderen Replikationsursprüngen von Plasmiden gefunden. Eine Suche nach konservierten Domänen (engl. *conserved domains*, BLAST *CD-search*, (Marchler-Bauer *et al.*, 2017)) ergab 34 CDs, die hauptsächlich dem Zweikomponentensystem *tor* zuzuordnen sind. Außerdem fand sich bei einer BLASTn-Analyse Contig 3 zu 68% mit 52 Fehlpaaren in Contig 1. Daher kann man davon ausgehen, dass es sich bei Contig 3 um restliche chromosomale DNA handelt, die aufgrund der komplexen Genomstruktur nicht zugeordnet werden konnte.

4.2 Vergleichende Genomanalyse

Durch die bekannte Sequenz von *E. coli* KI683 wurden Genomvergleiche mit den anderen beiden Stämmen ATCC 25922 und RV308 möglich (Tab. 15), die Aufschluss über den Verwandtschaftsgrad geben. Die klinischen Isolate ATCC 25922 und KI683 besitzen beide ein 5,2 Mb großes Genom, während das vom Laborstamm RV308 nur 4,5 Mb groß ist (Tab. 15). Eine paarweise Alignierung zeigte eine 97%ige Übereinstimmung, also einen hohen Verwandtschaftsgrad der beiden klinischen Isolate ATCC 25922 und KI683. Im Vergleich mit RV308 sank der übereinstimmende Anteil auf 77%. Weitere Daten sind in Tab. 15 hinterlegt.

Tab. 15: Genomvergleich von *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308.

	ATCC 25922	KI683	RV308
Genomgröße (bp)	5 203 440	5 245 715	4 585 620
Anzahl Gene	4989	5143	4403
Anzahl CDS	4728	4834	4148
GC-Gehalt (%)	50,4	51	50,8
Plasmide	2	1	0
Plasmidgröße (kb)	48 & 24	114	-

4.3 Gemeinsame und einzigartige Gensets

Der globale Genomvergleich an sich erlaubt noch keine Aussage über funktionelle Elemente im Genom. Aus den Vergleichen der protein-kodierenden Gene lassen sich die Schnittmengen der Genome in Kern-, paarweise gemeinsames und einzigartiges Genom untergliedern (Abb. 13, Tab. S4). Es wurden insgesamt 4714 protein-kodierende Gene im Genom von Stamm ATCC 25922 detektiert, die sich in 4406 orthologe Gruppen aufteilen. Im Genom von Stamm KI683 wurden 4834 protein-kodierende Gene in 4382 Gruppen und im Genom von Laborstamm RV308 4247 protein-kodierende Gene in 3708 Gruppen gefunden. Insgesamt teilen sich alle drei Stämme ein Kerngenom von 3572 orthologen Gruppen, die 3525 Einzelkopien von protein-kodierenden Genen beinhalten. Die klinischen Isolate ATCC 25922 und KI683 teilen sich 753 Proteingruppen untereinander, aber nur 44 bzw. 74 Proteingruppen mit dem Laborstamm RV308. 286 (6,1%), 401 (8,3%) und 489 (11,5%) Gene sind einzigartig in *E. coli* ATCC 25922, KI683 bzw. RV308 vorhanden und zeigen potentiell relevante Unterschiede zwischen den Stämmen.

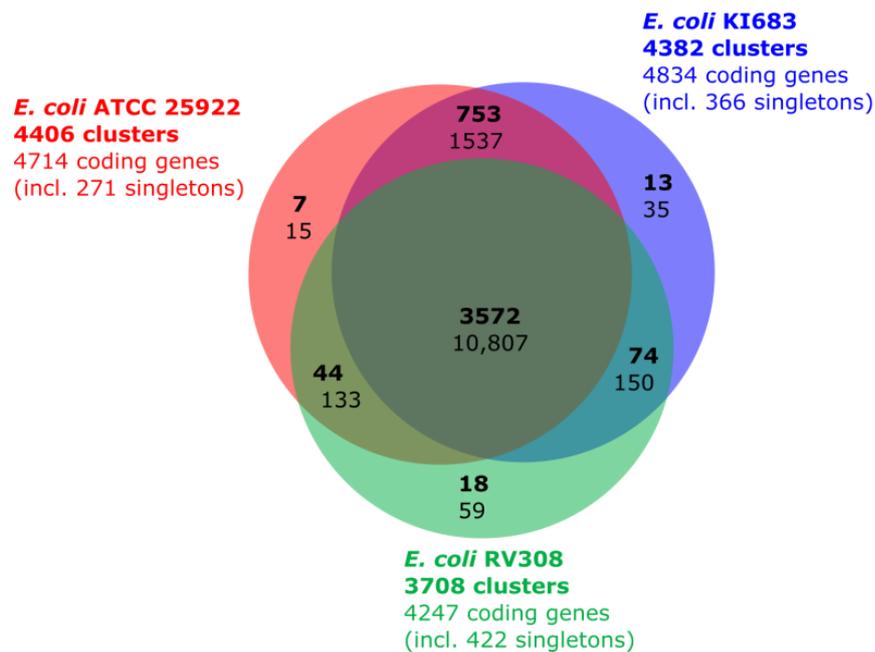


Abb. 13: Venn-Diagramm Orthovenn2 (Xu *et al.*, 2019) über die Verteilung von gemeinsamen und Stamm-spezifisch vorkommenden orthologen Clustergruppen in *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308. Die Anzahl der orthologen Gruppen innerhalb einer Schnittmenge sind fett geschrieben. Die zugehörige Gesamtanzahl von protein-kodierenden Genen in den orthologen Gruppen innerhalb einer Schnittmenge sind normal geschrieben.

Die vergleichenden Genomanalysen und die Einteilung der Gene in gemeinsame und Stamm-spezifische Gensets verdeutlichen, dass die klinischen Isolate ATCC 25922 und KI683 untereinander einen höheren Verwandtschaftsgrad aufweisen, als jeweils zum Laborstamm RV308. Interessanterweise spiegelte sich dies weder in den Bindungskapazitäten an Oberflächen wider (Abb. 9), noch korreliert es mit der Anzahl an Zellanhängen (Abb. 7B). Hier stellt sich erneut die Frage nach einer möglichen Existenz unterschiedlicher Adhäsionsmechanismen. Wird das Bindungsverhalten von einzelnen, Stamm-spezifischen Genen geregelt? Oder ist dafür die veränderte Genexpression gemeinsamer Gene bestimmend? Mithilfe von Transkriptomanalysen adhärerter und planktonischer *E. coli*-Bakterien wurde dieser Aspekt detailliert untersucht.

5 Transkriptomanalysen

Ein Transkriptom bezeichnet die gesamte transkribierte mRNA einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Mithilfe einer RNA-Sequenzierung wird die Menge und Sequenz der Transkripte anhand eines Referenzgenoms oder -transkriptoms (Pruitt *et al.*, 2007) ausgelesen. Durch die Menge des jeweiligen Transkripts wird die Expression eines Gens ermittelt, die als Verhältnis zwischen zwei Konditionen angegeben wird. So wird hier z. B. das Transkriptmengenverhältnis eines Gens von, auf 2 nm adhärerter Bakterien relativ zu auf 7 nm adhärerter bzw. zu planktonischen *E. coli*-Bakterien ausgewertet. Dadurch können die zellulären Faktoren (Gene und Proteine) identifiziert werden, die für die Anhaftung auf Titanoberflächen mit unterschiedlichen Nanorauigkeiten wichtig sein könnten.

Einerseits, um herauszufinden, ob die nanorauen Oberflächen auf zellulärer Ebene in den zwei *E. coli*-Stämmen ATCC 25922 und KI683 doch eine Auswirkung haben (2 nm zu 7 nm), die sich jedoch nicht auf die Anzahl adhärierter Bakterien auswirkte, und andererseits, um die Adhäsionsmechanismen der drei *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 charakterisieren zu können (2 nm zu planktonisch).

5.1 Etablierung der RNA-Isolierung

Notwendige Voraussetzung für Transkriptomstudien ist eine effiziente Methode zur RNA-Isolierung, hier speziell aus Oberflächen-gebundenen Bakterien. Während Methoden für planktonische Bakterien und Biofilme standardisiert sind, ist die RNA-Isolierung von ausschließlich (Titan-)gebundenen Bakterien nicht etabliert. Als besondere Herausforderung stellte sich die pro Titanplättchen nur geringe Anzahl adhärierter Bakterien von *E. coli* KI683 dar, was die Anzahl der zu bearbeiteten Titanplättchen von sechs auf zehn Proben erhöhte. Als kritischster Punkt stellte sich die Lyse der Bakterien direkt auf den Titanplättchen dar, wobei immer von zehn Titanplättchen ($R_a = 2 - 7$ nm) gleichzeitig isoliert wurde. Von einer Animpfmenge von 10^8 /ml *E. coli* KI683-Bakterien verblieben etwa $4 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^5$ Bakterien pro Oberfläche (=Proben). Die Proben wurden mit lac-SBF-Puffer gewaschen und in RNAlater®-Lösung gelagert, um die RNA zu stabilisieren und vor weiteren *ex vivo*-Einflüssen zu schützen. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben in ein 50 ml-Gefäß überführt und kurz abzentrifugiert, um die restliche RNAlater®-Lösung zu entfernen. Von verschiedenen Ansätzen zur Lyse, wie enzymatische (durch Lysozym), mechanische (mittels 0,1 mm Silikatkügelchen, abkratzen oder Spülungen) oder thermische Lyse, war nur die Lyse durch Hitzeeinwirkung erfolgreich. Zum Beispiel führte die Verwendung von Silikatkügelchen zum Platzen der 50 ml-Gefäße im Hochgeschwindigkeitshomogenisator und die Mikrobruchstücke von Borosilikatglas und Titan verstopften die Membranen der Aufreinigungssäulen. Zur thermischen Lyse wurde den von RNAlater®-gereinigten Proben 3 ml Trizol hinzugefügt und es wurde 1 min bei RT geschüttelt. Das Proben-Trizol-Gemisch wurde anschließend bei 95°C für 5 min erhitzt, um die Zellen zu lysieren und wieder für 1 min geschüttelt. Das Proben-Trizol-Gemisch wurde bei 14 500 x g zentrifugiert, um Splitterstücke der Plättchen zu entfernen. Anschließend wurden 2,7 ml Trizol abgenommen und in ein neues 50 ml-Gefäß überführt und die RNA wurde mit Ethanol präzipitiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Protokoll des Directzol MicroPrep Kit (Zymo Research, Freiburg, D) mit einem zusätzlichen *prewash*-Schritt und zwei weiteren RNA-Wash-Schritten. Es folgten ein DNase-Verdau, die Präzipitierung mittels linearem Acrylamid und die spektrophotometrische Konzentrationsmessung. Die Qualitätsanalyse mittels Agilent Bioanalyzer bestätigte den Erfolg der RNA-Isolation der adhärerten Bakterien *E. coli* KI683 (Tab. 16).

Tab. 16: Isolierte Gesamt-RNA-Mengen der sessilen und planktonischen Proben von *E. coli* KI683. RIN: *RNA integrity number* als Qualitätsmerkmal von RNA. Skala: 1 (degradiert) - 10 (intakt).

Probe	Gesamtmenge in ng	RIN
2 nm_S1	336	8,5
2 nm_S2	317	8,7
7 nm_S1	548	8,4
7 nm_S2	250	9,0
pl_S1	3 410	6,0
pl_S2	3 440	5,9

Für die planktonischen Proben wurden die Bakterien über den Titanoberflächen entnommen, pelletiert und derselben Lyse unterzogen wie die Proben mit adhärirten Bakterien. Die höhere Bakterienzahl erlaubte ohne zusätzliche Schritte die Anwendung des Directzol RNA MicroPrep Kits (Zymo Research, Freiburg, D) zur Isolierung der Gesamt-RNA. Zwar wurde deutlich mehr RNA isoliert, jedoch reduzierte sich die Qualität der RNA-Proben (Tab. 16). Alle Gesamt-RNA-Proben wurden einer rRNA-Depletion (StarSEQ GmbH, Frankfurt, D) unterzogen. 23 – 65,5 ng angereicherte mRNA von *E. coli* KI683 standen letztendlich für die RNA-Sequenzierung (StarSEQ GmbH, Frankfurt, D) zur Verfügung. Für die RNA-Isolierung der stark adhärenen *E. coli*-Bakterien ATCC 25922 und RV308 wurden dieselben Protokolle verwendet. Weitaus höhere Gesamt-RNA-Mengen über 1 µg erlaubten den Einsatz von 1 µg Gesamt-RNA für die rRNA-Depletion. Die aus den letztgenannten Stämmen isolierten hohen RNA-Mengen sind interessant, da sie die Klassifizierung der Bindungstypen gemäß der Bildauswertung bestätigen. Darüber hinaus lässt der Fakt, dass die RNA-Qualität der adhärirten Bakterien stets besser war als die der planktonischen Proben, darauf schließen, dass der Adhäsionszustand metabolisch einen günstigeren Zustand darstellt. Für mehr Details der Methodenausführung und Materialnutzung, siehe Abschnitte B2.1.2 und B2.1.3.

5.2 Genexpression adhärirter und planktonischer Bakterien

Nach der RNA-Sequenzierung wurden für die Stämme ATCC 25922 und KI683 die differentiell exprimierten Gene für Vergleiche zwischen drei verschiedenen Konditionen (adhärirt auf 2 nm, auf 7 nm und planktonisch) und für Stamm RV308 zwischen zwei Konditionen (adhärirt auf 2 nm und planktonisch) berechnet. Dies resultierte in 16 Proben mit 1,8 Mio. bis 43,8 Mio. getrimmten hochqualitativen *reads*, die so eine Abdeckung von 10- bis 243-fach pro Probe erzielten. Wie erwartet wurde der Hauptanteil (>84,2%) der Gene konstitutiv exprimiert (Tab. 17).

Tab. 17: Differenziell exprimierte Gene (DEG) in adhärennten (2 und 7 nm) und planktonischen (pl.) *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308. Die Anzahl der differenziell exprimierte Gene bezieht sich auf die erste Kondition. Grenzwerte der DEG: FDR < 1% und $\log_2 FC > 1$ oder $\log_2 FC < -1$. In Zusammenarbeit mit Thomas Wolf und Tongta Sae-Ong (Leibniz-HKI, Systembiologie und Bioinformatik).

<i>E. coli</i> -Stamm	Kondition	Gene detektiert	DEG		
			gesamt	herunterreguliert	hochreguliert
ATCC 25922	7 nm / 2 nm		16	15	1
	2 nm / pl.	4818	370	267	103
	7 nm / pl.		513	382	131
KI683	7 nm / 2 nm		0	0	0
	2 nm / pl.	4834	1104	441	663
	7 nm / pl.		999	440	559
RV308	2 nm / pl.	4176	793	317	476

Im stark adhärennten Stamm ATCC 25922 wurden beim Vergleich der Konditionen von 7 zu 2 nm 16 differenziell exprimierte Gene gefunden, die sich in 15 niedrig ($\log_2 -1,52$ bis $\log_2 -1,01$) und einem hoch exprimierten Gen ($\log_2 1,14$) untergliedern (Tab. S1). Der Vergleich der Konditionen von 2 nm zu planktonisch ergab 370 differenziell exprimierte Gene, wovon 267 niedrig und 103 hoch exprimiert wurden (Tab. S1, Abb. A2A). Dasselbe Muster ist bei dem Vergleich zwischen 7 nm zu planktonisch zu sehen. Hier sind es 513 differenziell exprimierte Gene. Das gesamte Expressionsmuster setzt sich aus 382 gering und 131 hoch exprimierten Genen zusammen (Tab. S1, Abb. A2B).

Für den schwach adhärennten *E. coli* KI683 wurden beim Vergleich zwischen 2 nm und planktonisch 1104 differenziell exprimierte Gene detektiert, die sich in 441 niedrig und 663 hoch exprimierte Gene aufteilen (Tab. S2, Abb. A2C). Zwischen den Konditionen 7 nm und planktonisch wurden insgesamt 999 differenziell exprimierte Gene gefunden, wobei wieder der geringere Teil von 440 den niedrig und der größere Teil von 559 den hoch exprimierten Genen zuzuordnen ist (Tab. S2, Abb. A2D). Es wurde keine differentielle Genexpression für den Vergleich zwischen 7 und 2 nm in *E. coli* KI683 festgestellt.

Da die 16 differenziell exprimierten Gene aus dem Vergleich 7 zu 2 nm in *E. coli* ATCC 25922 sehr geringe Expressionsniveaus aufwiesen und differenziell exprimierte Gene in *E. coli* KI683 völlig ausblieben, wurde von keiner genetischen Antwort durch die Nanorauigkeit ausgegangen. Als Konsequenz daraus wurden für *E. coli* RV308 nur die zwei Konditionen adhärennt auf 2 nm und planktonisch weiter überprüft. Dieser Vergleich resultierte in 793 differenziell exprimierten Genen, die für den Adhäsionszustand 317 gering und 476 hoch exprimierte Gene inkludierten (Tab. S3, Abb. A2E). Bereits dieser globale Blick auf die Transkriptomanalysen zeigt, dass die Stämme während der Oberflächenadhäsion nicht auf die veränderte Rauigkeit reagierten, sondern die planktonischen und sessilen Zustände individuell und Stamm-spezifisch gesteuert wurden. Eine Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*) aller Proben untermauerte diese Beobachtung (Abb. 14).

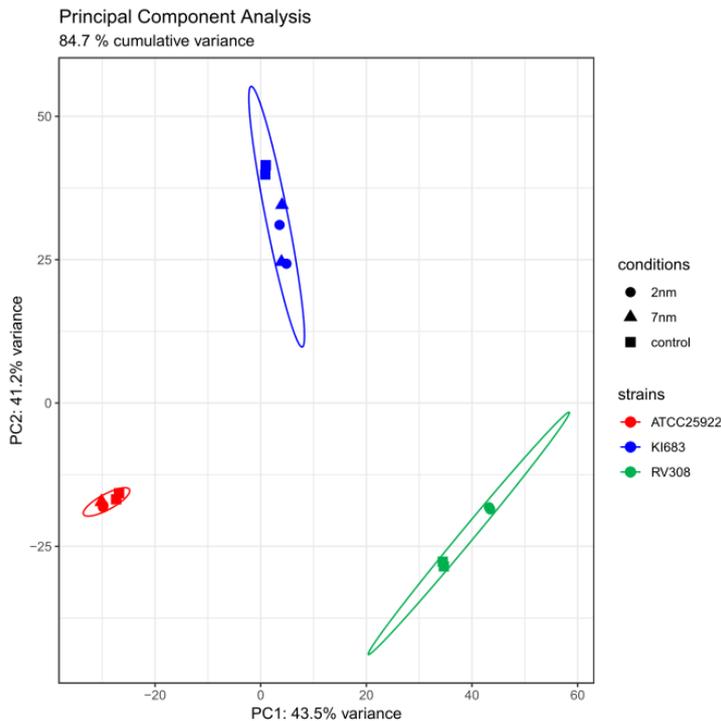


Abb. 14: Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Genexpression. In Zusammenarbeit mit Tongta Sae-Ong (Leibniz-HKI, Systembiologie und Bioinformatik).

84,7% der kumulativen Varianz wird durch die ersten Komponenten PC1 und PC2 erklärt. PC1 (43,5%) separiert die Stämme in die starkbindenden Stämme ATCC 25922 und RV308, jeweils links und rechts im unteren Bereich, und den schwachbindenden Stamm KI683 oben in der Mitte. PC2 (41,2%) separiert die Stämme zusätzlich in planktonische und sessile (2 und 7 nm) Proben. Die sessilen und planktonischen Proben des Stammes ATCC 25922 liegen sehr dicht zusammen, die Proben von KI683 und RV308 sind deutlicher voneinander getrennt. Außerdem ist beim Stamm KI683 auffällig, dass sich jeweils ein Replikat der 2 (Kreis) und 7 nm (Dreieck) Proben näher sind als zum Replikat der eigenen Kondition und sozusagen austauschbar wären. Abschließend wird durch die Transkriptomanalyse und die Hauptkomponentenanalyse evident, dass die planktonischen und sessilen Konditionen vielmehr einer Stamm-spezifischen Regulation entspringen, als dem Einfluss eines äußeren Faktors wie der Rauigkeit.

5.3 Verifizierung der RNA-Sequenzierungsdaten mittels qRT-PCR

Bei den differentiell exprimierten Genen aus den RNA-Sequenzierungs-Ergebnissen des *E. coli*-Stammes ATCC 25922 fielen zwei Beobachtungen auf (Tab. 17): erstens war die Anzahl der angezeigten differentiell exprimierten Gene bei allen Vergleichen (adhäriert auf 2 nm zu planktonisch, adhäriert auf 7 nm zu planktonisch) geringer als die der zwei anderen Stämme *E. coli* KI683 und RV308 und zweitens wies *E. coli* ATCC 25922 als einziger Stamm 16 putative „nanorau-sensitive Gene“ beim Vergleich der Adhäsionskonditionen von 2 zu 7 nm auf (Tab. S1). Daher wurde durch quantitative

Echtzeit-PCR (engl. *quantitative real time PCR*, qRT-PCR) gesondert geprüft, ob erstens die jeweilige differentielle Genexpression in allen drei *E. coli*-Stämmen der Konditionen adhäriert auf 2 nm zu planktonisch mit den RNA-Sequenzierungsergebnissen korrelierte und ob zweitens die 16 differentiiell exprimierten Gene tatsächliche „nanorau-sensitive Gene“ sind. Dafür wurden Proben, wie sie für die Transkriptomanalyse hergestellt wurden, in unabhängigen Experimenten nochmals generiert. Für *E. coli* ATCC 25922 wurde die Gesamt-RNA von auf 2 nm- und 7 nm-Oberflächen adhärierten und planktonischen Bakterien isoliert, während für *E. coli* KI683 und RV308 die Gesamt-RNA jeweils nur von auf 2 nm-Oberflächen adhärierten und planktonischen Bakterien isoliert wurde (s. Abschnitte B2.1.2 und B2.1.3). Nachdem die Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde, wurde mittels qRT-PCR die Expression der neun Gene *artJ*, *bsmA*, *cusC*, *cusF*, *iscR*, *napF*, *pykA*, *yehH* und *ydhY* in *E. coli* ATCC 25922, der neun Gene *artJ*, *bsmA*, *metE*, *napF*, *rplD*, *tdcF*, *tdcD*, *ybgS* und *yehH* in *E. coli* KI683 und der neun Gene *amtB*, *bsmA*, *bssS*, *fadI*, *iscR*, *purH*, *pyrC*, *ybfA* und *ydcW* in *E. coli* RV308 in den Konditionen adhäriert auf 2 nm und planktonisch überprüft (Tab. 6). Die differentielle Expression der adhärierten Bakterien auf Oberflächen mit Rauigkeiten von 2 nm und 7 nm von *E. coli* ATCC 25922 wurde mittels qRT-PCR anhand der sieben Gene *cusF*, DR76_RS24660, DR76_RS26075, *metF*, *tnaC/tnaL* (DR76_RS03930), *yqgB* und *yqgC* (DR76_RS28295) überprüft (Tab. 7). Die Korrelation der Methoden der RNA-Sequenzierung und der qRT-PCR wurde durch das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt, das, mit 100% multipliziert, die Wahrscheinlichkeit eines linearen Zusammenhangs ergibt (Abb. 15).

Die erreichten Bestimmtheitsmaße betragen für *E. coli* ATCC 25922 $R^2 = 0.93$ (Abb. 15A), für KI683 $R^2 = 0.79$ (Abb. 15B) und für RV308 $R^2 = 0.87$ (Abb. 15C), was beweist, dass die mit der qRT-PCR ermittelten \log_2 -Verhältnisse sehr gut mit denen der RNA-Sequenzierungsdaten und den so identifizierten differentiiell exprimierten Gene korrelieren. Im Gegensatz dazu ist von einer schwachen Korrelation der entsprechenden \log_2 -Verhältnissen zwischen den Adhäsionskonditionen 2 nm und 7 nm für den Stamm *E. coli* ATCC 25922 auszugehen, da der R^2 -Wert nur 0,03 betrug (Abb. 15D). Die R^2 -Werte und somit die Übereinstimmung von *yqgB* und *metF* war hoch, während für die zwei unbekanntenen Gene DR76_24660 und DR76_26075 keine Übereinstimmung gefunden wurde. Im Diagramm Abb. 15D fehlen die getesteten Gene *tnaC/tnaL* (DR76_RS03930) und *yqgC* (DR76_RS28295), da in der qRT-PCR keine Amplifizierung erfolgte. Die Ausweisung als differentiiell exprimierte Gene in den RNA-Sequenzierungsergebnissen wird als Artefakt eingestuft, das durch die nur geringe generelle Expression begründet ist.

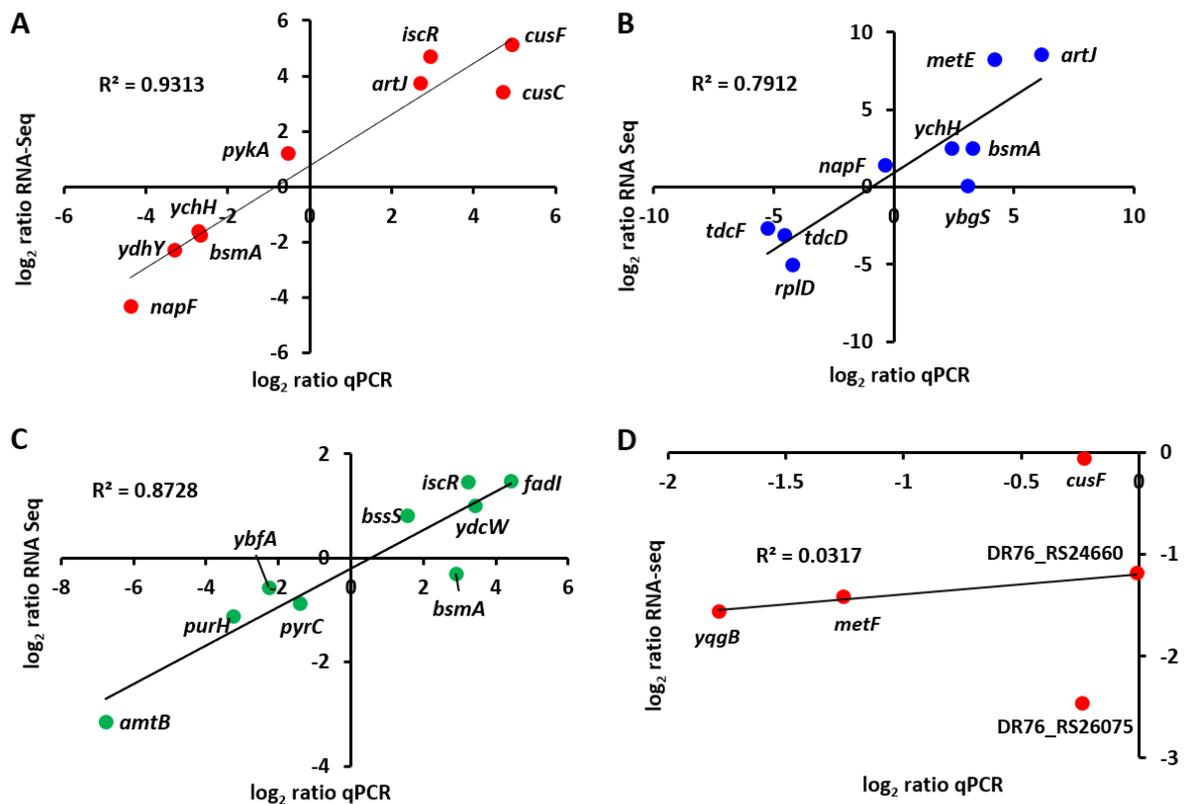


Abb. 15: Korrelationen zwischen den \log_2 -Verhältnissen von RNA-Sequenzierung und qRT-PCR Genexpressionen beim Vergleich von sessilem (2 nm) und planktonischem Zustand in A) *E. coli* ATCC 25922, B) *E. coli* KI683 und C) *E. coli* RV308. D) spiegelt den Vergleich von 2 nm zu 7 nm in *E. coli* ATCC 25922 wider. R^2 ist das Bestimmtheitsmaß.

Insgesamt wird die Existenz sogenannter „nanorau-sensitiver Gene“ im charakterisierten System, Titanoberflächen mit $R_a = 2 - 7$ nm, als unwahrscheinlich erachtet. Obwohl die Oberflächen mit höheren Rauigkeiten (12 und 16 nm) nicht getestet wurden, konnte aus den bisherigen Ergebnissen der Bild- und Transkriptomanalysen geschlussfolgert werden, dass auch diese Strukturen ebenfalls keinen Einfluss haben. Als Konsequenz daraus wurde der weitere Fokus auf die Untersuchung der jeweiligen Adhäsionsmechanismen der drei Stämme und auf deren Stamm-spezifischen Merkmale gelegt.

5.4 Genexpression von Zellanhang-assoziierten und Biofilm-regulierenden Genen

Bereits die REM-Bilder (Abb. 10) ließen vermuten, dass die Topographie der Oberflächen keinen Einfluss auf die Ausbildung von Zellanhängen ausübt. Allerdings sind Letztere an der initialen Anhaftung maßgeblich beteiligt (Berne *et al.*, 2015). Wie diese konkret aussieht, wurde im Detail untersucht, ausgehend von den differentiell exprimierten Genen zwischen den Konditionen adhärirt auf 2 nm und planktonisch wachsend (Abb. 16).

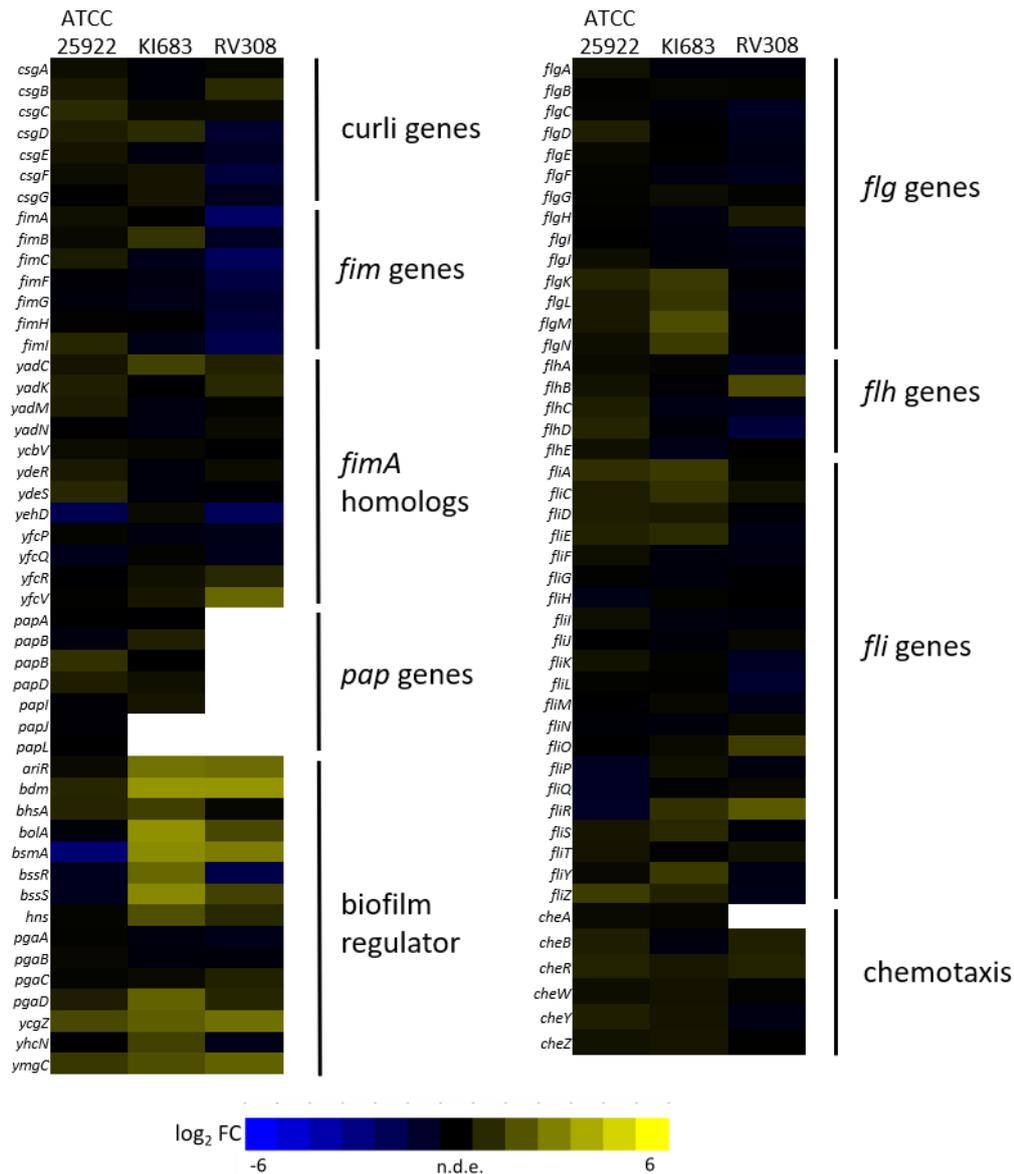


Abb. 16: Heatmap der Zellanhang-assoziierten und Biofilm-regulierenden Gene laut GO-Klassifizierungen. Differenziell exprimierten Gene (DEG) zwischen den Bedingungen sessil (2 nm) und planktonisch. Grenzwerte der DEG: FDR < 1% und log₂ FC > 1 oder log₂ FC < -1. n.d.e.: nicht differenziell exprimiert.

Für die bekannten Gene für die Zellanhänge (*csg*, *fim*, *pap*, *flg*, *flh*, *fli*) wurden keine auffälligen Expressionsveränderungen zwischen sessilem und planktonischem Zustand gefunden. Auffällig war aber, dass der stark adhärierende Stamm ATCC 25922 mehr Gene für die Bildung von Zellanhängen besitzt als die Stämme KI683 und RV308 (z. B. *papL*). Das Fehlen von differenziell exprimierten Genen für die Bildung von Zellanhängen legt nahe, dass die Anzahl der Zellanhänge im planktonischen und adhärenen Zustand unverändert ist bzw. der Untersuchungszeitraum von einer Stunde zu kurz für die Ausbildung eines entsprechenden Phänotyps ist. *E. coli* ATCC 25922 zeigte, während des Wechsels von planktonisch zu sessil, die geringste Anzahl an differenziell exprimierten Genen an (Tab. 17). Erstaunlicherweise wurde die Expression von Biofilm-assoziierten Genen nicht so deutlich reguliert, wie es von einem stark adhärenen Bakterium zu erwarten gewesen wäre. Lediglich der bekannte,

negative Biofilm-Regulator *bsmA* wurde im sessilen Zustand geringer exprimiert, während die Expression der Biofilm-stimulierenden Gene *ycgZ* und *yngC* leicht erhöht wurde. In *E. coli* KI683 werden während der Adhäsion zahlreiche Biofilm-reduzierende Gene aktiviert, was zur geringen Adhäsionsneigung dieses Stammes beitragen dürfte. Beispiele hierfür sind die Gene *bolA*, *bsmA*, *bssR*, *bssS* und *hns*. Nur die Expression des Biofilmregulatorgens *bdm*, das die Flagellenbiosynthese begünstigt (Kim *et al.*, 2015), wurde induziert, was zur Folge hat, dass auch die Genexpression der *flg*-Gene leicht erhöht war. Im sessilen Zustand wurde der „steady state“-Spiegel der mRNA, des für die Biosynthese von Biofilmadhäsinen zuständige Gen *pgaD*, im Stamm KI683 erhöht. Zwar haben *E. coli* RV308 und ATCC 25922 ein ähnliches Adhäsionsmuster, allerdings gleichen die Biofilm-assoziierten differentiell exprimierten Gene von *E. coli* RV308 interessanterweise denen von *E. coli* KI683. Obwohl keine Flagellen an *E. coli* RV308 sichtbar sind, gibt es vereinzelt erhöhte Expressionen von typischerweise in die Flagellenbiosynthese involvierten Gene, wie z. B. von *fliR*. Von den zwölf *fimA*-Homologen waren nur die Gene *yehD* und *yfcV* in ihrer Expression verändert.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Zellanhänge in der frühen Adhäsion auf genetischer Ebene wenig bis gar nicht reguliert werden, da die vorhandenen Zellanhänge aus dem planktonischen Zustand bereits vorhanden waren. Eine Stunde Inkubationszeit war für die *E. coli*-Bakterien wahrscheinlich zu kurz, um phänotypische Veränderungen wirksam werden zu lassen.

5.5 Stamm-spezifische Adhäsionsmechanismen

Ziel der nächsten Untersuchung war es, für die beobachteten Adhäsionsverhalten der drei *E. coli*-Stämme mögliche Stamm-spezifische Genexpressionsmuster nachzuweisen und gezielt zu erforschen, inwiefern die Diversifizierung der Stämme hinsichtlich des beobachteten Adhäsionsgeschehens in der Genexpression zum Ausdruck kommt. Wird das Bindungsverhalten von einzelnen, Stamm-spezifischen Genen geregelt? Oder ist die veränderte Expression gemeinsamer Gene bestimmend? Die Beantwortung der Fragen erfolgte beispielhaft mit den Daten, die durch vergleichende Transkriptomanalysen der beiden Bedingungen Adhäsion an 2 nm-raue Oberflächen und planktonischer Kultivierung generiert wurden. Die \log_2 -Werte für die, in den Abschnitten 5.5.1 bis 5.5.3 angegebenen, differentiell exprimierten Gene entstammen diesem Bedingungspar. Zur Bewertung wurden die differentiell exprimierten Gene (Tab. 17) dem gemeinsamen bzw. einzigartigen Genpool (Abb. 13, Tab. S4) zugeordnet und in Relation zur Gesamtanzahl der differentiell exprimierten Gene gesetzt. Außerdem wurden Genanreicherungen mittels GSEA (Tab. S5) durchgeführt.

5.5.1 Adhäsionsmechanismen von *E. coli* ATCC 25922

Charakteristisch für *E. coli* ATCC 25922 sind die zahlreichen Zellanhänge (Fimbrien, Flagellen) und eine schnelle Adhäsion an die untersuchten Oberflächen. Aufgrund der wenigen differentiell exprimierten

Gene konnte für diesen Stamm nur eine geringe Menge an überrepräsentierten Genen detektiert werden, die einem biologischen Prozess zugeordnet sind. Eine Mehrheit von 84,2% der differentiell exprimierten Gene, mit Minimal- und Maximalwerten von \log_2 -4,60 bis \log_2 4,92 (Tab. S4, S5), gehört zum gemeinsamen Genpool der drei Stämme. Die wichtigsten Änderungen in der Genexpression werden nachfolgend vorgestellt bzw. zusammengefasst.

Fettsäure-Abbau: Zahlreiche Gene, die für die Fettsäure- und die Geranioldegradation kodieren, waren weniger stark exprimiert (*fad*, \log_2 -1,68 bis \log_2 -0,02). Da Fettsäuren u.a. zur Flexibilität der Zellmembran, für die Energiespeicherung und die Kommunikation mittels Signalmolekülen benötigt werden (Denich *et al.*, 2003), kann die hier vorgefundene Auffälligkeit keinem alleinigen Stimulus zugeordnet werden.

Stickstoffmetabolismus: Die für Nitratreduktasen kodierende Gene *nap* gehörten zu den Genen mit den niedrigsten Expressionsraten im sessilen Modus (\log_2 -4,6 bis -1,38) im Vergleich zur planktonischen Kultivierung. Diese geringere Expression war nur in *E. coli* ATCC 25922 charakteristisch. *Nap*-Gene vermitteln die schnelle Anpassung an Stickstoffmangel-Bedingungen, was diesem Stamm einen selektiven Vorteil verschaffen könnte.

Aminosäurenmetabolismus: Weitere GO-Klassifizierungen der differentiell exprimierten Gene lassen auf einen dynamischen Aminosäuren-Metabolismus schließen, der sich in die hochregulierte Arginin-Biosynthese (*arg*, *art*, \log_2 1,35 bis 2,7) und die herunterregulierten Cystein- und Methionin-Biosynthesen untergliederte (*cys*, *met*, \log_2 -1,28 bis 2,21).

Nicht-charakterisierte Gene: Zu den Top 20 der Gene mit den niedrigsten Expressionsraten unter der Bedingung sessil, gehören auch solche mit bisher nicht-charakterisierter Funktion, wie z. B. *ydhY*, *ydhH*, *ydhV*, *ygeW*, *ycbJ* und *ymcE* (\log_2 -3,3 bis -2,28). Sie zeigen deutlich, dass vor allem in *E. coli* ATCC 25922 weitere Mitspieler an der Adhäsion beteiligt sind, die es für ein Gesamtbild noch zu erforschen gilt.

Metallaufnahme: Auffällig am sessilen Modus war die starke Expression von Genen, die für Kupfertransporter kodieren, z.B. *cus* und *copA* (\log_2 0,42 bis 4,92). Um im Adhäsions- und Biofilm-Modus eine Kupferhomöostase zu halten, wird das Zweikomponentensystem CusSR und das periplasmatische Kupferchaperon CusF aktiviert, wobei CopA und CusCBA als Effluxpumpen dienen (Giachino & Waldron, 2020). Entgegengesetzt reguliert waren Gene für den Nickeltransport (*nikABCDE*, \log_2 -2,29 bis -0,86) und die Metall-bindenden Proteine ZinT und ZnuC (\log_2 -1,65 bis 2,13).

Gemeinsam differentiell exprimierte Gene von *E. coli* KI683 und RV308: Mit *E. coli* KI683 teilt sich *E. coli* ATCC 25922 729 gemeinsame Einzelkopie-Gene, davon waren 38 differentiell exprimiert (10,7% der Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene). Von diesen wurde das, für einen

Kobalttransporter-kodierende Gen *ecfT* (DR76_RS08860) mit einem Wert von \log_2 -2,09 im sessilen Modus am wenigsten exprimiert, während *ilvG* (DR76_RS03640) mit einem Wert von \log_2 1,70 und *yaiO* (DR76_RS14485) mit einem Wert von \log_2 1,60, am stärksten exprimiert wurden. Mit dem anderen, stark adhärenen Stamm RV308 teilt sich ATCC 25922 71 Einzelkopie-Gene, davon sind 10 differentiell exprimiert (2,8% der Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene). Das Kälteschockgen *cspH* und einige nicht-charakterisierte Gene (*ymcE*, *ypfM*, *ynfN* und *ypdK*) wurden im sessilen Zustand weniger exprimiert (\log_2 -2,41 bis -1,23). Außerdem wurde *leuL*, das negative Biofilm-Regulatorgen *ymgA* und ein für ein *ilv* Operon *Leader-Peptid* kodierendes Gen (\log_2 1,69 bis 2,4) gefunden.

Einzigartig differentiell exprimierte Gene von *E. coli* ATCC 25922: Von den 286 Einzelkopie-Genen des einzigartigen Genpools von *E. coli* ATCC 25922 sind nur acht Gene differentiell exprimiert, die einen Anteil von 2,3% der gesamten 398 differentiell exprimierten Gene ausmachen und von \log_2 -1,61 bis 3,28 reichen. Allerdings war nur die Expression von *ilvX*, einem nicht-charakterisierten Gen, das für ein kleines Protein kodiert, bemerkenswert hoch (\log_2 3,28).

Adhäsionsmechanismus: *E. coli* ATCC 25922 adhärert sehr schnell auf den Titanoberflächen, wobei die zahlreichen Zellanhänge (Fimbrien, Flagellen) eine Initialadhäsion einleiten. Unmittelbar nach der Adhäsion festigen induzierende Biofilm-Regulatoren (Gene *bsmA*, *ycgZ*, *ymgC*) die Bindung. Zeitgleich erfolgen Anpassungen von Primärstoffwechselwegen wie Stickstoffverarbeitung (*nap*), Eisen-Schwefel-Biogenese (*isc*), Fettsäuresynthese (*fad*) und Kupfertoleranz (*cus*). Viele noch nicht-charakterisierte Gene unter den differentiell exprimierten Genen verhindern ein vollständigeres Bild der Adhäsion von *E. coli* ATCC 25922. Es zeigt sich jedoch deutlich, dass die Adhäsion nicht nur „klassisch“ durch Zellanhänge und Biofilmregulatoren reguliert, sondern auch durch die Aktivität zahlreicher nicht-charakterisierter Gene beeinflusst wird.

5.5.2 Adhäsionsmechanismen von *E. coli* KI683

E. coli KI683 wurde in die Studie einbezogen, weil dieser Stamm als eher schlecht an Oberflächen adhärierend charakterisiert ist. Beim Wechsel in den sessilen Modus wurden mehr als ein Fünftel des Genoms als reguliert festgestellt. Somit ist mehr als die 2,5-fache Menge an Genen im Vergleich zum stark adhärenen *E. coli* ATCC 25922 differentiell exprimiert worden. Dies könnte darauf hindeuten, dass *E. coli* KI683 ein komplexeres Netzwerk an Genen aktivieren muss, um vom planktonischen in den adhärenen Zustand zu wechseln. Wie für *E. coli* ATCC 25922 verantwortet auch hier der gemeinsame Genpool die Mehrheit von 87,6% der differentiell exprimierten Gene mit Minimal- und Maximalwerten von \log_2 -5,26 bis \log_2 6,14. Die wichtigsten differentiell exprimierten Gene werden nachfolgend vorgestellt und eingeordnet.

Veränderung der Zellmembran: Zahlreiche Gene, deren Produkte zum Zellmembran-Stoffwechsel gehören, sind im sessilen Zustand deutlich stärker exprimiert. Dazu gehören das, für einen

Lipidtransporter-kodierende Gen *blc* (\log_2 3,95), das Lipid-Biosynthese-Gen *lpxP* (\log_2 2,14) und die Gene *pspA-G* (\log_2 0,98 bis 3,95). Als die Adhäsion begünstigend, wird auch die erhöhte Expression der *fad*-Gene eingeschätzt, die für Enzyme der Fettsäuredegradation kodieren (\log_2 -0,04 bis 3,05). Eine erhöhte Transkription der GO-Klassifizierung *Gram-negative cell wall biogenesis* (Gene *ycbB*, *ynhG*, *erfK*, *ynhG*) deutet ebenfalls auf eine Umgestaltung der Zellmembran zu einer effektiven Barriere hin.

Transkriptions- und Translationsmaschinerie: Die Aktivität der Gene für die Transkriptionsmaschinerie war in den untersuchten Stämmen nur in *E. coli* KI683 erheblich verlangsamt: Die Ribosomen-Untereinheiten 50S (Gene *rpmA-J*, *rplA-F* und *rplI-Y*; \log_2 -4,22 bis -0,93) und 30S (Gene *rpsA-U*, \log_2 -4,43 bis -1,94) sind im sessilen Modus niedriger exprimiert. Zudem sind viele Translationsfaktor-Gene wie *fusA*, *prfC*, *tsf*, *infA*, *tufA* (\log_2 -2,86 bis -2,01) und RNA-Polymerase-Gene wie *rpoA* und *rpoB* (\log_2 -2,66 bis -2,28) niedriger exprimiert. Zahlreiche Gene, wie das des globalen *fis*-Regulators, des Ribosom-assoziierten Inhibitors *AraiA* und *rimM*, *rnpA*, *hha* und *cspADEG* (\log_2 -3,45 bis 2,97) könnten ebenfalls die Translationseffizienz verringern und deuten darauf hin, dass die Bakterien nach der Adhäsion in einen persistierenden Zustand wechselten oder sogar abstarben (Wood, Song, & Yamasaki, 2019).

Nukleotid- und Aminosäurenmetabolismus: Auffällig waren die niedrigen Expressionsraten der Purinbiosynthese-Gene (*guaAB*, *nrdA*, *apt*, *gpt*, *prs* und der *pur*-Gene; \log_2 -2,77 bis -0,09), die eng mit der oxidativen Phosphorylierung (*atp*; \log_2 -2,77 bis -0,09) verbunden sind. Außerdem wird das intrazelluläre Überleben uropathogener *E. coli* (UPEC) von einer *de novo*-Purinbiosynthese der Bakterien abhängig gemacht (Shaffer *et al.*, 2016). Zusätzlich wurde der Metabolismus verschiedener Aminosäuren als verändert bestimmt. Die Enzyme für den Serin- (*sdaABC*) und Threonin-Abbau (*tdcBCDFG*) wurden im sessilen Zustand niedriger exprimiert (\log_2 -5,26 bis -0,6). Im Gegenteil dazu wurden Gene für die Biosynthesen von Arginin, Tryptophan und Methionin höher exprimiert (*arg*, *art*, *trp*, *met*, \log_2 1,00 bis 5,16).

ABC-Transporter und prokaryotisches Schutzsystem: Die Expression zahlreicher ABC-Transporter kodierender Gene war nach der Adhäsion deutlich vermindert. Da ABC-Transporter wesentliche Bestandteile in bakteriellen Zellmembranen sind und dort die Aufnahme und Sekretion verschiedenster Substrate verantworten (Linton & Higgins, 1998), wird die vermutete Transformation in einen Persistenz-Zustand bekräftigt. Die veränderte Expression von Genen für Toxin-Antitoxin-Paare wie *yoeB-yefM*, *hdeA-hdeB* oder *hha-tomB* (\log_2 -3,76 bis 3,65) weisen auf die Beteiligung prokaryotischer Schutzsysteme am Adaptionsgeschehen an den sessilen Modus hin. Die Funktion prokaryotischer Schutzsysteme reicht von Genomstabilisierung, über antibiotischer Persistenz bis zu Stressmodulation und Resistenz gegen Bakteriophagen (Fraikin, Goormaghtigh, & Melderer, 2020). Interessanterweise wurde *sulA* (\log_2 3,17) verstärkt im adhärenen Zustand exprimiert. SulA inhibiert

während der Replikation die Zellteilung, um die Bildung individueller Zellkörper zu verhindern und eine Zellverlängerung, die sogenannte Filamentation, zu begünstigen, womit Bakterien bis zu 50 µm lang werden können. Größere und längere *E. coli* KI683-Bakterien im Adhäsionszustand wurden mittels REM detektiert (Daten nicht gezeigt). Die abnormale Verlängerung wird durch die SOS-Antwort induziert. Sie ermöglicht durch die vergrößerte Zellmembran eine bessere Anhaftung auf dem Wachstumsgrund und erschwert die Phagozytose durch Makrophagen und anderen Fressfeinden (Justice *et al.*, 2008). Diese Überlebensstrategie wurde auch für uropathogene *E. coli*-Bakterien bei Auslösung einer Harnwegsinfektion beobachtet (Justice *et al.*, 2004).

Stickstoffmetabolismus und nicht-charakterisierte Gene: Unter den differentiell exprimierten Genen befanden sich zahlreiche Gene, die dem Stickstoffmetabolismus zugerechnet werden und im sessilen Zustand höher exprimiert waren. So dienen die Prozesse γ -Aminobuttersäure (GABA)-Degradation (*gabDPT*, \log_2 2,13 bis 2,53), Lysindegredation (*csiDER*, \log_2 1,95 bis 3,60) und Glutamataufnahme (*glt*, \log_2 1,73 bis 3,58) der Versorgung der Bakterien mit Stickstoff, während *nac* (*nac*, \log_2 3,00) die Stickstoffverteilung zwischen den Prozessen steuerte (Bender, 2010). Neben den bekannten Genen befanden sich unter den differentiell exprimierten Genen noch viele nicht-charakterisierte Gene, wie *yeb*, *yidC*, *ycg* und *ybgS* (\log_2 -3,07 bis 3,4).

Gemeinsame differentiell exprimierte Gene von *E. coli* ATCC 25922 und RV308: Im gemeinsamen Genpool von *E. coli* KI683 und ATCC 25922 befinden sich 729 Einzelkopie-Gene, von denen nur 71 differentiell exprimiert waren und deren Expressionsunterschiede von \log_2 -2,71 bis 2,80 reichten (6,5% der Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene). Darunter befinden sich vor allem Gene, die für die Kapselschicht kodieren (*kps*) und das Antigen 43 (*flu*) (\log_2 -2,71 bis -1,24). Kapsuläre Polysaccharide ummanteln den bakteriellen Zellkörper mit einer Schichtdicke von 0,2 bis 1 µm und blockieren die kleinen, in der Membran sitzenden Adhäsine wie Ag43 (Schembri *et al.*, 2004). Die Kapseln bieten eine physikalische, chemische und immunologische Abschirmung im Blutstrom und tragen zur erhöhten Virulenz bei (Schembri *et al.*, 2004; Lammers *et al.*, 2011). Der gemeinsame Anteil von Stamm KI683 mit RV308 belief sich auf 44 Gene, von denen aber nur 6 differentiell exprimiert waren (0,5% der Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene). Allerdings war nur die Expression von *yubl* bemerkenswert hoch (\log_2 2,81), von dem jedoch keine eindeutige Funktion bekannt ist.

Einzigartige differentiell exprimierte Gene von *E. coli* KI683: Im Stamm-spezifischen Genpool waren nur 59 von 401 Genen differentiell exprimiert, der Prozentanteil an den gesamten differentiell exprimierten Genen betrug 5,4%. Interessanterweise befinden sich darunter drei gleiche Adhäsine-Gene *cdiA*, deren Produkte als kontakt-abhängige Wachstumsinhibitoren (CDI) fungieren (\log_2 0,05 bis 1,04) (Aoki *et al.*, 2010; Webb *et al.*, 2013b). Die Gene des putativen Plasmids pUT189, das in *E. coli* KI683

durch die *de novo*-Genomsequenzierung detektiert wurde (s. C4.2), befinden sich im einzigartigen Genpool, wurden aber nicht differentiell exprimiert.

Adhäsionsmechanismus: Bei *E. coli* KI683 handelt es sich um ein, an den planktonischen Zustand angepasstes Bakterium. Dafür sprechen die, in diesem Modus erhöhte Expression von Genen (*kps*), die zur Synthese einer Kapsel als Schutzschild notwendig sind, und der Besitz von Flagellen. Dazu sind Gene negativer Biofilm-Regulatoren (*bolA*, *bdm*, *bssR*, *bssS*) und Biofilm-beeinträchtigender Aminosäuren (*trp*, *met*, *tdc*) im sessilen Zustand in der Genexpression erhöht. Die Fähigkeit zur Adhäsion scheint nur gering ausgeprägt. Einmal adhäriert, aktiviert es EPS-assoziierte Gene (*eps*, *pga*), passt die Zellmembran an (Gene *fad*, *psp*) und verwendet wahrscheinlich Fimbrien und Flagellen als Anker (vgl. Abb. 10). Im adhärierten Zustand scheint eher ein Wechsel in einen ruhenden Zustand stattzufinden, der sich durch die geringere Expression für die, an der Translation beteiligten Gene (*rpl*, *rpm*, *rps*) und durch die Bildung von Filamentation (Gen *sulA*) abzeichnet. Durch die vergrößerte Membranfläche könnten knappe essentielle Nährstoffe effizient aufgenommen werden. Koloniformierungen wurden nie beobachtet, es traten nur einzelne, adhärierte Bakterien auf den Oberflächen auf.

5.5.3 Adhäsionsmechanismen von *E. coli* RV308

E. coli RV308 bildet keine Zellanhänge aus und wurde als stark adhärent klassifiziert. Obwohl es von den Bindungskapazitäten eher *E. coli* ATCC 25922 ähnelt, wurde überraschenderweise mehr als ein Fünftel des Genoms differentiell exprimiert. Die Mehrheit der differentiell exprimierten Gene gehörte, wie bei den vorher beschriebenen Stämmen, zum gemeinsamen Genom (zu 91,1%). Die Minimal- und Maximalwerte der differentiell exprimierten Gene reichten von \log_2 -6,20 bis 4,50. Eine Ausnahme waren Gene für die Quorum sensing-Maschinerie, die zum Stamm-spezifischen Genpool gehören.

Metallhomöostasen: *E. coli* verfügt über die beiden Gen-Cluster *isc* und *suf*, die Proteine zur Fe-S-Cluster-Biogenese kodieren. Die Gene *suf* sind nur unter Stressbedingungen aktiv, während die Gene *isc* zu den typisch konstitutiv exprimierten Genen gehören (Mettert & Kiley, 2014). *E. coli* RV308 aktivierte die Expression beider Gen-Cluster im sessilen Zustand (\log_2 1,31 bis 3,26), was auf eine erhöhte Fähigkeit zur Bildung von Fe-S-Clustern hinweist. Darüber hinaus steuert der Eisenregulator IscR (\log_2 2,22) die Biofilmbildung als Reaktion auf Änderungen der zellulären Fe-S-Homöostase, indem er die Genexpression von Typ 1-Fimbrien unterdrückt (Wu & Outten, 2009). Dabei war der Eisentransport durch Herunterfahren der Eisenaufnahmegene *feoABC* (\log_2 -3,65 bis -2,36) im adhärierten Zustand erheblich beschränkt. Andere Metallaufnahmegene mit differentieller Expression waren *nikABCDE* (\log_2 -3,04 bis -2,09) und *modF* (\log_2 2,27), die für die Regulation der Nickel- bzw. Molybdänaufnahme benötigt werden.

Aminosäuren- und Kohlenhydratmetabolismus: Zu den auffälligsten Stoffwechselwegen mit reduzierter Genexpression im sessilen Zustand gehörten die Biosynthesen für Asparagin und Leucin (*asn*, *leu*, \log_2 -3,49 bis -2,75). Darüber hinaus waren während der Adhäsion Zuckerstoffwechsel- und Transportsysteme von Maltose, Galaktose und Xylose aktiviert (*mal*, *gal*, *xyl*; \log_2 2,63 bis 4,5) und die Gene *ugp* des physiologisch eng verbundenen sn-Glycerol-3-Phosphat-Metabolismus stärker exprimiert (\log_2 1,54 bis 3,17). sn-Glycerol-3-Phosphate sind degradierte Reste von Phospholipiden, werden aber unter Phosphatmangel als Kohlenstoff- und Phosphatquelle genutzt (Brzoska & Boos, 1988; Wuttge *et al.*, 2012). Ein erhöhter Bedarf an Kohlenhydraten könnte mit kurzfristigen Überlebensstrategien zusammenhängen, die typischerweise für *E. coli*-Laborstämme beschrieben sind (Vital *et al.*, 2015).

Citratzyklus und Nukleotidbiosynthese: Die, für den Citratzyklus benötigten Gene *acnA* und *sdhA-D* (\log_2 1,68 bis 3,05) waren im adhären Zustand stärker exprimiert. Die erhöhte Aktivität des Citratzyklus' könnte dem erhöhtem Energiebedarf (z. B. ATP), der verringerten Leistung durch zu geringe Mengen an NAD(P)H und dem reduzierten Bedarf an Vorläuferstoffen für adhäsionsspezifische Biosynthesewege und zelluläre Prozesse geschuldet sein (Pisithkul *et al.*, 2019). Möglicherweise sind diese Vorgänge auch Grund für die reduzierten Expressionsraten von Purin- und Pyrimidinbiosynthesegenen (*pur*, *pyr*, \log_2 -3,76 bis -0,21). Parallel dazu sanken die Expressionsraten für die Pyrimidinkatabolismus-zuständigen Gene *rutA-G* (\log_2 -5,42 bis -1,87), die zu den Genen mit der stärksten negativ differentiellen Expression im Adhäsionszustand zählen. Der erhöhte Energiebedarf und die Einstellung der Nukleotidbiosynthesen könnten einerseits Zeichen sein, dass sich die Zellen vorrangig auf das Wachstum fokussieren, wobei die Zellteilung in den Hintergrund tritt. Andererseits könnte die unterschiedliche Genexpression von zentralen Stoffwechselwegen mit einer unterschiedlichen Substratverfügbarkeit in der sessilen und planktonischen Phase erklärt werden.

Fettsäure-Abbau: Die Degradation von Fettsäuren war in *E. coli* RV308 im Adhäsionszustand ebenfalls herunter reguliert (*fad*-Gene, \log_2 2,23 bis 4,40). Zusammen mit der katabolischen GABA-Biosynthese (*gabPDT*, \log_2 3,15 bis 3,93) fungieren sie als Regulatoren der Membranpermeabilität und Stickstoffressource (Dubois-Brissonnet *et al.*, 2016).

Gemeinsame differentiell exprimierte Gene von *E. coli* ATCC 25922 und KI683: Der gemeinsame Genpool von RV308 und ATCC 25922 beinhaltet 74 Gene, von denen 18 differentiell exprimiert sind (2,2% der Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene). Darunter befinden sich die Gene *cspB* und *cspI* (\log_2 2,45 bis 3,40), die für Kälteschockproteine kodieren und das Gen des negativen Biofilm-Regulators *ymgA* (\log_2 2,89). Weitere nicht-charakterisierte Gene wie *ymcE*, *yohP*, *ynfN*, *yjjY* und *ydfP* (\log_2 1,68 bis 3,40) gehören ebenfalls zur Gruppe differentiell exprimierter Gene. Mit *E. coli* KI683 teilt sich der Laborstamm RV308 lediglich fünf differentiell exprimierte Gene (0,6% der Gesamtzahl der

differentiell exprimierten Gene), wovon nur *ycdW* bemerkenswert stark differentiell exprimiert war (\log_2 3,43).

Einzigartige Gene von *E. coli* RV308: Der einzigartige Genpool von *E. coli* RV308 umfasst 479 Gene, von denen 117 als nicht-charakterisiert und 68 als putativ angegeben sind. Von den 479 Genen waren 48 Gene differentiell exprimiert, die 6,0% zur Gesamtanzahl der differentiell exprimierten Gene beitragen. Die Minimal- bis Maximalwerte der differentiell exprimierten Gene reichten von \log_2 -3,86 bis 4,44. Vorherrschend unter den differentiell exprimierten Genen war das Quorum sensing-System *lsr*. Während der Repressor LsrR in allen drei *E. coli*-Stämmen vorhanden ist, sind der Transporterkomplex LsrABCD, die Signalkinase LsrK, die Thiolase LsrF und die Isomerase LsrG nur in *E. coli* RV308 präsent. Sie waren im Adhäsionszustand stark exprimiert (\log_2 3,11 bis 4,44). Quorum sensing ist eine Form der Kommunikation mittels Autoinduktoren innerhalb einer Bakterienpopulation, die so koordiniert Biofilm-assoziiertes Gene wie das für Kolansäure-kodierende Gen *wza* (\log_2 1,83) und das Autoaggregationsgen *flu* (Antigen 43; \log_2 -0,22) regulieren können (Li *et al.*, 2007). Weiterhin waren die Gene für eine Putrescinverwertung nach der Adhäsion stärker exprimiert (*puuA*, -D und -P, \log_2 2,33 bis 3,58), wobei Putrescin als Energiequelle bei Abwesenheit von Glukose importiert wird (Schneider, Hernandez, & Reitzer, 2013). Zusätzlich war die Degradation von Phenylalanin über Phenylacetat induziert (*paalA-C*, -J, -F, -X und -Y, \log_2 1,13 bis 2,51). Außerdem befinden sich hier die LysR- und AraC-ähnlichen, globalen Transkriptionsfaktor-Gene *feaR*, *abgR*, *dmlR* und *hcaR* (\log_2 1,54 bis 3,30). Deren Genprodukte fungieren entweder als Aktivatoren oder Repressoren einzelner oder operonischer Gene, die für Enzyme von peripheren Stoffwechselwegen kodieren, und deswegen Selektionsvorteile bieten können. Beispielsweise ist HcaR in die Regulation der oxidativen Stressantwort involviert und ein positiver Regulator des *hca*-Operons, welches mitunter Dioxygenasen zum Abbau von 3-Phenylpropionat kodiert. 3-Phenylpropionat ist im menschlichen und tierischen Darm vorhanden. Das Vorhandensein von Abbauenzymen von 3-Phenylpropionat kann in diesen Umgebungen zur Abwehr von oxidativem Stress vorteilhaft sein (Turlin *et al.*, 2005).

Adhäsionsmechanismus: Der Laborstamm *E. coli* RV308 ist nicht motil und gelangte wahrscheinlich ausschließlich durch Sedimentation auf die Oberflächen, wo Quorum sensing-Gene (*lsr*) und die dazugehörige Kolansäure-Produktion aktiviert wurden (Gene *wza*), um einen initialen Kontakt für den Wechsel in sessiles Wachstum zu fördern. Flagellen-assoziierte Gene waren zwar aktiviert, aber Flagellen selbst werden nicht gebildet. Die erhöhte Zuckeraufnahme (Gene *mal*, *gal*, *xyl*) und die optimale Verwertung von Glycerol (Gene *ugp*), Putrescin (Gene *puu*), aromatischen Verbindungen (Gene *paa*) und Fettsäuren (Gene *fad*) liefern Energieresourcen.

5.5.4 Vergleich der Adhäsionsstrategien

Zusammenfassend können zwei wesentliche Feststellungen getroffen werden. Zum einen offenbaren die, durch Nährstoffmangel veränderte Genexpressionen ökologische Strategien, die das ursprüngliche Habitat der Bakterien reflektieren können. Zum anderen basierte die Adhäsion der drei Bakterienstämme auf unterschiedlichen Mechanismen.

Die klinischen Isolate *E. coli* ATCC 25922 und KI683 adaptierten sich innerhalb kurzer Zeit an die nährstoffarme Umgebung. Indikator für eine schnelle Adaption ist die erhöhte Expression von Genen, die für Schutzsysteme und für Biosynthesen von (Makro-)Molekülen zuständig sind, um langfristig Hungerbedingungen überleben zu können, wie sie außerhalb des menschlichen Darms und des Labors vorherrschen (Vital *et al.*, 2015). Beispiele für Schutzsysteme sind die Kapselbildung und Filamentbildung in *E. coli* KI683 und die hohe Expression der Gene für die Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase in beiden klinischen Isolaten. Beispiele für die Herstellung von Makromolekülen sind die erhöhten *de novo*-Purinbiosynthesen und die vermehrten Biosynthesen verschiedener Aminosäuren. Im Gegenteil dazu exprimiert der Laborstamm *E. coli* RV308 noch immer verstärkt Gene, die wachstumsfördernd sind. *E. coli*-Laborstämme passen sich durch jahrelange Kultivierung in Laboren an optimale Bedingungen an, die durch die Bereitstellung von ausreichenden Mengen an Nährstoffen, Sauerstoff und Wasser, sowie durch eine optimale Umgebungstemperatur und einen pH-Wert gekennzeichnet sind (Knöppel *et al.*, 2018; Tuttle, Trahan, & Son, 2021). Folglich bleibt Hauptaugenmerk der Energieeinsatz in die Nahrungsaufnahme, die durch die Aufnahme von Zuckern gekennzeichnet ist, und die Aufrechterhaltung des Citratzyklus.

Für die Adhäsion sind Zellanhänge wichtig, da sie den ersten Kontakt mit der Oberfläche und somit erste sensorische Signale vermitteln (Friedlander *et al.*, 2013; Geng *et al.*, 2014; Berne *et al.*, 2015; Gordon & Wang, 2019; Kimkes & Heinemann, 2019), jedoch wurde ersichtlich, dass im Fall von *E. coli* KI683 und RV308 für eine Anhaftung weitere Faktoren bedeutsam sind. *E. coli* KI683 adhärierte trotz vieler Zellanhänge nur schlecht, während *E. coli* RV308 trotz nicht-vorhandener Zellanhänge stark an Oberflächen adhärierte. Dabei verändert sich die Genexpression jeweils deutlich. Der Hauptanteil differentiell exprimierter Gene (> 84,2%) gehörte zum gemeinsamen Genom. Oft waren die gemeinsamen Gene aber unterschiedlich reguliert. Beispiele sind die sehr hohen Expressionsraten der Gene *nap* für die Stickstoffverwertung in *E. coli* ATCC 25922 im sessilen Modus oder die, für eine Kapselschicht kodierende Gene *kps* im planktonischen *E. coli* KI683. Einschlägige, das Adhäsionsverhalten betreffende Gene entstammen im Fall von *E. coli* RV308 dem Stamm-spezifischen Genpool. Als stärkster Einfluss wurden die Quorum sensing-kodierende Gene *Isr* ausgemacht. Die jeweiligen Systeme üben einen globalen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Bakterien aus. Diese

Erkenntnis ist vor allem deshalb interessant, da die gewonnenen Erkenntnisse für einen Stamm nur bedingt auf andere Stämme übertragen werden können.

Die hier identifizierten unterschiedlichen Eigenschaften können nur durch weitere strukturelle Untersuchungen substantiiert werden. Die beschriebenen Stoffwechselwege bieten jedoch die erforderlichen Anknüpfungspunkte, um zu einem besseren Verständnis der Regulationsmechanismen beizutragen.

6 Beteiligung von Genen unbekannter Funktion am Adhäsionsgeschehen

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, weisen die Stamm-spezifischen, transkriptionellen Regulationen auf verschiedene Adhäsionsstrategien hin. Interessant ist, dass, neben bereits mit Adhäsionsprozessen- und Biofilmbildung-assoziierten Genen, viele Gene aus dem sogenannten *y-ome* involviert sind. Das *y-ome* beinhaltet alle Gene, denen experimentelle Funktionsnachweise fehlen, die aber als Gene annotiert sind („*y*-Gene“). *y*-Gene werden als *uncharacterized*, *putative*, *hypothetical*, *pseudo genes* bezeichnet oder sehr grob als *proteins*, *inner membrane* oder *transporter* annotiert (Ghatak *et al.*, 2019). In den Genanreicherungsanalysen aller drei *E. coli*-Stämme waren Gene unbekannter Funktion unter den differentiell exprimierten Genen überrepräsentiert (Tab. S6) und sind somit wahrscheinlich an Adhäsionsprozessen beteiligt. Daher wurde gezielt nach Genen mit unbekanntem Funktionen gesucht und beispielhaft solche Gene deletiert und überexprimiert. Die Deletions- und Überexpressionsmutanten wurden hinsichtlich des Wachstums, des spezifischen Phänotyps, der Motilität und der Biofilmbildung charakterisiert und mit dem Wildtyp verglichen.

6.1 Auswahl von Genen für Deletions- und Überexpressionsmutanten

Die Auswertungen der Transkriptomsequenzierungsdaten legten nahe, dass viele noch unbekannte Gene an den Adhäsionsprozessen beteiligt sind. Um die Auswirkungen der Gendeletionen und -Überexpressionen in den drei Stämmen vergleichen zu können, wurden nur Gene aus dem gemeinsamen Genpool als Kandidaten betrachtet (vgl. Abb. 13). In die engere Auswahl gelangten außerdem nur Gene, die in allen drei Stämmen differentiell exprimiert waren (Abb. 17).

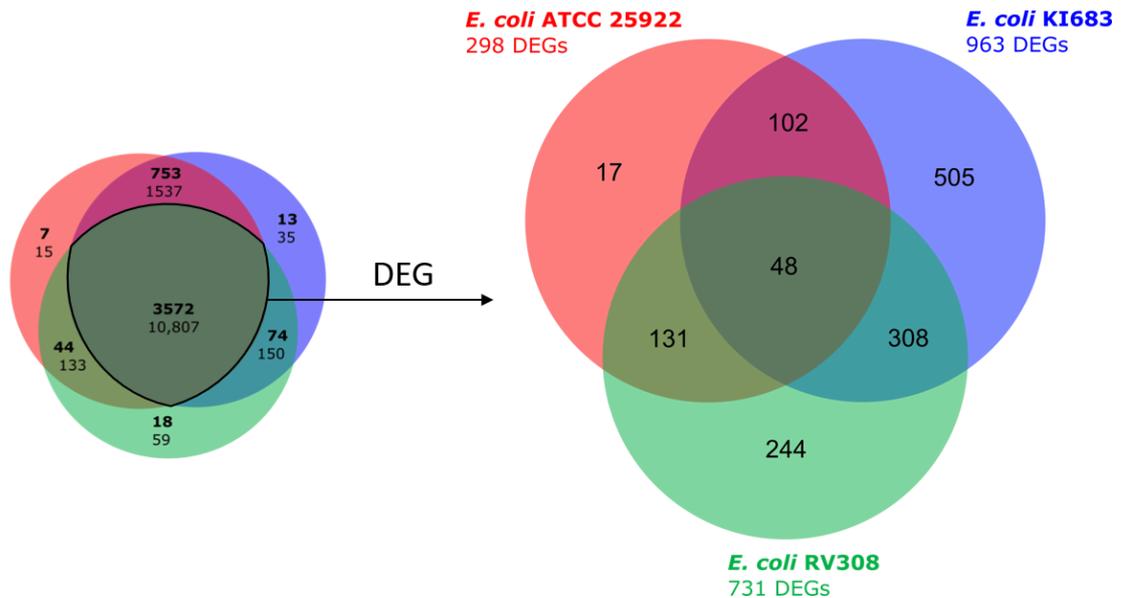


Abb. 17: Strategie zur Priorisierung von Genen zur Deletion und Überexpression. Extrapolierung der differentiell exprimierten Gene (DEG, rechts) aus dem gemeinsamen Genpool (links) von *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308.

48 Einzelkopie-Gene aus dem gemeinsamen Genpool waren in allen drei Stämmen differentiell exprimiert. Darunter befanden sich Gene, von denen bereits bekannt ist, dass sie an der Adhäsion und der Ausbildung von Biofilmen beteiligt sind, z. B. *bsmA* (Weber *et al.*, 2010), *iscR* (Wu & Outten, 2009), *glgS* (Rahimpour *et al.*, 2013), aber auch nicht-charakterisierte Gene, die ebenfalls zur Anhaftung beitragen könnten (Tab. S4). Die eigentliche Auswahl für Gendeletionen und -überexpressionen erfolgte nach deren putativen Funktionen. Die Gene gehörten sowohl zum gemeinsamen, als auch zum paarweisen Genpool der differentiell exprimierten Gene (Abb. 17, rechts). Folgende Gene wurden zur Gendeletion und -überexpression ausgewählt: *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* (Tab. 18).

Tab. 18: Die deletierten und überexprimierten Gene in *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308 mit zugehörigen differentiell exprimierten Genen zwischen den Konditionen adhärirt auf 2 nm und planktonisch (2 nm / pl). n.d.e.: nicht differentiell exprimiert.

Gen	Kodiert für	log ₂ FC (2 nm / pl)		
		ATCC 25922	KI683	RV308
<i>bolA</i>	DNA-binding transcriptional regulator	n.d.e.	3,41	1,67
<i>ygeV</i>	Uncharacterized σ^{54} -dependant transcriptional regulator	-2,10	1,50	2,40
<i>yaiY</i>	Inner membrane protein	-1,89	3,67	2,44
<i>ybgS</i>	Uncharacterized protein / Homeobox protein	n.d.e.	3,08	2,06
<i>yddM</i>	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator	n.d.e.	2,05	1,15

Das Gen *bolA* wurde als Kontrolle einbezogen, da dessen Einfluss auf das Wachstum, die Zellteilung, den Phänotyp und die Biofilmbildung bereits charakterisiert ist (Guinote *et al.*, 2014).

6.2 Klonierungsstrategien der Deletions- und Überexpressionsmutanten

Die in Tab. 18 aufgeführten Gene wurden in allen drei Stämmen sowohl deletiert, als auch überexprimiert. Nachfolgend sind die Klonierungsstrategien erläutert.

6.2.1 Deletionsstrategie

Alle Deletionen der in Tab. 18 aufgeführten Gene wurden mit dem Red/ET-Rekombinationsprozess durchgeführt (Abb. 4), mit dem Unterschied, dass hier nur der Selektionsmarker für die Konstruktion der Rekombinationskassette (Abb. 18A) gegen das Zielgen ausgetauscht und letzteres so deletiert wurde (Abb. 18B).

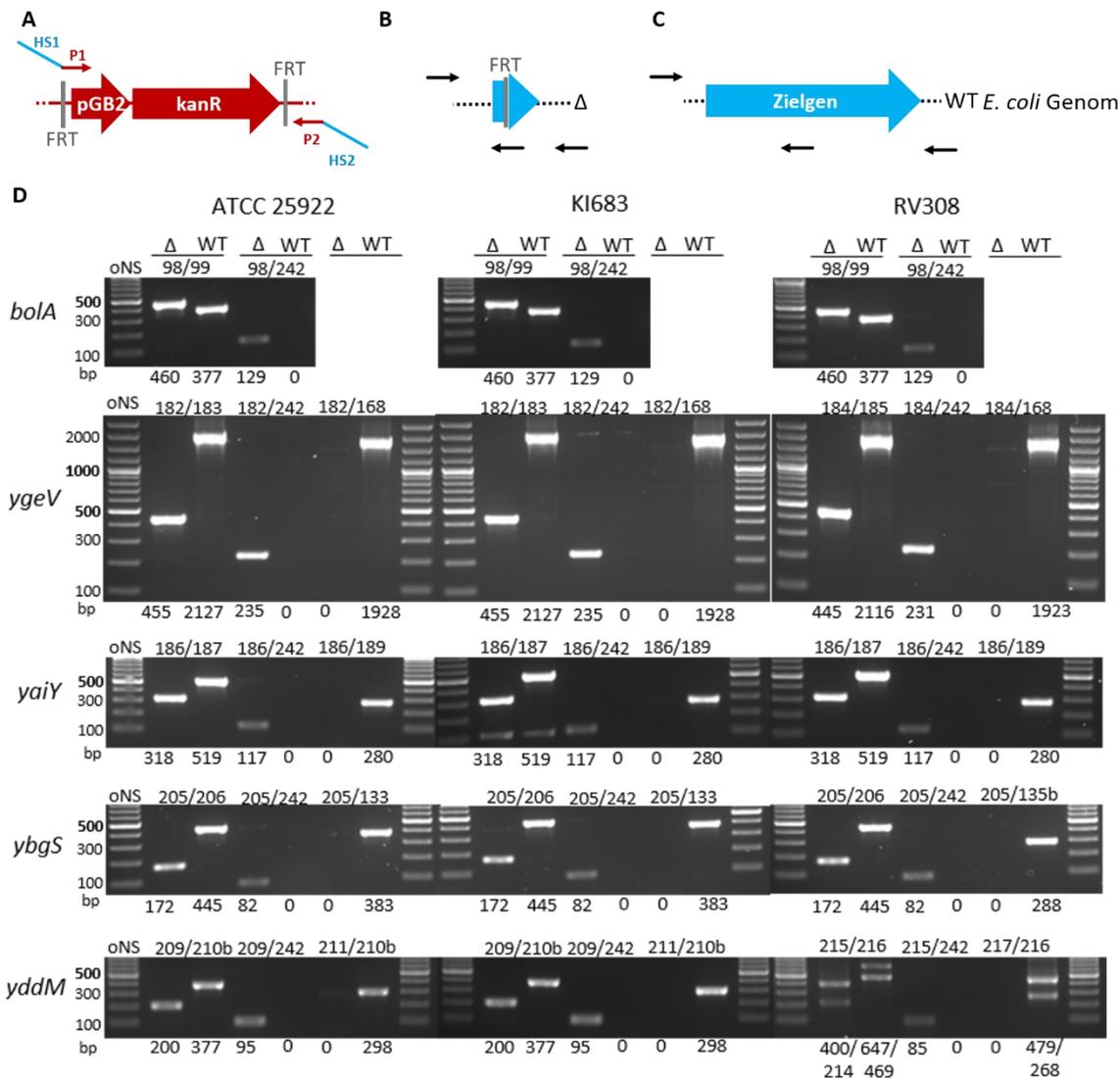


Abb. 18: Deletionsstrategie mittels Red/ET-Rekombinationsprozess. A) PCR-Amplifizierung einer linearen DNA-Integrationskassette mit homologen Sequenzen (HS) zum Zielgen *bolA**, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* (Primer aus Tab. 9). Durch den Red/ET-Rekombinationsprozess wird das Zielgen (B) durch das Kanamycin-Resistenzgen (*kanR*) unter der Kontrolle des Granzym B-Promoters (*pGB2*) und zwei flankierenden FLP *recognition target* (*FRT*) ersetzt. C) Die Integrationskassette wird durch den FLPe-Rekombinationsprozess ersetzt und hinterlässt eine *FRT*-Sequenz im deletierten Zielgen. D) Die Verifizierung der genomischen Integration erfolgt durch zwei bzw. drei Primerpaare (Pfeile in B) und C), Tab. 10). *Disruption.

Allerdings scheiterte diese Strategie für die Deletion von *bolA* in allen drei Stämmen. Das verweist entweder auf eine kompliziertere genomische Struktur um *bolA* oder das Gen ist für diese Stämme essentiell. Letzteres wurde ausgeschlossen, da eine Disruption erfolgreich war (Abb. 18D), bei der die *FRT*-Sequenz zwischen der 119. und 120. Base eingefügt werden konnte und das restliche Zielgen vorhanden blieb. Diese Disruptionsmutanten wurden für die nachfolgenden Untersuchungen zu *bolA*

verwendet. Für die übrigen Kandidaten *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* wurde das gesamte Gen deletiert (Abb. 18D). Die flankierenden 50 bp großen, homologen Sequenzen enthielten die 47 bp aufwärts plus das Startcodon des Zielgens und die letzten sieben Codons plus weitere 29 bp abwärts des Zielgens, die zu einer *in frame*-Deletion führen (Baba *et al.*, 2006). Dadurch sollten polare Effekte auf die nachgeschalteten Gene verhindert und die Teilexpression des Zielgens ausgeschlossen werden. Die Selektion erfolgte über das Kanamycin-Resistenzgen. Die Resistenz gegenüber Kanamycin könnte zu anderem Wachstums- und Reaktionsverhalten führen und eine Vergleichbarkeit mit den jeweiligen Wildtyp-Stämmen erschweren. Um solch eine Beeinflussung auszuschließen, wurde der Selektionsmarker, also das Kanamycin-Gen, nach der Selektion mittels FRT-Rekombination wieder entfernt. Zur Verifizierung des Genotyps nach Integration der Kasette und nach Entfernen des Selektionsmarkers wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Mit jeweils drei Primerpaaren wurde der korrekte Einbau des Selektionsmarkers und die vollständige Entfernung des Selektionsmarkers zwischen den FRT-Sequenzen verifiziert. Für *bolA* wurden, aufgrund der Disruption, nur zwei Primerpaare verwendet und diese Region wurde sequenziert, welche die Kanamycin-Gen-Exzision bestätigte.

6.2.2 Überexpressionsstrategie

Die heterologe Überexpressionen der in Tab. 18 aufgeführten Gene wurde durch Ligation des Zielgens direkt hinter den mit IPTG-induzierbaren Lac-Promoter im Plasmid pUC18 herbeigeführt. pUC18 wurde genutzt, da es unter Idealbedingungen hohe Kopienzahlen von 500 bis 700 erreicht (QIAGEN, 2013) und es daher nach Induktion des Promoters zu einer deutlichen Überexpressionen der Zielgene kommen sollte. pUC18 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacI* linearisiert. Die Zielgene aus Tab. 18 wurden mit Primern (Tab. 11) amplifiziert, deren Überhänge die Restriktionsschnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SacI* beinhalteten. Nach Verdau der PCR-Produkte erfolgte die Ligation der beiden Fragmente, die Transformation des ligierten Plasmids und die Selektion mittels Carbenicillin-Resistenz und Blau-Weiß-Screening. Kolonie-PCRs mit Primerpaaren, die jeweils die Region mit dem Ampicillin-Resistenzgen und dem Zielgen amplifizierten, und DNA-Sequenzierungen der Inserts verifizierten die korrekte Ligation. Zu Vergleichszwecken wurden die *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 mit dem unveränderten, leeren pUC18-Plasmid transformiert.

6.3 Wachstumsverhalten

Da das Wachstum der Mutanten in optimaler Umgebung überprüft werden sollte, wurde das Wachstumsverhalten im Gegensatz zu den *in vitro*-Adhäsionsassays mit lac-SBF in nährstoffreichem LB-Medium beobachtet. Der lac-SBF-Puffer eignet sich aufgrund seiner nährstoffarmen Zusammensetzung nur für kurze Inkubationszeiten unter 3 h. Nach diesem Zeitraum kommt es durch

die Nährstoffarmut zu einem Wachstumsstopp (Daten nicht gezeigt). Längere Beobachtungen des Wachstumsverhalten mit lac-SBF über den Zeitpunkt von 3 h hinaus sind daher nicht möglich. Alle Deletions- und Überexpressionsmutanten wurden somit für einen Zeitraum von 15 h unter Verwendung von LB-Medium und unter Schütteln bei 37 °C in einer 96-Multiwellplatte kultiviert und die Biomassezunahme als OD₆₀₀ gemessen (Abb. 19).

Jeder Stamm erwies sich als vital. Wie erwartet wiesen alle Stämme mit den Plasmiden (OE*Zielgen* und OE-Kontrolle) eine niedrigere OD₆₀₀ als die Wildtypen und Deletionsmutanten auf. Die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit aller Stämme in LB-Medium betragen im Mittel $\mu = 0,014 \pm 0,0013 \text{ min}^{-1}$ und $t_d = 51 \pm 6 \text{ min}$. Ausnahme war *E. coli* RV308 OE*bolA*. Hier verlief die exponentielle Phase sehr flach und die Bakteriendichte blieb gering. Die Wachstumsrate halbierte sich ($\mu = 0,007 \text{ min}^{-1}$), während sich die Verdopplungszeit fast verdoppelte ($t_d = 91 \text{ min}$).

Die Schwankungen der OD₆₀₀-Werte zwischen dem Wildtyp und den restlichen Mutantenstämmen von *E. coli* ATCC 25922 resultierten daraus, dass die Bakterien einen labilen Biofilm bildeten und dieser durch das Schütteln z. T. zerrissen wurde. Der Messstrahl erfasste entweder das helle Medium oder die dunkle Biofilmschicht. Dabei fällt auf, dass dies nur im Wildtyp- oder im deletierten Stamm zu sehen war, jedoch nicht bei allen Überexpressionen der getesteten Gene.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Gendelektionen und -überexpression von *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* in den drei *E. coli*-Stämmen mit Ausnahme von *E. coli* RV308 OE*bolA* keinen Einfluss auf das Wachstum hatten. Die Überexpression von *bolA* in *E. coli* RV308 beeinträchtigte das Zellwachstum.

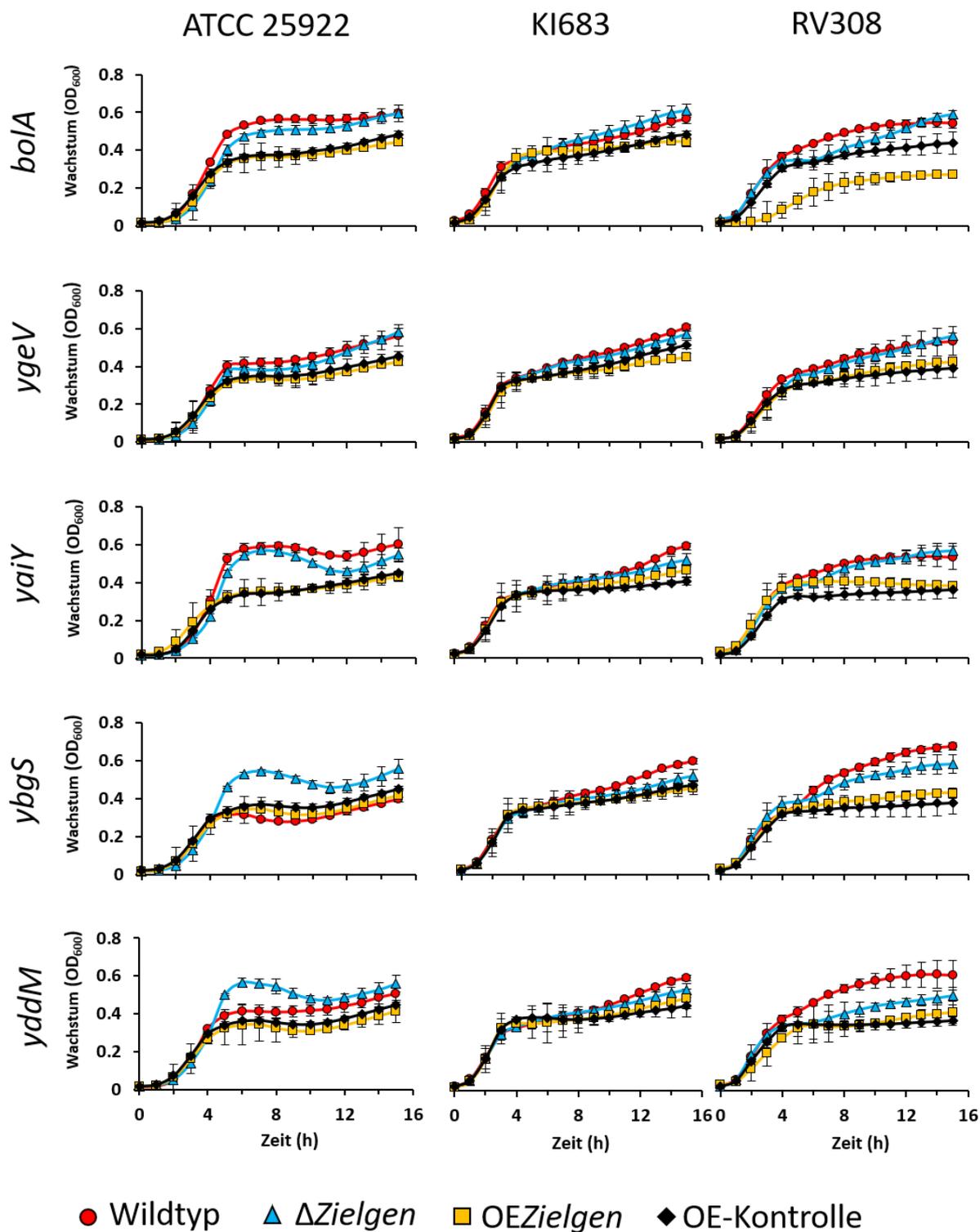


Abb. 19: Wachstumskurven der Stämme *E. coli* ATCC 25922 (rot), KI683 (blau) und RV308 (grün) mit deletierten oder überexprimierten Zielgenen. Δ : Disruption bzw. Deletion des Zielgens. OE: Überexpression vom Zielgen durch pUC18_plac_Zielgen. OE-Kontrolle: Plasmid pUC18 ohne Zielgen.

6.4 Phänotypische Charakterisierung

Die Morphologie von Makrokolonien hängt maßgeblich von den drei Biofilmkomponenten Curli-Fasern, Zellulose und Flagellen ab (Serra *et al.*, 2013c; Berne *et al.*, 2015). Bilden die Bakterien Curli-Fasern, also Amyloide, aus, so kann der Indikatorfarbstoff Kongorot daran binden und verursacht rote Kolonien. Werden keine Curli-Fasern gebildet, so bleibt die Kolonie weiß. Exopolysaccharide wie PGA, Zellulose oder Kolansäure verursachen auf den Makrokolonien raue Strukturen, die von kleinen Blasen bis zu komplexen 3D-Strukturen reichen können. Ansonsten bleiben die Makrokolonien glatt und rund. Wenn Flagellen ausgebildet werden und die Bakterien somit noch motil sind, können sie sich durch die weiche Konsistenz des Agar-Mediums fortbewegen und verursachen Trübungen. Alle oben beschriebenen Deletions- und Überexpressionsmutanten wurden jeweils auf Kongorot-haltigen LB-Agarplatten und Motilitäts-Agarplatten angezogen und die Ausbildung von Biofilmkomponenten wurde bewertet (Tab. 19, Abb. A3).

Tab. 19: Phänotypische Charakterisierung der verschiedenen Genotypen von *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308. Curli- und Zellulose-Nachweis durch Phänotyp der Makrokolonien auf Kongorot- und Coomassie Blau-haltigen LB- und LB_{Carb/IPTG}-Agarplatten nach 48 h Inkubationszeit. Hell- bis dunkelrote Färbungen der Makrokolonien wurden als vorhandene Curlibildung bewertet, weiße Färbungen als ausbleibende Curlibildung. Blasen oder andere dreidimensionale Strukturen der Makrokolonien wurden als vorhandene Zelluloseproduktion bewertet, glatte Oberflächen als ausbleibende Zelluloseproduktion. Motilitäts-Nachweis durch Ausprägung der Trübung in 0,3%igen LB- und LB_{Carb/IPTG}-Agarplatten nach 17 h Inkubationszeit. Δ: Disruption und Deletion des Zielgens. OE: Überexpression vom Zielgen durch pUC18_pLac_Zielgen. WT: Wildtyp. ✓: Komponente vorhanden. (✓): Komponente in eingeschränkter Form vorhanden. ✗: Komponente nicht vorhanden. Zugehörige Abbildung: Abb. A3.

ATCC 25922	Curli	Zellulose	Motilität	ATCC 25922	Curli	Zellulose	Motilität
WT	✓	✗	✓	OE+	✓	✗	✓
Δ <i>bolA</i>	✓	✓	✗	OE <i>bolA</i>	✓	✗	✓
Δ <i>ygeV</i>	✓	✓	(✓)	OE <i>ygeV</i>	✓	✗	✓
Δ <i>yaiY</i>	✓	✓	(✓)	OE <i>yaiY</i>	✓	✗	✓
Δ <i>ybgS</i>	✓	✗	(✓)	OE <i>ybgS</i>	✓	✗	✓
Δ <i>yddM</i>	✓	✗	(✓)	OE <i>yddM</i>	✓	✗	✓
KI683				KI683			
WT	✗	✗	✓	OE+	✓	✗	✓
Δ <i>bolA</i>	✗	✗	✓	OE <i>bolA</i>	✓	✗	✓
Δ <i>ygeV</i>	✗	✗	✓	OE <i>ygeV</i>	✓	✗	✓
Δ <i>yaiY</i>	✗	✗	✓	OE <i>yaiY</i>	✓	✗	✓
Δ <i>ybgS</i>	✗	✗	✓	OE <i>ybgS</i>	✓	✗	✓
Δ <i>yddM</i>	✗	✗	✓	OE <i>yddM</i>	✓	✗	✓
RV308				RV308			
WT	✗	✗	✗	OE+	✓	✗	✗
Δ <i>bolA</i>	✗	✗	✗	OE <i>bolA</i>	✓	✓	✗
Δ <i>ygeV</i>	✗	✗	✗	OE <i>ygeV</i>	✓	✓	✗
Δ <i>yaiY</i>	✗	✗	✗	OE <i>yaiY</i>	✓	✗	✗
Δ <i>ybgS</i>	✗	✗	✗	OE <i>ybgS</i>	✓	✓	✗
Δ <i>yddM</i>	✗	✗	✗	OE <i>yddM</i>	✓	✓	✗

Die Auswirkungen der Gendeletionen und der -überexpressionen waren nicht für jeden Stamm gleich. So führten die fünf Gendeletionen des *E. coli*-Stammes ATCC 25922 zu einer verlangsamten oder gestörten Bildung von Flagellen, was zu einer verminderten Motilität der Bakterien führte. In den Deletionsmutanten *E. coli* ATCC 25922 $\Delta bolA$, $\Delta ygeV$, $\Delta yaiY$, $\Delta ybgS$ und $\Delta yddM$ fehlten die Flagellen, wie in den REM-Aufnahmen von *E. coli* ATCC 25922 $\Delta yddM$ exemplarisch zu sehen ist (Abb. A5). Die Makrokolonien der Deletionsmutanten $\Delta bolA$, $\Delta ygeV$ und $\Delta yaiY$ wiesen blasenartige Strukturen auf, was auf eine vermehrte Zelluloseproduktion hindeutet.

In *E. coli* KI683-Bakterien verursachte keine der Gendeletionen eine phänotypische Veränderung der drei Komponenten Curli, Zellulose und Motilität. Im Gegensatz dazu führten die jeweilige Überexpressionen der Gene *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* einschließlich der Kontrolle mit dem Leerplasmid pUC18 zu einer erhöhten Curli-Bildung.

Ein ähnliches Bild, die erhöhte Curli-Bildung nach Transformation mit dem Leerplasmid pUC18, aber auch alle fünf Genüberexpressionen von *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM*, ergab sich für *E. coli* RV308. Zusätzlich steigerten die Überexpressionen der Gene *bolA*, *ygeV*, *ybgS* und *yddM* in *E. coli* RV308 die Zellulosemenge, was an strukturierten Makrokolonien nachweisbar war. Dabei war die Makrokolonie von *E. coli* RV308 OE*bolA* am auffälligsten strukturiert und sehr flach im Vergleich zu den Makrokolonien der anderen vier Überexpressionsmutanten OE*ygeV*, OE*yaiY*, OE*ybgS* und OE*yddM*. Ein defizitäres Wachstum für den Stamm *E. coli* RV308 OE*bolA* konnte bereits festgestellt werden (vgl. Abb. 19, RV308 OE*bolA*). Hintergrund könnte sein, dass BolA mit den Zellform-bestimmenden Zytoskelettprotein MreB und dem Zellteilungsprotein FtsZ interferiert (Aldea *et al.*, 1988; Guinote *et al.*, 2014). Konsequenz daraus sind runde statt stäbchenförmige Bakterien (s. Anhang Abb. A4) und ein reduziertes Zellwachstum, was für *bolA*-Überexpressionen in anderen K-12-Stämmen bekannt ist (Aldea *et al.*, 1988; Freire, Neves Moreira, & Arraiano, 2009; Dressaire *et al.*, 2015). Interessanterweise hatte die Überexpression von *bolA* in den klinischen Isolaten nicht diesen Effekt.

Bis hierhin lässt sich zusammenfassen, dass die Gendeletionen und -überexpressionen nicht dieselben Auswirkungen in allen drei Stämmen haben. So verursachten die Gendeletionen von *bolA*, *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* in *E. coli* ATCC 25922 eine reduzierte Motilität, aber nicht in *E. coli* KI683. Die Überexpression von *bolA* führte nur im Laborstamm RV308 zu einer runden Zellform. Diese Erkenntnisse sind zumindest teilweise überraschend, da einem Gen in der Regel eine konkrete Funktion zugeordnet ist. Es zeigt sich hier die Komplexität, wie unterschiedlich sich Gendeletionen und -überexpressionen in verschiedenen Stämmen derselben Spezies auf den Phänotyp auswirken können.

6.5 Biofilmbildung

Falls die phänotypischen Veränderungen der Makrokolonien eine Beteiligung der ausgewählten Gene (Tab. 18) am Adhäsionsgeschehen repräsentieren, sollten auch Auswirkungen auf die Fähigkeit der entsprechenden Mutanten zur Biofilmbildung vorhanden sein. Um diesen Aspekt zu überprüfen, wurde die Biofilmbildung aller Mutanten mit Kristallviolett-Assays studiert (Abb. 20).

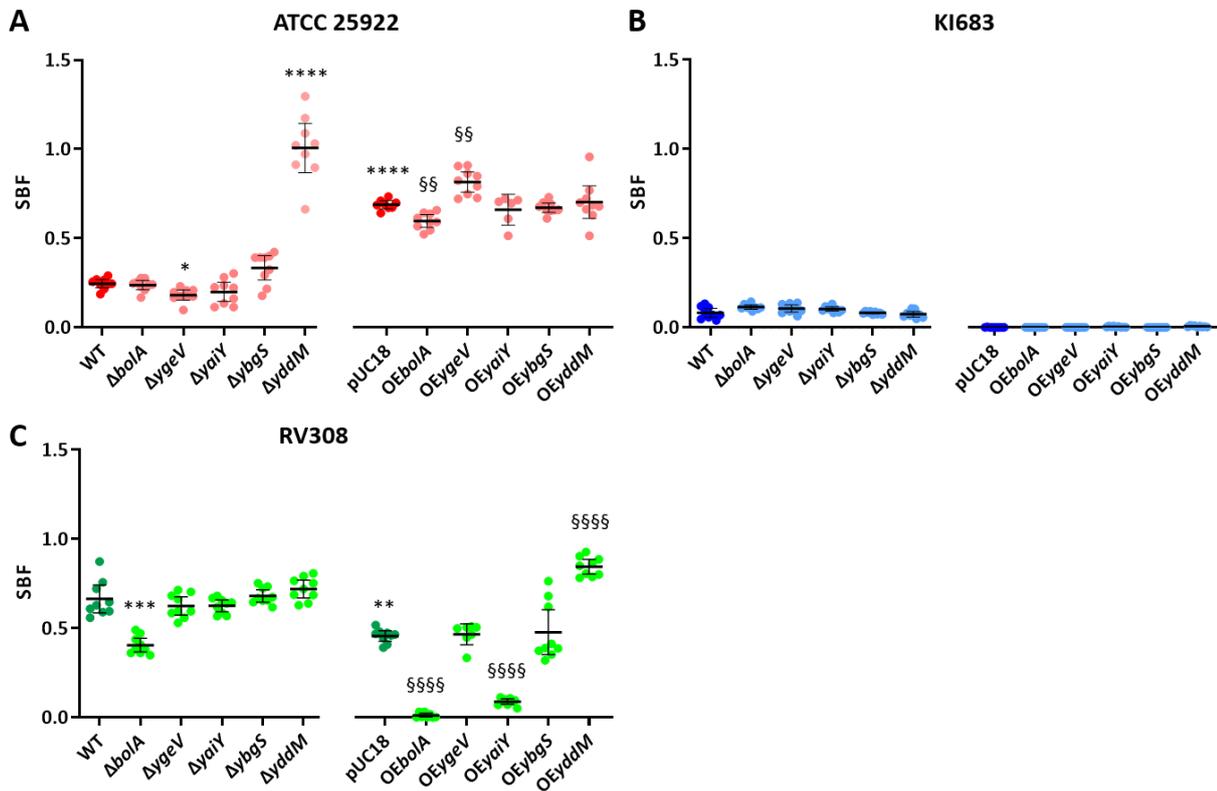


Abb. 20: Kristallviolett-Messung der Deletions- und Überexpressionsmutanten zur Ermittlung der spezifischen Biofilmbildung (SBF). Die Werte sind für die Deletionsstämme auf den jeweiligen Wildtyp (WT) und für die Überexpressionsstämme (OE) auf den jeweiligen Wildtyp mit pUC18-Plasmid normalisiert (pUC18). $SBF = (AB - CW) / (G - GCW)$. AB: gefärbte, adhärenierte Bakterien; CW: gefärbte Kontrollwells, G: Wachstum in planktonischer Kultur, GCW: Kontrollwells mit Medium. Ungepaarter t-Test. * = Kontrolle WT. § = Kontrolle pUC18. ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

Die unter C5.5.1 bis C5.5.3 herausgearbeiteten Adhäsionsstrategien bestätigten sich auch hinsichtlich der Kapazität zur Biofilmbildung. Nach 24 h erwiesen sich erneut die *E. coli*-Stämme RV308 und ATCC 25922 als stark bis moderat adhärenierend, im Gegensatz zum nur schwach bindenden Stamm *E. coli* KI683. Erstaunlicherweise hatte der Besitz des Plasmids pUC18 ohne eingefügtes Zielgen, einen sichtbaren Einfluss auf die Biofilmbildung, wie schon zuvor auf LB-Agarplatten nach Färbung mit Kongorot: In *E. coli* ATCC 25922 war die Biofilmbildung vermehrt, im Stamm RV308 jedoch vermindert. Außerdem ist die Biofilmbildung von *E. coli* ATCC 25922 Δ yddM und RV308 OEyddM erheblich vermehrt (Abb. 20A). Deutlich vermindert ist sie in RV308 Δ bolA, OEbolA und OEyaiY (Abb. 20C).

Weder die Deletionsmutanten noch die Überexpressionsmutanten von *E. coli* KI683 verursachten Biofilm-begünstigende Effekte (Abb. 20B).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Deletions- und Überexpressionsmutationen in den drei Stämmen die Biofilmbildung unterschiedlich beeinflussten. Die gewonnenen Resultate veranschaulichen erneut, dass sich Rückschlüsse hinsichtlich der Adhäsion und Biofilmbildung nur bedingt von einem Stamm auf andere Stämme übertragen lassen und dass das eingesetzte Medium eine entscheidende Rolle spielt.

6.6 *yddM* als Regulator des Toxin-Antitoxin-Paars *higB/higA*

Obwohl *yddM* in *E. coli* ATCC 25922 nicht differentiell exprimiert und in *E. coli* RV308 nur unter Adhäsionsbedingungen geringfügig stärker exprimiert wurde, hatten die Deletion bzw. die Überexpression eine vermehrte Biofilmbildung (Abb. 20) und eine verminderte Flagellenbiosynthese zur Folge (Tab. 19, Abb. A5). Eine starke differentielle Genexpression muss somit nicht immer ein Indiz für einen relevanten Phänotyp liefern. *yddM* ist ein nicht-charakterisierter HTH-Transkriptionsfaktor (TF) der Xre-Familie, von dem weder biochemische Charakterisierungen, noch biologische Funktionen oder homologe Gene bekannt sind. Laut einer String-Analyse (string-db.org, v11.0) ist das Toxin-Antitoxinpaar *higB/higA* im Genom in unmittelbarer Umgebung und zeigt anhand der Nähe eine mutmaßliche regulatorische Rolle dieses Zweikomponentensystems an. Hintergrund ist, dass die Genexpression ortsabhängig ist, da die transkriptionelle Aktivität dicht aneinandergrenzender Gene mit dem negativen Supercoiling-Zustand des Genoms korreliert und beeinflusst wird (Cagliero *et al.*, 2013; Goormans *et al.*, 2020). Seit Langem werden verschiedenen Toxin-Antitoxin-Systemen Schlüsselfunktionen bei der Bildung von Biofilmen zugeschrieben (Kim *et al.*, 2009). Um einen möglichen Zusammenhang von *yddM* und *higB/higA* auf die Biofilmbildung in *E. coli* ATCC 25922 und RV308 nachzuweisen, wurde die Expression der Gene *yddM*, *higB* und *higA* im planktonischen und Biofilmzustand in den verschiedenen Stämmen mit qRT-PCR bestimmt (Abb. 21).

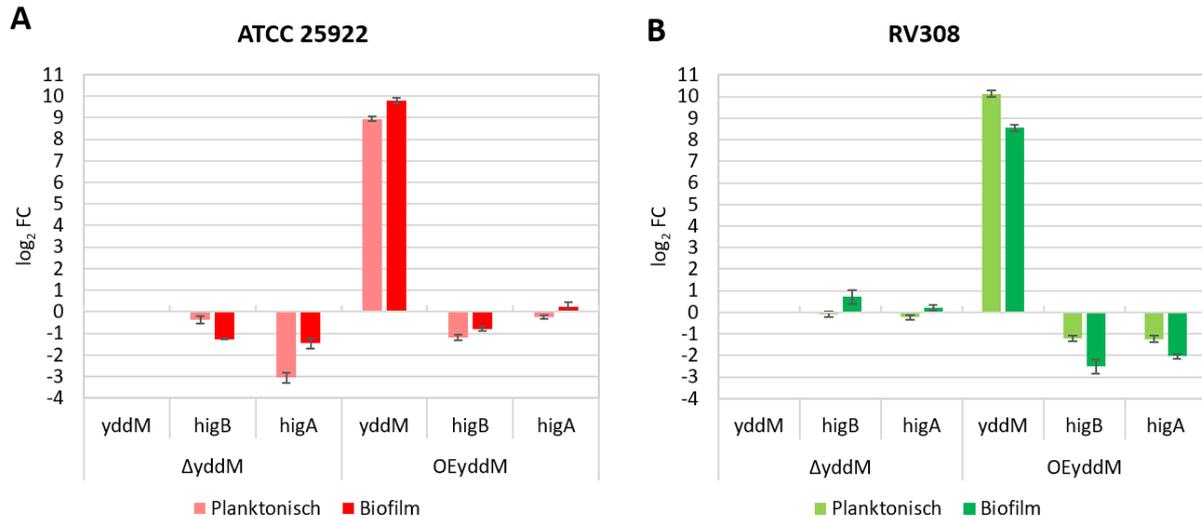


Abb. 21: qRT-PCR der Zielgene *yddM*, *higB* und *higA*. A) *E. coli* ATCC 25922 $\Delta yddM$ relativ zu ATCC 25922 Wildtyp bzw. ATCC 25922 OEyddM relativ zu pUC18. B) *E. coli* RV308 $\Delta yddM$ relativ zu Wildtyp bzw. *E. coli* RV308 OEyddM relativ zu pUC18.

Die *yddM*-Deletion in *E. coli* ATCC 25922 im planktonischen Zustand zog eine verminderte *higA*-Expression nach sich, während die Genexpression von *higA*- und *higB* im Biofilm gleichblieb. In den Überexpressionsmutanten von *yddM* wurden keine signifikanten Erhöhungen der *higB*- und *higA*-mRNA-Level verzeichnet. Noch geringer sind die Unterschiede in *E. coli* RV308 $\Delta yddM$: die *higB*- und *higA*-Expressionen verbleiben im Bereich der Basalexpression. Ein anderes Bild zeigt sich bei der *yddM*-Überexpression. Die Gene *higB* und *higA* waren, im Gegensatz zum Wildtyp mit pUC18-Plasmid als Kontrolle, deutlich weniger exprimiert ($> \log_2 2$). Es könnte somit ein Zusammenhang zwischen *yddM* und der Regulation von *higB/A* bestehen. Unklar bleibt allerdings, wie die Signale regulatorisch zusammenhängen. Insgesamt betrachtet ist wieder erstaunlich, wie differenziert sich die gleiche Mutation Stamm-spezifisch manifestiert.

D DISKUSSION

Die Forschung über die Interaktion zwischen Bakterien und Oberflächen ermöglicht es, zwei Untersuchungsgegenstände näher zu beleuchten. Zum einen kann die Anhaftung von Bakterien observiert und charakterisiert werden. Zum anderen können Oberflächen mit bestimmten antibakteriellen Eigenschaften auf ihre biologische Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit getestet werden. Ein tiefgreifenderes Verständnis beider Bereiche kann u.a. zur besseren Verhinderung von Biofilmen beitragen. Im ersten Ergebnisteil der Arbeit wurden die *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 vorgestellt und deren Bindungspotential auf nanorauen Titanoberflächen charakterisiert. Parallel dazu wurden die nanorauen Titanoberflächen auf einen antiadhäsiven Effekt evaluiert. Im zweiten Ergebnisteil wurde die Interaktion der drei *E. coli*-Stämme mit der Oberfläche auf Basis von Transkriptomsequenzierungen analysiert und drei individuelle Adhäsionsmechanismen wurden herausgearbeitet. Im dritten Ergebnisteil wurde die Auswirkung ausgewählter, bisher nicht-charakterisierte Gene im Hinblick auf deren phänotypischen Auswirkung und Beteiligung an der Adhäsion untersucht. *E. coli* ATCC 25922 besitzt Flagellen zur Motilität, Fimbrien und Curli. *E. coli* KI683 bildet sowohl Flagellen, als auch Fimbrien aus. Dahingegen besitzt der Laborstamm RV308 keinerlei Zellanhänge und ist nicht motil. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass das Vorhandensein vieler Zellanhänge nicht zwangsläufig zu einer besseren Adhäsion führt. Z. B. haftete *E. coli* KI683 schlecht auf den Oberflächen an, während der Zellanhangs-freie *E. coli* RV308 deutlich stärker adhärierte. Es wurde auch gezeigt, dass der Bereich der Nanostrukturen von $R_a = 2 - 16$ nm weder die bakterielle Adhäsion, noch die Genexpression veränderte.

Im ersten Teil der Diskussion (Abschnitte 1.1 bis 1.4) wird der Einfluss der nanorauen Titanoberflächen auf die *E. coli*-Bakterien, anhand der quantitativen und qualitativen Bildanalyse und den Daten aus den Transkriptomsequenzierungen diskutiert. Die ausgewählten Stämme unterschieden sich vor allem hinsichtlich solcher morphologischen Eigenschaften, die in der Literatur als wesentlich für die Adhäsion auf abiotischen und biotischen Oberflächen diskutiert werden. Im zweiten Teil folgen die technischen und generellen Aspekte der RNA-Sequenzierung (Abschnitte 2.1 und 2.2). Spezifische Adhäsionsmechanismen, die aus dem Vergleich der Daten der Transkriptomsequenzierung zwischen adhärierten und planktonischen Bakterien extrapoliert wurden, werden darauffolgend näher erörtert (Abschnitte 2.3.1 bis 2.3.5). Der dritte Teil befasst sich mit den Auswirkungen der Gendeletionen- und -überexpressionen der nicht-charakterisierten Gene, die das Adhäsionsverständnis weiter erschließen (Abschnitt 3). Im vierten und letzten Teil wird der Einfluss von Proteinanlagerungen auf Oberflächen besprochen (Abschnitt 4).

1 Die Topographie nanorauer Oberflächen beeinflusst weder die Adhäsion noch die Genexpression der untersuchten *E. coli*-Stämme

Nanoraue Oberflächen als passive Strategie gegen bakterielle Adhäsion zeigten in der Vergangenheit eine antiadhäsive Wirkung (Li & Logan, 2004; Ivanova *et al.*, 2010, 2011; Singh *et al.*, 2011, 2013; Hsu *et al.*, 2013; Friedlander *et al.*, 2013; Lüdecke *et al.*, 2016; Spengler *et al.*, 2019; Dauben *et al.*, 2020). Um eine eventuelle Rauigkeitsabhängigkeit nachzuweisen, wurde die Adhäsion der drei phänotypisch unterschiedlichen *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 auf Titanoberflächen mit einer Rauigkeit von $R_a = 2 - 16$ nm untersucht. Der Bereich der Rauigkeit wurde angepasst auf die Durchmesser der bakteriellen Zellanhänge konzipiert.

1.1 Schwankungen der Bakterienzahlen pro Bild resultieren nicht aus der ungenügenden Anzahl von Bildern

Die Quantifizierung der adhärenierten Bakterien ergab, dass Stamm KI683 ein geringes und die Stämme ATCC 25922 und RV308 ein hohes Bindungspotential auf nanorauen Oberflächen besitzen (Abb. 9). Auffällig war aber die große Schwankung der Bakterienzahlen pro Bild. Als Ursache wurde zunächst eine unzureichende, nicht-repräsentative Abdeckung der zur Bewertung herangezogenen Teilfläche angenommen, die 3,2% pro Oberfläche betrug (15 Bilder, Abb. 9). Vergleichbare Studien nutzten sogar eine deutlich geringere Teilfläche zur Evaluierung ihrer Daten: 0,00086% (Ivanova *et al.*, 2010), 0,3% (Singh *et al.*, 2011) und 0,1 % (Lüdecke *et al.*, 2013, 2014, 2016). Mit einer Bootstrapping-Analyse wurde dann auch nachgewiesen, dass die in dieser Studie aufgenommenen 15 Bilder pro Stamm und Rauigkeit für die Verteilung der Bakterien auf den Oberflächen repräsentativ waren. Hierfür wurde die Oberfläche eines Titanplättchens (1,76 cm²) mit adhärenierten *E. coli* ATCC 25922 vollständig in Einzelbildern aufgenommen, stichprobenartig tausendmal 1 – 50 Bilder gezogen und der Mittelwert bestimmt (Abb. 22).

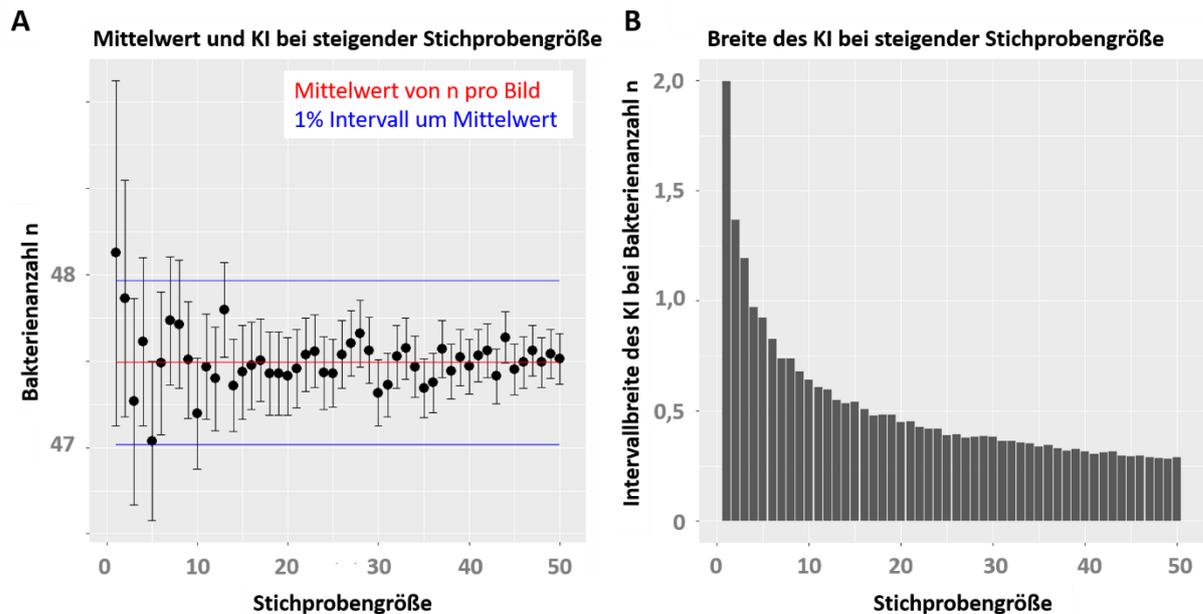


Abb. 22: Schätzung einer geeigneten Bildanzahl pro Oberfläche (=repräsentative Bildfläche) mittels Bootstrapping-Verfahren. A) Mittelwert und Konfidenzintervall (KI) der Bakterienanzahl pro Bild. B) Intervallbreite des KI. Bootstrapping-Verfahren in Zusammenarbeit mit Bianca Hoffmann (Leibniz-HKI, Angewandte Systembiologie).

Als Kriterium für eine statistisch zuverlässige Anzahl an Bildern wurde bestimmt, dass das Konfidenzintervall der gezogenen Bilder innerhalb des 1%-Bereiches um den wahren Mittelwert liegen sollte. Das ist hier ab 13 Einzelbildern immer der Fall (Abb. 22A). In Abb. 22B ist die Breite des Konfidenzintervalls über die verschiedenen Stichprobengrößen aufgetragen, um die Streuung der Werte zu verdeutlichen. Die Werte ändern sich mit größer werdender Stichprobengröße immer weniger. Insgesamt bedeutet das, dass die 15 Bilder einer zuverlässigen Schätzung entsprechen und im Gegensatz zu den vergleichbaren Studien ein präziseres Bild der Realität vermitteln. Außerdem wurde sehr deutlich, dass *E. coli* ATCC 25922, bezogen auf das binarisierte Bild, größtenteils homogen auf der Oberfläche verteilt war. Die festgestellte Schwankung der Bakterienzahl pro Bild ist also nicht durch die Zahl der Bilder verursacht worden. Daher wurde der Einfluss der Experimente selbst untersucht. Die Daten für die Bildanalyse stammen aus sieben unabhängigen Experimenten (Abb. A1A), deren Daten auf die Adhäsion von *E. coli* ATCC 25922 auf 2 nm-rauen Titanoberflächen normalisiert wurde. Deutliche Unterschiede in den absoluten Zahlen und atypische Verläufe zweier Experimente wurden als Ursache der Schwankungen der Bakterienzahlen pro Bild ausgemacht. Während im vierten Experiment weniger Bakterien vom Laborstamm RV308 detektiert wurden, fand im siebten Experiment der sonst wenig bindende *E. coli* KI683 auf dem hohen Niveau von *E. coli* ATCC 25922. Obwohl die letztgenannten Experimente als Ausnahme deklariert wurden und mit der biologischen Variabilität begründbar sind, wurden sie in die Analyse einbezogen. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass das für die Bildanalyse verwendete Datenmaterial repräsentativ für das

Adhäsionsverhalten der Testmikroorganismen war, deren Adhäsion selbst aber großen biologischen Schwankungen unterliegt.

1.2 Nanorauere Oberflächen im Bereich von 2 bis 16 nm affektieren die Anzahl adhärerter Bakterien nicht

Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwar hinsichtlich der bakteriellen Adhäsion auf nanorauen Oberflächen gefunden (Abb. 9B), z. B. für den Vergleich zwischen 2 und 12 nm in *E. coli* KI683 und RV308. Jedoch konnte für keinen der Stämme der, durch die Power Analyse ermittelte, notwendige Unterschied von einer halben Standardabweichung, nachgewiesen werden (Abb. 8, Abb. 9). Ein statistisch signifikantes Ergebnis spiegelt keine biologische Relevanz wider, da die statistische Signifikanz nur ein Teil einer gut konzipierten Studie ist. Dennoch wird in den meisten Studien die statistische Signifikanz als Beweiskraft gegen die Nullhypothese angeführt. Daher wird zum Vergleich der Ergebnisse aus dieser Arbeit mit anderen Studien der p-Wert genutzt. In vergleichbaren Studien war eine vermehrte Adhäsion von *E. coli* K-12 BHB 2688 und *P. aeruginosa* NCIB 8650 auf Titanoberflächen mit steigender Rauigkeit (RMS) von 16,2 – 21,7 nm festgestellt worden (Singh *et al.*, 2013). Webb *et al.* (2013) konnte ebenfalls mit ansteigender Rauigkeit im Sub-Nanometerbereich von $R_a = 0,14 - 0,4$ nm eine vermehrte Adhäsion von *S. aureus* CIP 65.8^T feststellen, wohingegen *P. aeruginosa* ATCC 9027 nicht affiziert wurde. Die Adhäsion von *S. aureus* CIP 65.8 war auf Titanoberflächen mit $R_a = 0,18 - 0,52$ nm (Ivanova *et al.*, 2011) und $R_a = 0,7 - 1,6$ nm (Ivanova *et al.*, 2010) mit zunehmender Rauigkeit reduziert. In derselben Studie war die Adhäsion von *P. aeruginosa* ATCC 9027 ebenfalls nicht affiziert. In allen Studien wurden die bakterielle Zellmembran und die Morphologie als mögliche Ursache diskutiert. In Lüdecke *et al.* (2016) war die Adhäsion von *E. coli* RV308 und *S. aureus* HG003 auf Titanoberflächen mit $R_a = 4,82$ nm im Gegensatz zu Titanoberflächen mit $R_a = 1,58 - 1,81$ nm reduziert. Sogenannte Nanokontaktpunkte sollten die Auflagefläche des Bakteriums reduzieren und somit eine verminderte Adhäsionskraft induzieren. Unterschiedliches Adhäsionsverhalten könnte allerdings auch durch die Chemie des Materials bestimmt werden und nicht nur von der Topographie abhängen, da die Oberflächen nicht in jeder Studie mit PVD hergestellt wurden. In den genannten Studien wurden zudem verschiedene Spezies untersucht, was eine direkte Vergleichbarkeit erschwert. Andere Studien mit *E. coli*-Bakterien und Oberflächen, die ähnliche und höhere Rauigkeitsprofile, als die in dieser Arbeit vorgestellten, besitzen, hatten ebenfalls keine Unterschiede in der Anzahl adhärerter Bakterien auf nano-strukturierten Oberflächen ergeben. Acht Bakterienstämme, darunter drei *E. coli* K-12 Stämme JM109, D21 und D21f2, wurden auf Glas- und Metalloxid-Oberflächen mit $R_a = 4,3 - 17,6$ nm getestet, ohne dass ein Effekt der Oberflächenrauigkeit auf die Bakterienadhäsion erkennbar war (Li & Logan, 2004). Rizzello *et al.*, 2011 fanden zwischen

weitaus größeren Abständen von $R_a = 0,36$ nm und $R_a = 99,8$ nm mit *E. coli*-Bakterien K-12-TG1 ebenfalls keinen quantitativen Unterschied. Dasselbe Ergebnis wurde bei der Adhäsion von *E. coli* BW25113 auf Polycarbonat-Oberflächen mit einer variierenden Verteilung an Nanosäulen von 25 nm-Höhe festgestellt (Kallas *et al.*, 2020). In Studien mit anderen Organismen hatten 160 – 220 nm raue Titanoberflächen ebenfalls keinen Einfluss auf die frühe bakterielle Adhäsion von *Streptococcus sanguinis* und *Actinomyces naeslundii* (Fröjd *et al.*, 2011). Sogar 500 nm-große Silikon-Nanosäulen mit verschiedenen Abständen von 200 – 800 nm resultierten nicht in einer verminderten Adhäsion von *S. aureus* (Hizal *et al.*, 2016). In letzteren Studien sind die Bereiche der Rauigkeiten weitaus weniger fein nuanciert, denn Nanostrukturen von 2 bis 16 nm werden als vergleichsweise “glatt” bezeichnet. Jedoch zeigen sie, dass selbst größere Abstände zwischen den Peaks nicht zu einer Reduzierung von Bakterien führen. Ein Trend, welche Abstände oder Rauigkeiten einen antiadhäsiven Effekt bewirken, ist nicht erkennbar (Cheng *et al.*, 2019). Dagegen werden mechanisch-bakterizide Oberflächen mit einem Durchmesser von 10 bis 100 nm als optimal für einen bakteriziden Effekt erachtet, da diese Größenordnung mit der der Zellmembran von Bakterien korrespondiert (Linklater *et al.*, 2018). Solche Strukturen sind der Natur entlehnt und imitieren z. B. die Flügeloberfläche einer Libelle (Ivanova *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2020). Durch die Nagelbrett-ähnlichen Nanospitzen wird die Zellmembran perforiert und eine Zellteilung verhindert. So konnten in Widyaratih *et al.* (2019) Topographien mit 100 nm-hohen Säulen einen bakteriziden Effekt durch Deformationen der Zellmembran hervorrufen, wohingegen die 21 nm-hohen Säulen, die mit den 16 nm-rauen Titanoberflächen vergleichbar sind, keine morphologischen Änderungen der Zellen bewirkten. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Bakterien auf der umgebenden glatten Oberfläche vermehrt adhärten, was allerdings nicht quantifiziert wurde. Festzuhalten ist, dass ein geringer p-Wert kein Indikator für eine tatsächliche antiadhäsive Wirksamkeit sein muss. Die Tatsache, dass viele Studien aufgrund eines geringen p-Wertes von einem antiadhäsiven Effekt sprechen, ist dahingehend problematisch. *In vitro*-Untersuchungen können nur ein simplifiziertes Abbild der Realität widerspiegeln, statistische Tests helfen bei der Interpretation und geben erste Hinweise. Ob ein antiadhäsiver Effekt tatsächlich vorliegt, ist nur mit einer vorhergehenden Analyse der benötigten Stichprobengröße und einer Berechnung der Effekte der statistischen Signifikanzen abschätzbar. Schlussendlich ist die Vergleichbarkeit der *in vitro*-Testsysteme nur bedingt gegeben, da es keine standardisierten Adhäsionstest gibt und Medium bzw. Puffer, Inkubationszeiten, Temperatur, Stamm, die Herstellung der zu testenden Oberflächen (PVD, Ätzen, Polieren), geometrische Struktur und Angabe über Rauigkeitsparameter stets variieren und zu einer inkonsistenten Studienlage führen. Im Gegensatz zu vielen Studien, die meist nur drei bis fünf Proben nutzten, wurden für die vorliegende Arbeit weitaus mehr Proben prozessiert. Sogar die, mit Power Analyse ermittelte optimale Anzahl ($n = 22$) wurde

überschritten. Einer Überprüfung der Auswirkungen von nanostrukturierten Oberflächen auf die Bakterienadhäsion mittels Bildanalyse sollte eine adäquate Anzahl an Proben zugrunde liegen, einerseits um die statistische Sicherheit zu gewährleisten, andererseits um reale, relevante Unterschiede zu finden. Kallas *et al.* (2020) nutzten ebenfalls eine Probenanzahl mit 186 Oberflächen, die vorher mittels Power Analyse berechnet wurde, um einen durch Nanostrukturen ausgelösten antimikrobiellen Effekt aufzudecken, fanden jedoch keinen. Die Herstellung so vieler Proben, vor allem solcher mit sehr komplexen Oberflächenstrukturen, ist allerdings nicht immer möglich und könnte durch eine entsprechende repräsentative Anzahl an Bildern aufgewogen werden. Abschließend soll noch bemerkt werden, dass die quantitative Bildanalyse nur eines von vielen Kriterien ist, um sowohl die Bindungskapazität eines bestimmten Stammes, als auch die Bindungsresistenz einer bestimmten Oberfläche zu bewerten. Andere Aspekte wie Adhäsionskraft, Zellmorphologie und Umgebung beeinflussen ebenfalls die Anhaftung (Petrova & Sauer, 2012). *In vivo*-Versuche (Schröder *et al.*, 2020), Einzelzell-Spektroskopie (Spengler *et al.*, 2019; Dauben *et al.*, 2020), AFM (Rizzello *et al.*, 2011; Webb *et al.*, 2013a) und andere mikroskopische und spektroskopische Messungen (McCrate *et al.*, 2013; Akanny *et al.*, 2020) sind typische, ergänzende Experimente, die die Rolle der Nanorauigkeit weiter entschlüsseln können.

1.3 FIB-SEM-Anwendung ist ungeeignet zur Begutachtung von Bakterien-Oberflächen-Querschnitten

Die Bildanalyse wurde mithilfe von REM-Aufnahmen und Querschnitten ergänzt. Während der initialen Adhäsion waren die in die Curli- und Fimbrienbildung involvierten Gene nicht stärker exprimiert. Vielmehr nutzen die Bakterien ihre bereits vorhandenen Zellanhänge (Abb. 16). Die Rauigkeiten von 2 bis 16 nm beeinflussten weder die Anzahl der Zellanhänge, noch wurde eine Änderung der Bakterienform induziert (Abb. 10). Eine Inkompatibilität zwischen den topographischen Strukturen der Oberfläche und den bakteriellen Zellhangsstrukturen kann somit innerhalb der Messdauer von 1 h ausgeschlossen werden. Rizzello *et al.* (2012) berichteten für eine längere Inkubationszeit von 12 h einen Rückgang der Typ 1-Fimbrien auf nanostrukturierten Goldsubstraten von $R_a = 99,8$ nm im Vergleich zu $R_a = 0,36$ nm. In anderen Studien (Lüdecke *et al.*, 2016; Spengler *et al.*, 2019; Dauben *et al.*, 2020) wurden Nanokontaktpunkte zwischen Bakterien und den Peaks der Oberfläche gezeigt. Diese Nanokontaktpunkte resultierten in einer verminderten Adhäsionskraft, da sich die Zellmembran der Bakterien rigide verhielt und nur punktuell auflag. Mithilfe von Querschnitten, die wie bei Lüdecke *et al.*, (2016) mit einem fokussierten Ionenstrahl angefertigt wurden, wurde die Bakterienmembran-Oberflächen-Grenzfläche für die Rauigkeiten von 2 bis 16 nm nochmals näher untersucht (Abb. 11). Nanokontaktpunkte konnten nicht gefunden werden, da sich

die Zellmembran der Bakterien komplett und unabhängig von der Struktur anzuschmiegen schien. Allerdings ist es möglich, dass es sich hier um Artefakte handelt. Der fokussierte Ionenstrahl (Galliumionen) schneidet schrittweise Schichten heraus, wobei der hohe Energieeinsatz vor allem bei organischem Material einen Schmelzeffekt hervorrufen und somit das Material in die Kavitäten der Strukturen gedrückt werden kann (persönliche Korrespondenz mit Jörg Bossert und Ralph Wagner, OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena). Dafür spricht ebenfalls, dass einzelne Partikel, die im Bild weiß erscheinenden Wolframschicht, im Bakterium zu sehen sind. Andererseits ist auch eine Rekondensierung der Partikel möglich. Nichtsdestotrotz ist ein Schmelzeffekt besonders an den Rändern der Bakterienkörper zu sehen. Daher ist eine aussagekräftige Antwort über die Rigidität der Membran unter diesen Umständen nur schwer möglich. Im Falle einer erneuten FIB-SEM-Anwendung sollten die Proben stabilisiert werden, indem neben der Wolframschicht z. B. eine feine Epoxidharzschicht („Plastifizierung“) zugefügt wird (Santoro *et al.*, 2017). Andere Alternativen, mit denen ein genaueres Modell über die Interaktion von Membran und Oberflächenstruktur erstellt werden könnte, wären Transmissionselektronenmikroskopie, Kryo-basierte EM und Tomographie-EM (Cornelissen *et al.*, 2018).

1.4 Die Nanorauigkeit im Bereich 2 bis 16 nm hat keinen Einfluss auf die Genexpression

Auch wenn sich die Nanostrukturen weder auf die Anzahl der adhärenierten Bakterien, noch auf deren Zellanhänge auswirkten, könnten generelle Stressantworten stattgefunden haben. Um dies herauszufinden, wurden die Transkriptome von auf jeweils 2 und 7 nm adhärenierten *E. coli* ATCC 25922 und KI683 nm analysiert (Tab. 17, Tab. S1, Tab. S2). Die Validierung der Expression ausgewählter Gene mittels qRT-PCR (Abb. 15) zeigte, dass es sich bei den 16 ermittelten differentiell exprimierten Genen zwischen den Rauigkeiten wahrscheinlich nur um „statistisch korrekt“ differentiell exprimierte Gene handelte. Gene wie *flg* oder *csg*, die für die Biosynthesen von Zellanhängen kodieren, waren jedoch nicht darunter. Dies zeigt, dass die Topographie, die speziell auf den Durchmesser von Zellanhängen konzipiert wurde, keinen Einfluss auf die Ausbildung von Zellanhängen in der Initialadhäsion erzielte. Da also die Nanorauigkeit im untersuchten Bereich eher keinen Einfluss auf eine geänderte Genexpression der *E. coli*-Bakterien ATCC 25922 und KI683 hatte, wurden die Transkriptome von *E. coli* RV308 nur auf 2 nm-rauen Titanoberflächen adhäreniert oder im planktonischen Zustand miteinander verglichen.

Die REM-Aufnahmen (Abb. 10) und eine Hauptkomponentenanalyse (Abb. 14) unterstrichen weiter, dass Nanorauigkeiten von 2 oder 7 nm keine Rolle spielten und eine geänderte Genexpression eher spezies-internen Faktoren geschuldet ist. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression wurde in

dieser Arbeit berücksichtigt, wenn sich die Genexpression mindestens verdoppelt hatte. In einer anderen Studie wurde der Schwellenwert sogar höher angesetzt und nur Expressionenänderungen von 2,5- und 3-fach berücksichtigt (Lee *et al.*, 2011; Bayramoglu, Toubiana, & Gillor, 2017). Abgesehen davon konnten jedoch für höhere Rauigkeitsprofile $R_a = 99,8$ nm ($R_{max} = \text{ca. } 600$ nm) mit einer 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass *E. coli*-Bakterien K-12-TG1 durchaus im Stande sind, Nanotopographien auf abiotischen Oberflächen wahrzunehmen. Diese nanorauen Goldsubstrate induzierten einen Rückgang von Typ 1-Fimbrien und die differentielle Genexpression von 15 Genen (Rizzello *et al.*, 2011). In weiteren Arbeiten von Rizzello *et al.* (2012) wurde für dieselben nanorauen Oberflächen von $R_a = 100$ nm die Aktivierung der Gene des Zweikomponentensystems *cpxP/R* und der Fimbrien-Rekombinase *fimE* nach 12 h Inkubation mittels qRT-PCR nachgewiesen. Weitere physiologische Reaktionen von *E. coli* K-12-Bakterien wurden auf bakterizid-wirkenden Oberflächen festgestellt, die den Nanometerbereich jedoch übersteigen. Kohlenstoff-Nanoröhren mit einer Breite von 0,9 nm und einer Länge von 2 μm lösten in den gebundenen *E. coli* K-12-Bakterien eine höhere Expression von Genen aus, die der Glykolyse, der Fettsäurebiosynthese und dem Fettsäureabbau angehören. Daneben induzierten die Kohlenstoff-Nanoröhren eine allgemeine und oxidative Stressantwort (Gene σ^S und σ^E : *soxRS* und *oxyR*) und eine Störung der Zellmembran (Tol/Pal-System und PhoPQ-Zweikomponentensystem) (Kang *et al.*, 2008). Andere bakterizide Oberflächen induzierten ebenfalls oxidativen Stress in adhärenen *E. coli* TOP10-Bakterien (Jenkins *et al.*, 2020). Weitere Arbeiten mit einer ähnlichen Topographie und die Untersuchung der direkten genetischen Auswirkungen von nanorauen, nicht bakteriziden, Topographien sind bis *dato* nicht publiziert. Allerdings existieren Studien, in denen die Rolle der Zellanhänge auf verschiedenen strukturierten Oberflächen mit Deletionsmutanten untersucht wurde. Die Oberflächenanhaftung Fimbrien-defizienter *E. coli* BW25113 $\Delta fimA$ und $\Delta fimH$ auf verschiedene, nanostrukturierte Oberflächen mit Nanosäulen (Höhe 25 nm) wurde mit der auf glatten Oberflächen verglichen. Ergebnis war eine vermehrte Anhaftung der Mutanten auf den glatten Oberflächen (Kallas *et al.*, 2020). Flagellenlose Deletionsmutanten $\Delta fliC$ in *E. coli* ZK2686 (K-12 Derivat W3110) adhärenen ebenfalls besser auf glatten Substraten (Friedlander *et al.*, 2013). Dies spiegelte sich in dem Verhalten von *E. coli* RV308 nieder, der als Zellanhang-defizienter Stamm die höchsten Adhäsionsraten erzielte. Zellanhänge erweisen sich bei Rauigkeiten, die die Größe des Bakterienkörpers überragen somit als Vorteil, um den Abstand zu anderen Bakterien überbrücken zu können (Friedlander *et al.*, 2013). Der Rauigkeitsbereich von 2 bis 7 nm scheint dagegen zu fein skaliert, als dass eine Inkompatibilität gegenüber Zellanhängen zustande käme. Fest steht, dass Zellanhänge im Falle von motilen Bakterien bei Annäherung zur Oberfläche als Anker, Fühler und Sensoren dienen (Kimkes & Heinemann, 2019) und bei der Ausbildung von Biofilmen eine stabilisierende Aufgabe übernehmen (Serra & Hengge,

2014). Der Einfluss der Rauigkeiten 12 und 16 nm auf eine veränderte Genexpression bleibt offen. Aus der Bildanalyse (Abb. 9) und den REM-Aufnahmen (Abb. 10) lässt sich jedoch mutmaßen, dass, wie bei den Rauigkeiten 2 und 7 nm, für die Rauigkeiten 12 und 16 nm keine Veränderung bezüglich der Bindungskapazität der drei *E. coli*-Stämme auftreten würde. Da die Nanorauigkeit im untersuchten Bereich keinen Einfluss auf die Genexpression der *E. coli*-Bakterien hatte, rückte die Untersuchung Stamm-spezifischer Adhäsionsmechanismen in den Fokus.

2 Adhäsionsmechanismen

Biofilme können medizinische und technische Probleme verursachen. Während bereits ein großer Wissensschatz über die planktonische und die Biofilm-Form von Bakterien besteht, ist unser Verständnis vom ersten Oberflächenkontakt bis zur Adhäsion noch unvollständig. Anhand der Transkriptome der adhären und planktonischen *E. coli*-Stämme ATCC 259522, KI683 und RV308 wurden Ähnlichkeiten und Unterschiede erfasst und spezifische Adhäsionsmechanismen herausgearbeitet (vgl. C5.5). Alle drei Stämme haben spezifische Charakteristika hinsichtlich ihres Adhäsionsvermögens und -verhaltens. Der motile *E. coli*-Stamm ATCC 25922 wurde wegen seiner vielen Zellanänge, die ihm ein starkes Oberflächen-Bindungspotential verleihen sollten, und seiner bereits bekannten Eigenschaft, Biofilme auszubilden, in die Studie einbezogen. Das Bakterium *E. coli* KI683 wurde aufgrund seiner Herkunft aus einem Patienten mit Urosepsis und dem Besitz des pUTI89-ähnlichen Plasmides als uropathogenes Bakterium klassifiziert (vgl. C4.1). Das geringe Oberflächen-Bindungspotential machte es für die hier vorgestellten Untersuchungen besonders interessant, da für ähnliche Arbeiten mit repellierenden Materialien meist nur starke Biofilmformer genutzt wurden. Schwartz *et al.* (2011) fanden heraus, dass uropathogene *E. coli* UTI89 generell ein geringes Adhäsionsvermögen aufweisen und nur 1 von 1000 Bakterien an Epithelzellen adhären. Jedoch ist dieses ein Bakterium dann dazu im Stande, starke Zellcluster auszubilden und Entzündungen hervorzurufen (Schwartz *et al.*, 2011). Der dritte ausgewählte Stamm, *E. coli* RV308, ist durch die starke Fähigkeit zur Adhäsion und Biofilmbildung trotz fehlender Zellanänge speziell. Gerade die Eigenschaften der beiden letztgenannten Stämme widersprechen der Annahme, dass viele Zellanänge eine starke Adhäsion bedeuten. Das zeugt von einzigartigen Adhäsionsmechanismen, die über die typischen Biofilmregulatoren und Zellanänge hinaus gehen. Im Abschnitt 2.1 wird auf die Qualität der isolierten RNA aus sessilen und planktonischen Bakterien eingegangen. In den Abschnitten 2.2 und 2.3 wird der Einfluss spezifischer Stoffwechselwege auf die bakterielle Adhäsion diskutiert.

2.1 Gesamt-RNA ist in sessilen Bakterien stabiler

Für eine Transkriptomanalyse der adhärennten Bakterien wurde eine Methode zur RNA-Isolation von initial adhärennten Bakterien auf nanorauen Titanplättchen etabliert (C5.1). Zur Bewertung der isolierten Gesamt-RNA wird der RIN-Wert eingesetzt. Der RIN-Wert (engl. *RNA integrity number*) ist ein Qualitätsmerkmal, der die RNA-Qualität auf einer Skala von 1 (degradiert) bis 10 (intakt) bewertet (Schroeder *et al.*, 2006). Die isolierte RNA aus sessilen Bakterien war stets qualitativ hochwertiger als die aus planktonischen Bakterien (Tab. 16). Derselbe Trend wurde auch gefunden, wenn die RNA aus Zellen isoliert wurde, die in nährstoffreichen Medien (TSB und LB, Daten nicht gezeigt) kultiviert waren. Ein Nährstoffmangel durch den Puffer lac-SBF als Ursache ist damit ausgeschlossen. Vielmehr scheinen Hungerbedingungen und langsames Wachstum in der planktonischen Phase unabhängig vom Medium verstärkt vorherrschend zu sein und führen, ähnlich wie in der stationären Phase, zu einem RNA-Abbau (Deutscher, 2003). Diese Beobachtung wurde ebenfalls von der Firma StarSEQ GmbH gestützt (persönliche Korrespondenz mit Sven-Ernö Bikar), die trotz nährstoffhaltigen Mediums mit fortschreitender, stationärer Phase qualitativ schlechtere RNA beobachteten. Das heißt, dass der niedrige RIN-Wert für die planktonischen Proben den, bereits während der Kultivierung beginnenden, Abbau der RNA widerspiegelt. Ungeachtet dessen zeigte die bessere RNA-Qualität der Gesamt-RNA aus den sessilen Bakterien an, dass alle drei Bakterienstämme, egal welcher Bindungstyp, einen metabolisch günstigeren Zustand im Adhäsionsmodus aufwiesen.

Nach der rRNA-Depletion wurde die verbliebene mRNA sequenziert. Auffällig hierbei waren die hohe Genomabdeckung der *reads* für *E. coli* ATCC 25922 und die geringen RIN-Werte der planktonischen Proben (Tab. 16). Ersteres resultierte aus einer unbeabsichtigten Sequenziermenge von 100 Mio. *reads* anstatt von 10 Mio. seitens der RNA-Sequenzierungs-Firma. 10 – 30 Mio. *reads* pro Probe sind üblich und ausreichend für eine Berechnung von differentiell exprimierten Genen (Stark, Grzelak, & Hadfield, 2019). Eine erhöhte Anzahl an *reads* geht mit einer höheren Abdeckung einher, in dem Fall bis zu 243fach (C5.2). Diese war nicht nachteilig, findet aber vorrangig Anwendung bei zusätzlichen, strukturellen Fragen wie z. B. der Auffindung von Gen-Isoformen (Stark *et al.*, 2019).

2.2 Generelle Aspekte der Genexpression

Anhand der RNA-Sequenzierung wurde die Menge und die Sequenz der Transkripte erfasst, die während der Adhäsion auf 2 nm-rauen Titanoberflächen (sessil) oder im planktonischen Zustand vorhanden waren. Durch einen Vergleich der Transkriptmengen eines Gens während der zwei Konditionen sessil und planktonisch wurden relevante Gene extrapoliert, die differentiell exprimiert wurden. Obwohl die Genome von *E. coli* ATCC 25922 und K1683 sich zu 97% ähnlich waren (vgl. C4.2) und sie sich fast 680 protein-kodierende Gene mehr als mit *E. coli* RV308 teilten (Abb. 13), zeigten die

Transkriptome unter denselben Konditionen eine deutliche Variabilität (vgl. C5.5.1 bis C5.5.3). So waren in *E. coli* ATCC 25922 zwischen den Konditionen sessil und planktonisch von 4818 Genen 370 Gene (7,7%), in *E. coli* KI683 von 4834 Genen 1104 Gene (22,8%) und in *E. coli* RV308 von 4716 Genen 793 Gene (19%) differentiell exprimiert (Tab. 17). Andere Studien fanden einen sehr unterschiedlichen Anteil der differentiellen Genexpression zwischen dem sessilen und dem planktonischen Modus für *E. coli*-Bakterien, beginnend bei 1% (Weber *et al.*, 2010) über 8% (Lee *et al.*, 2011; Bayramoglu *et al.*, 2017) bis zu 20% (Bufe *et al.*, 2019) und 70% (Jia *et al.*, 2017). Der in dieser Arbeit gefundene Anteil ist damit konsistent mit anderen Studien.

Der niedrigere Anteil der differentiell exprimierten Gene in *E. coli* ATCC 25922, im Gegensatz zu dem höheren Anteil der differentiell exprimierten Gene in *E. coli* KI683 und RV308, kann darin begründet sein, dass *E. coli* ATCC 25922 viele Zellanhänge und Adhäsine besitzt. Diese ermöglichen eine schnelle Adhäsion und eine Verfestigung an der Oberfläche, ohne bestimmte Adhäsionsmechanismen, also die Expression bestimmter Adhäsionsgene, einleiten zu müssen.

2.3 Das Bakterium beeinflussende Stoffwechselwege während der Adhäsion

Die differentiell exprimierten Gene der drei Stämme beim Vergleich der Konditionen sessil und planktonisch entstammen zu 84,2 bis 91,1% dem gemeinsamen Genompool, besitzen aber verschiedene Expressionsniveaus. Das Adhäsionsverhalten der drei *E. coli*-Stämme wurde also hauptsächlich von der unterschiedlichen Genexpression der gemeinsamen Gene gesteuert. Die restlichen 16,8 bis 8,9% der differentiell exprimierten Gene kommen aus dem paarweise-gemeinsamen und dem einzigartigen Genom. Nachfolgend werden spezielle Ergebnisse der Analyse von differentiell exprimierten Gene beim Übergang von der planktonischen in die sessile Phase und deren mögliche Bedeutung im Adhäsionsgeschehen gesondert diskutiert.

2.3.1 Zellanhänge werden für die schnelle, initiale Adhäsion gebraucht

Motilitäts-defizienten *E. coli*-Stämmen wurde eine verminderte Adhäsion und Biofilmbildung zugeschrieben (Wood *et al.*, 2006; Friedlander *et al.*, 2013). In dieser Arbeit war jedoch der nicht-motile *E. coli* RV308 der stärkste Biofilmbilder (Abb. 20). *E. coli* ATCC 25922 als motiles Bakterium und moderater Biofilmbilder bestätigte die Hypothese, *E. coli* KI83 als motiles Bakterium und schwacher Biofilmbilder wiederum nicht. Dahingehend konnte in dieser Arbeit keine Korrelation von Motilitätsapparat und Adhäsion bzw. Biofilmbildung beobachtet werden und die Flagellen scheinen hier nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Zuge der Etablierung des *in vitro*-Adhäsionsassays konnten bereits nach wenigen Sekunden irreversibel haftende *E. coli* ATCC 25922 und KI683 auf den Oberflächen nachgewiesen werden, während die Adhäsion für *E. coli* RV308 um den Faktor 10 bzw. 5 reduziert war (Daten nicht gezeigt). Da es unwahrscheinlich ist, dass sich innerhalb dieser kurzen Zeit

morphologische Veränderungen manifestiert haben, kann ein Zusammenhang zwischen schneller Adhäsion auf glatten Oberflächen und dem Vorhandensein von Flagellen vermutet werden. Physiko-chemische Anziehungskräfte zwischen Zellanhängen und Oberfläche dürften ebenso eine Rolle spielen, wie eine aktive Anhaftung durch die Zellanhänge („Mechanosensing“). Ein Beispiel für das Mitwirken physiko-chemischer Anziehungskräfte sind Studien mit *E. coli* BW25113 und Flagellendefizienten Mutanten auf verschiedenen hydrophoben Kunststoffoberflächen. Postuliert wurde, dass die initiale Adhäsion weder von spezifischen Zellanhängen noch von sekretierten Proteinen, sondern nur von den physiko-chemischen Eigenschaften der Oberfläche abhängig ist (Straub *et al.*, 2019). Auch das hier verwendete Set an *E. coli*-Stämmen wäre geeignet, um dies weiter zu verifizieren.

2.3.2 Persistenz und Filamentbildung sind Teil der Überlebensstrategie von sessilen *E. coli* KI683

Die im Vergleich zum planktonischen Zustand niedrige Expression von Transkriptions- und Translations-assoziierten Genen (*rpl*, *rpm*, *rps*, *rpo*) in sessilen *E. coli* KI683 in Kombination mit Filamentation weisen auf einen Zustand der Persistenz, anstatt einer Biofilmbildung als Überlebensstrategie hin. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass Biofilme für die Persistenz von Bakterien verantwortlich sind und die Therapie von Implantat-Infektionen maßgeblich erschwert (Lewis, 2010; Arciola *et al.*, 2018), wobei das sehr langsame Wachstum und die angehaltene Proteinbiosynthese der persistierenden Bakterien zur tragenden Rolle wird (Kwan *et al.*, 2013). Als weiterer Teil der Überlebensstrategie, sind bakterielle Filamentbildungen mit chronischen Infektionen und Biofilmen assoziiert. Die vergrößerten Bakterien, also Filamente, können schlechter phagozytiert werden (Wood *et al.*, 2019). Für eine Umstrukturierung der Zellmembran sprechen ebenfalls die angereicherten Gene der GO-Klassifizierung *Gram-negative cell wall biogenesis* (vgl. C5.5.2). In Kombination mit den herunter geregelten Kapselproteine (Gene *eps*, *kps*), die im planktonischen Zustand als Schutzschild dienen, ist es plausibel zu vermuten, dass der benötigte Schutzwall abgebaut und die Zellmembran umgebaut wird. Ähnliches konnte in *Porphyromonas gingivalis* beobachtet werden (Davey & Duncan, 2006). Hier half die Herstellung einer Kapsel dem Immunsystem zu entgehen und inhibierte zeitgleich die Biofilmbildung, da die Kapsel mögliche Adhäsine in der Zellmembran blockierte und eine Anhaftung verhinderte. Da Langzeitinfektionen in Implantaten vermehrt durch *E. coli*-Bakterien aus dem Urogenitaltrakt verursacht werden (Crémet *et al.*, 2012; Arciola *et al.*, 2018), sind die Transkriptomanalysen eines niedrig-bindenden UPEC-Bakteriums wertvolle Wegweiser zur Erforschung weiterer Adhäsionsmechanismen, die über die klassischen Biofilmbildenden Maßnahmen hinaus gehen.

2.3.3 Quorum sensing in *E. coli* RV308 bestimmt das Adhäsionsverhalten

Die stärkste differentielle Genexpression in sessilen *E. coli* RV308-Bakterien wurde bei der Quorum sensing-Maschinerie (Gene *lsr*) und einigen Zuckertransportern (Gene *gal*, *mal*, *xyI*) beobachtet (vgl.

C5.5.3). Die Genprodukte von *Isr* koordinieren die Kolansäureproduktion (Gene *wca*) und das Antigen 43 (Gen *flu*), sowie die Architektur und Dichte des Biofilms, als auch die Motilität und die Zellteilung (Li *et al.*, 2007; Torres-Cerna, Morales, & Hernandez-Vargas, 2019). Somit beeinflussten die Gene *Isr* das Adhäsions- und Biofilmverhalten maßgeblich. *E. coli* RV308 besitzt zwar keine Zellanhänge, ist jedoch sehr auf die Biofilmbildung spezialisiert (Abb. 20) und als nicht-motiles Bakterium auf dessen Funktion als Schutzmechanismus angewiesen. Mit zunehmender Zeit auf der Oberfläche konnten für dieses Bakterium im Minimalmedium M9 bei statischen Konditionen ebenfalls starke Biofilmschichten beobachtet werden (Lüdecke *et al.*, 2014). Die erhöhte Aufnahme von Kohlenhydraten wurde für *E. coli*-Laborstämme im Vergleich zu Umweltisolaten als typisch beschrieben, damit das Wachstum weiterhin gewährleistet ist. Im Gegenteil dazu sind die Umweltisolate auf harsche Umgebungen besser eingestellt und adaptieren sich schneller an Hungerbedingungen, z. B. durch die erhöhte Expression von Genen, die für den Säure- und Osmosestress und das Gleichgewicht des Eisengehalts verantwortlich sind (Vital *et al.*, 2015). Die Auswirkungen der Stamm-spezifischen Gene *Isr* auf das Adhäsionsverhalten von *E. coli* RV308 scheint den Einfluss der exprimierten Gene aus dem Kerngenom zu überlagern. Sie haben demnach einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtfragestellung. Eine wichtige Erkenntnis daraus ist, dass eine geeignete Stammauswahl für die Untersuchung von Fragestellungen zur bakteriellen Adhäsion eine enorme Bedeutung hat.

2.3.4 Die schnelle Anpassung an den Stickstoffmangel ist ein selektiver Vorteil

In allen drei untersuchten *E. coli*-Stämmen waren dem Stickstoffmetabolismus zugehörige Gene überproportional häufig differentiell exprimiert. Dies deutet auf einen Sauerstoffmangel hin, was Nitrat zum bevorzugten Elektronenakzeptor bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen machen würde. Sauerstoff-, Stickstoff- und Eisenmangel könnten eine Folge der niedrigen Substratverfügbarkeit in dem Puffer lac-SBF während der Adhäsion sein. Am Stickstoffmetabolismus-beteiligte Gene sind *nar*, *nac*, *nap*, *nir* und *ntr*. Das Genprodukt von letzterem induziert im sessilen Zustand den Abbau von Putrescin, Arginin, Pyrimidine, wahrscheinlich auch Purine, Ornithin und γ -Aminobutyrat (GABA) (Schneider *et al.*, 2013). Dies ergibt dahingehend Sinn, dass die aktive Nährstoffsuche im sessilen Zustand nicht mehr gegeben ist und die adäquate Nährstoffaufnahme anders gesichert werden muss. Interessanterweise wurde jedoch die Stickstoffaufnahme besonders durch die Expression der periplasmatischen *nap*-Gene bei *E. coli* ATCC 25922 im planktonischen Zustand geregelt. *nap*-Gene werden unter anaeroben Konditionen aktiviert und wenn die Nitratatmung über die Nitratreduktase A (NarGHI) durch geringe Nitratkonzentrationen eingeschränkt ist (Stewart, Lu, & Darwin, 2002). Die Nitratreduktase P (Gene *napABC*) übernimmt unter Stickstoffmangel-Bedingungen die Funktion der Nitratreduktase A. Die erhöhte Aktivität der Nitratreduktase P schafft einen selektiven Vorteil, indem Nitrat effizienter genutzt werden kann

(Potter *et al.*, 1999). Diese Strategie könnte für schnell adhätierende Bakterien wie *E. coli* ATCC 25922 im menschlichen Körper vorteilhaft sein, da hier nitratarme Bedingungen herrschen. Für die Hypothese des selektiven Vorteils dieser Gene spricht ebenfalls, dass nur die *nap*-Gene in anderen pathogenen Mikroorganismen wie *Haemophilus influenza*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* und *Campylobacter jejuni* konserviert sind (Potter *et al.*, 1999).

2.3.5 Erhöhte Kupferverträglichkeit vermittelt wahrscheinlich einen Virulenzvorteil

Beim Übergang vom planktonischen ins sessile Wachstum waren bei allen drei Stämmen Prozesse der Metallhomöostase verändert. In *E. coli* KI683 und RV308 waren vor allem an der Eisenaufnahme beteiligte Gene stärker (*isc*, *suf*), Gene für den Nickelstoffwechsel (*nik*) dagegen geringer exprimiert. In *E. coli* ATCC 25922 und KI683 waren viele zur Kupferhomöostase notwendige Gene (*cus*, *cue*, *copA*) in ihrer Expression erhöht. Im *E. coli*-Genom kodieren die Gene *isc* und *suf* Proteine für die Fe-S-Cluster-Biogenese. Die *suf*-Gene sind nur unter Stressbedingungen aktiv, während die *isc*-Gene zu den typisch konstitutiv exprimierten Genen gehören (Mettert & Kiley, 2014). *iscR* war in allen Stämmen während der sessilen Phase stark exprimiert, während die stress-induzierten Gene *suf* unter denselben Bedingungen nur in *E. coli* RV308 hochreguliert wurden. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass klinische Isolate den Stress durch Eisenlimitation anders ausgleichen können, z. B. durch die vermehrte Aufnahme von Kupfer. Metalle wie Kupfer und Zink können, je nachdem wie gut sie mit Schwefel reagieren, Eisen aus bereits fertig assemblierten Fe-S-Clustern ersetzen oder auch verdrängen (Neyrolles, Mintz, & Catty, 2013). Im Fall von *E. coli* ATCC 25922 und KI683 könnte bei Eisenentzug das Kupfer als Co-Faktor eingebaut werden. Daneben ist das Kupferhomöostasensystem für die Aufrechterhaltung funktionaler Zellmembranen, den Ausgleich von ROS nach Kupferstress und für die Homöostase anderer Metalle verantwortlich (Giachino & Waldron, 2020). Zwar wurde die Kupferhomöostase noch nicht mit einer Biofilmbildung in Verbindung gebracht, jedoch als Determinante für erhöhte Virulenz. So zeigten Versuche mit CopA-defizienten *Salmonella typhimurium* und Makrophagen (aus einer Maus) durch die erhöhte Kupfertoleranz eine reduzierte Infektion (Ladomersky *et al.*, 2017). Hintergrund ist, dass neben einer Ansäuerung, auch die Erhöhung von Metallkonzentrationen wie Kupfer und Kobalt, im Phagosom ein Merkmal der Phagozytose ist (Neyrolles *et al.*, 2013). Daher ergibt es für die klinischen Isolate *E. coli* ATCC 25922 und KI683 Sinn, die erhöhte Kupferverträglichkeit innerhalb eines biologischen Systems auf die abiotischen Oberflächen anzupassen. Inwiefern jedoch die erhöhte Kupfertoleranz als wesentliches Virulenzmerkmal gelten kann, bleibt noch festzustellen (Giachino & Waldron, 2020). Verbesserungen in der Eisenassimilation sind für jeden Bindungstyp im adhätierten Zustand als Teil der Überlebensstrategie im Biofilm erforderlich und konsistent mit anderen Studien (Bayramoglu *et al.*, 2017; Pisithkul *et al.*, 2019). Ob

dasselbe für Kupfer-, Zink-, Nickel- und Molybdän-abhängige Proteine gilt, bleibt offen und bietet Raum für detaillierte Untersuchungen.

Letztendlich sind die Transkriptomanalysen nur aus der globalen Perspektive zu interpretieren. Wie bekannt ist, bestehen Biofilme aus einer inhomogenen Mischung aus phänotypisch unterschiedlich aktiven Subpopulationen (Serra *et al.*, 2013c). Weiterhin wird noch die aktive Adhäsion durch Mechanosensing oder die passive Adhäsion durch tote Bakterien vielmals diskutiert (Busscher & Mei, 2012; Straub *et al.*, 2019). Andere Methoden können die inhomogene Mischung aus verschiedenen Bakterienzuständen aufschlüsseln und transkriptionelle Reaktionen auf die Adhäsion direkt extrapolieren. So konnten z. B. Bakterien, die an Beads hafteten mittels Durchflusszytometrie von planktonischen Bakterien getrennt, unmittelbar identifiziert und spezifisch untersucht werden (Beloin *et al.*, 2008). Einzelzell-RNA-Sequenzierungsmethoden sind außerdem im Stande, die Heterogenität von Bakterien aufzudecken. Sie haben den Vorteil, gering adhärierende Bakterien wie *E. coli* KI683 ohne großen Probeneinsatz zu untersuchen (Wu *et al.*, 2014) und werden weiter für Mikroorganismen optimiert (Zhang *et al.*, 2018a).

3 Nicht-charakterisierte Gene weisen auf ein unvollständiges Adhäsionsverständnis hin

Der Vergleich der Transkriptomsequenzierungsdaten zwischen der sessilen und der planktonischen Phase der *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 legte viele nicht-charakterisierte Gene offen, die eine Beteiligung an den bakteriellen Adhäsionsprozessen indizieren. Für die weitere Aufschlüsselung des Adhäsionsverhaltens wurden das charakterisierte Gen *bolA* und die nicht-charakterisierten Gene *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* anhand von Deletionen und Überexpressionen in den drei *E. coli*-Stämmen weiter überprüft. Die Auswirkungen der Mutationen wurden bezüglich des Wachstums (Abb. 19), des spezifischen Phänotyps, der Motilität (Tab. 19) und der Biofilmbildung (Abb. 20) untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Im Folgenden werden die Effekte der Mutationen einzeln besprochen und deren mögliche Bedeutung in den Adhäsionsprozessen diskutiert.

In Laborstamm *E. coli* RV308 führte die Überexpression des Transkriptionsfaktors *bolA* zu einer runden statt stäbchenförmigen Morphologie (Abb. A4), was ein defizitäres Wachstum und eine verminderte Biofilmbildung zur Folge hatte. Andere K-12-Stämme wie MC1061 und MG1655 mit *bolA*-Mutationen, die mit derselben Biofilm-Testmethode überprüft wurden, wiesen aber ein gegenteiliges Verhalten auf. Hier erzeugten die *bolA*-Überexpressionen eine erhöhte Biofilmbildung und die *bolA*-Deletion eine reduzierte Biofilmbildung (Vieira, Freire, & Arraiano, 2004; Dressaire *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2017). In den hier durchgeführten Experimenten wurde für *E. coli* RV308 OE*bolA* nach 24 h Inkubationszeit eine Zellulose-Masse festgestellt, die im Medium schwamm und nicht am Kunststoffrand der

Multiwellplatte haftete (Abb. A6). Da diese Zellulose-Masse bei den Waschschrinen ausgespült wurde, erfolgte keine Bindung von Kristallviolett. Ansonsten wäre eine erhöhte Biofilmbildung messbar gewesen, die konsistent mit den Ergebnissen der anderen Studien gewesen wäre. ChIP-seq (Chromatin-Immunpräzipitation) und Microarray-Daten von planktonischen und sessilen *E. coli* MG1655 zeigten, dass BolA an der Flagellenbiosynthese beteiligte Gene inhibiert, während Gene für die Curli- und Fimbrien-Bildung gefördert werden, um die Herstellung von Biofilm-Komponenten zu erhöhen (Dressaire *et al.*, 2015). Außerdem reguliert BolA den sekundären Botenstoff c-di-GMP durch negative Rückkopplung. c-di-GMP ist in viele zellulären Prozesse wie Biofilmbildung und Virulenz involviert (Moreira *et al.*, 2017). Außerdem stieg mit der Zunahme von BolA graduell die Schwimmkapazität. Dies verwies stark auf einen Dosiseffekt und die strenge Kontrolle von BolA in den Zellen (Dressaire *et al.*, 2015). *bolA*-Mutationen in den zwei klinischen Isolaten *E. coli* ATCC 25922 und KI683 verblieben allerdings ohne Effekt. Dementsprechend müssen die klinischen Isolate den induzierten Stress durch die erhöhten BolA-Spiegel anderweitig kompensiert haben, was K-12-Derivaten vorenthalten ist.

ygeV-Mutationen beeinflussten nur *E. coli* ATCC 25922 während der Biofilmbildung: die *ygeV*-Deletion verursachte eine reduzierte Biofilmbildung und die *ygeV*-Überexpression eine gesteigerte Biofilmbildung (Abb. 20A). Vor kurzem wurde gezeigt, dass *E. coli* unter anaeroben und mikroaeroben Bedingungen Harnsäure als einzige Stickstoffquelle nutzen kann, was bis *dato* nur unter aeroben Bedingungen bekannt war (Iwadate & Kato, 2019). YgeV ist bei der Umwandlung von Harnsäure zu Allantoin involviert, die beide Zwischenprodukte des Purinabbaus sind. Dabei induziert YgeV vermutlich als σ^{54} Transkriptionsregulator die Expression des Harnsäure-induzierbaren Gens *yfgT* (Iwadate & Kato, 2019). Wenn nun YgeV unter Sauerstoffmangel wie in lac-SBF oder in einem Biofilm stärker exprimiert wird, könnte *E. coli* ATCC 25922 anaerob besser Stickstoff umsetzen. Die verbesserte Aktivität zur Erschließung von Stickstoff wurde auch durch die verstärkte Expression der *nap*-Gene gezeigt (vgl. D2.3.4). Dies verstärkt die Annahme, dass *E. coli* ATCC 25922 eine optimierte Stickstoff-Erschließung besitzt.

YaiY ist ein putatives Protein in der inneren Membran. Obwohl im sessilen Zustand von *yaiY* in *E. coli* KI683 eine 13-fach und in *E. coli* RV308 eine 5-fach stärkere Genexpression nachgewiesen wurde, verursachte nur die Überexpression von *yaiY* in *E. coli* RV308 eine deutliche Verminderung des Biofilms (Abb. 20C). *E. coli* ATCC 25922 $\Delta yaiY$ weist eine geringe Blasenbildung auf der Oberfläche der Makrokolonie auf, die eine leicht erhöhte Zelluloseproduktion anzeigt (Tab. 19, Abb. A3). *yaiY* wurde in anderen Studien durch Stressinduktion stark exprimiert vorgefunden, doch wurde bis *dato* die Funktion des inneren Membran-Proteins noch nicht weiter eruiert. So wurde *yaiY* durch das Stresssignalprotein RcsB (Bury-Moné *et al.*, 2009), das unbekannte Protein IprA (vorher YaiV in

Sa. typhimurium, (Herman *et al.*, 2016)), das Bacteriocin Colicin M (Kamenšek & Žgur-Bertok, 2013) und eine langzeitige, stationäre Phase (Kram, Henderson, & Finkel, 2020) induziert und vermehrt exprimiert. Daher wird *yaiY* wahrscheinlich eher durch Stress induziert und weniger durch den Zustand der Adhäsion. Allgemein scheint YaiY in osmotischen und anderen Stressantworten beteiligt zu sein, die durch die Zellmembran wahrgenommen werden.

ybgS kodiert für ein nicht näher spezifiziertes, putatives Homöobox-Protein, das in adhätierenden *E. coli* KI683 und RV308 vermehrt transkribiert worden war. Die Deletion von *ybgS* in *E. coli* ATCC 25922 verursachte eine verminderte Motilität, während die Überexpression von *ybgS* in *E. coli* RV308 eine erhöhte Zelluloseproduktion hervorrief. Die Biofilmbildung der drei *E. coli*-Stämme wurde durch keine *ybgS*-Mutation beeinflusst. In anderen Arbeiten wurde *ybgS* durch Acrylsäure (Raghavan *et al.*, 2019) und osmotischen Stress (Weber & Jung, 2002) induziert und als Bindemotiv des RpoH-Holoenzym (σ^{32}) vorgefunden (Shimada, Tanaka, & Ishihama, 2017). So wie *yaiY* wird *ybgS* während einer Stressantwort verstärkt exprimiert. Jedoch wurde bislang nicht ermittelt, welche Funktion dieses Gen erfüllt.

Für das Gen *yddM* wurden das, in der Nähe befindliche Toxin-Antitoxinpaar *higB/A* eingehender betrachtet (Abb. 21). Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Deletion bzw. Überexpression von *yddM* und des Expressionsniveaus von *higA* festgestellt. Im Vergleich zu anderen globalen Transkriptionsfaktoren besitzt YddM laut Gao *et al.* (2018) drei interessante regulatorische Merkmale, die in *E. coli* MG1655 untersucht wurden. Erstens besitzt YddM genomweit 17 Bindestellen und somit mehr Bindestellen als bekannte, globale Transkriptionsfaktoren wie CRP, Lrp, FNR und ArcA. Zweitens bindet es gehäuft an Genen mit putativen Funktionen. Drittens ist das Genexpressionsniveau weitaus geringer im Vergleich zu der Mehrheit der globalen Transkriptionsfaktoren, was konsistent mit den hier erzielten Ergebnissen ist (Tab. 18). Für YddM wurden, wie erwähnt, in *E. coli* MG1655 17 Bindestellen gefunden, die jedoch *higB/A* exkludierten (Gao *et al.*, 2018). Das Genom von *E. coli* RV308 ist dem Genom von MG1655 ähnlicher, während das Genom von *E. coli* ATCC 25922 bis zu einem Fünftel mehr Basen besitzt. Zusätzliche oder deletierte Bindungsstellen für YddM sind dementsprechend nicht auszuschließen. Vor Kurzem konnte in *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass *higB* die c-di-GMP-Spiegel reduzierte und dadurch die Biofilmbildung verhinderte (Zhang *et al.*, 2018b). Insofern könnte YddM indirekt zur Regulation von c-di-GMP beitragen. Da sich die Regulation von YddM in den zwei Stämmen jedoch unterschiedlich auswirkte, kann von mehreren Funktionen ausgegangen werden und sollte durch weitere Arbeiten entschlüsselt werden. Hierfür bietet sich die Erkennung von weiteren Bindemotiven durch z. B. SELEX- (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung, (Jolma *et al.*, 2010)) oder CHIP-Experimente an.

Somit können kleine Änderungen wie einzelne Gendelektionen und -überexpressionen einen großen Einfluss auf die zellulären Expressionsmuster haben. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die Netzwerkarchitektur der ausgewählten Gene in verschiedenen *E. coli*-Stämmen besser zu verstehen und aufzuklären. Für den schwach adhätierenden *E. coli* KI683 konnte weder eine Deletion noch eine Überexpression der ausgewählten Gene zu einer erhöhten Biofilmbildung beitragen. Dies zeigt, dass es für die Ausbildung eines komplexen Biofilms mehr als einen globalen Regulator in diesem Bakterium benötigt. Das Stamm-Set der drei *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 mit den verschiedenen Phänotypen und den Adhäsionsmechanismen bietet hier eine Grundlage, um in *E. coli* weitere Mechanismen aufzudecken. Abschließend zeigen diese Resultate, dass die, über die Bakteriengenome hinweg konservierten, aber nicht-charakterisierten Gene, noch eine unentdeckte Rolle spielen. Detaillierte Untersuchungen von metabolischen Reaktionen sollten, z. B. durch die Vergleiche zwischen Wildtypen und dem deletierten bzw. überexprimierten Stammhintergrund erfolgen.

4 Proteinanlagerungen

Sobald Material in den Körper oder nur in ein Nährmedium eingebracht wird, lagern sich unmittelbar (Makro-)Moleküle auf der Materialoberfläche an (Anderson, Rodriguez, & Chang, 2008; Zimmerli & Sendi, 2011). Diese adsorbierte Schicht wird als *conditioning film* bezeichnet, der die physikochemischen Eigenschaften von Oberflächen ändert und zur weiteren Anlagerung von Proteinen, Polysacchariden und anderen Molekülen führt. Durch Agglomeration von Nährstoffen auf den Oberflächen wird Bakterien einerseits eine nährstoffdichere Umgebung geboten, welche die Anhaftung und das Biofilmverhalten affektieren (Petrova & Sauer, 2012), andererseits senkt dieser Proteinfilm die Biokompatibilität des Materials (Thevenot, Hu, & Tang, 2008). Die häufigsten Proteine im Blut sind Albumine und Fibrinogen (Adkins *et al.*, 2002), die ca. 14 nm bzw. 46 nm groß und damit größer als die Nanostrukturen der untersuchten Oberflächen sind (Sukhishvili & Granick, 1999; Cacciafesta *et al.*, 2000). Dadurch werden Nanostrukturen auf den Oberflächen maskiert und so wird die Wirksamkeit der Topographien (zeitlich) beschränkt (Dolatshahi-Pirouz *et al.*, 2008). Um die Menge an adsorbierten Proteinen auf den nanorauen Titanoberflächen zu quantifizieren, wurden kolorimetrische Bicinchoninsäure-Tests (BCA), ein Schwingquartzkristallmikrowaagensystem (engl. *quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*, kurz QCM-D), fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit FITC-gelabelten Proteinen und AFM in einer Fluidzelle angewendet. Allerdings sind die Methoden nicht für die in dieser Arbeit genutzten Titanplättchen bzw. -oberflächen geeignet. Die Analyse mittels QCM-D war nur für 2 nm-raue Oberfläche möglich, da die Quartzkristallchips für die restlichen Rauigkeiten nicht in der PVD bedampft und geätzt hätten werden können. In einem

einmaligen Versuch konnten FITC-gelabelte Proteine auf 2 nm-rauen Titanoberflächen in sehr geringen Mengen von 0,14 – 018 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ festgestellt werden. FITC-gelabelte Proteine sind allerdings in den Konzentrationen wie sie im Blut enthalten sind (3 – 5 mg/ml) und für sehr viele Proben, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgrund der Herstellungskosten ungeeignet. Bei den AFM-Messungen wurde der Cantilever, die Blattfeder mit Spitze, die mit der Oberfläche interagiert, in die Proteinlösung getaucht. Durch die sehr hohen Proteinkonzentrationen adsorbierten die Proteine sehr schnell am Cantilever, wodurch die Interaktion nicht mehr der Anziehung zwischen Oberfläche und Cantilever zugeordnet werden konnte, sondern eher auf Wechselwirkungen zwischen den Proteinen beruhte. In einer Bachelorarbeit wurde diese Fragestellung mittels Ellipsometrie und trockenen AFM-Messungen der Proteinschichten näher beleuchtet. Bilder mit Höhenmessungen von 4 und 18 nm-rauen Titanplättchen zeigten vor und nach der Inkubation mit Albumin und Fibrinogen keine morphologischen Änderungen. Vielmehr prägte sich im Fall von Albumin eine 2 nm-dicke Schicht und im Fall von Fibrinogen eine 4 nm-dicke Schicht auf den Strukturen aus, die die Oberfläche als geschlossener Film überlagerte, die strukturellen Einheiten jedoch nicht maskierte (Meye, 2020). *De facto* ergab sich dennoch ein Proteinfilm, der die bakterielle Adhäsion beeinflussen könnte und den Einfluss der Nanostrukturen hätte schmälern können. Oberflächendesigns, die antimikrobielle Wirkstoffe freigegeben oder einen mechanisch-bakteriziden Effekt haben, können so nicht ihre volle Wirkung entfalten. Bei Untersuchungen der Interaktion zwischen Biomaterialien und Organismen sollte daher stets der Einfluss des umgebenden Mediums berücksichtigt werden.

5 Abschließende Bemerkungen

Die Ziele dieser Arbeit konnten erreicht (vgl. A5) und folgende Kernaussagen aus dieser Arbeit abgeleitet werden.

Erstens konnte ein *in vitro*-Adhäsionsassay mit geeigneten Parametern etabliert und validiert werden, der die nanorauen Titanoberflächen mit *E. coli*-Bakterien zusammenbrachte. Diesem *in vitro*-Adhäsionsassay lagen alle quantitativen und qualitativen Analysen zugrunde. Zusätzlich wurden mithilfe des *in vitro*-Adhäsionsassays drei morphologisch verschiedene *E. coli*-Stämme charakterisiert: die zwei klinischen Isolate *E. coli* ATCC 25922 und KI683 mit zahlreichen Zellanhängen und der K-12-Laborstamm RV308 ohne Zellanhänge. Das vorgestellte *E. coli*-Stamm-Set eignet sich besonders für Adhäsions- und Biofilmstudien, um die spezifischen Mechanismen der Adhäsion nuancierter zu untersuchen.

Zweitens wurde eine Bildanalyse zur Quantifizierung der adhärennten Bakterien mit ausreichender, statistischer Basis etabliert. Dadurch konnte einerseits festgestellt werden, dass die *E. coli*-Stämme unterschiedliche Adhäsionsverhalten aufwiesen: *E. coli* ATCC 25922 und RV308 adhärennten zahlreich,

während *E. coli* KI683 sehr schwach adhärte. Daher ist die erfolgreiche und zahlreiche Adhäsion von *E. coli*-Bakterien in einem statischen System nicht von Zellanhängen abhängig. Andererseits wurde mit der Bildauswertung belegt, dass die drei *E. coli*-Stämme nicht differenziert auf den 2, 7, 12 und 16 nm-rauen Titanplättchen adhärten. Die Nanorauigkeiten in der Größendimension von Zellanhängen (2 – 20 nm) bewirken also weder für *E. coli*-Bakterien mit, noch für *E. coli*-Bakterien ohne Zellanhänge eine mechanische Inkompatibilität oder eine anderweitige Adhäsions-reduzierende oder -begünstigende Wirkung. Außerdem wurde demonstriert, wie wichtig die Vorbereitungen und die genügende Anzahl an Proben sind, um antiadhäsive Wirksamkeiten herauszufinden, die über den statistischen Effekt hinausgehen.

Drittens konnte anhand von Transkriptomvergleichen zwischen *E. coli*-Bakterien, die auf 2 und 7 nm-rauen Titanplättchen adhärten, keine nanorau-sensitiven Gene nachgewiesen werden. Aus dem Transkriptomvergleich von *E. coli*-Bakterien aus dem adhärten und sessilen Zustand ergaben sich jedoch drei unterschiedliche Adhäsionsmechanismen, die überproportional stark von stamm-spezifischen Genen und Genexpressionen beeinflusst wurden. Die drei Stämme veranschaulichten, wie komplex die Adhäsionsmechanismen innerhalb einer Spezies organisiert sind. Bei der Testung von antiadhäsiven Materialien sollte dies stets berücksichtigt werden.

Viertens wurden anhand der Transkriptomsequenzierungsdaten weitere, an der Adhäsion-beteiligte, aber noch nicht-charakterisierte Gene ermittelt. Die unbekanntenen Gene *ygeV*, *yaiY*, *ybgS* und *yddM* wurden, neben dem bekannten Morphogen *bolA*, in den drei *E. coli*-Stämmen jeweils deletiert und überexprimiert. Die Mutantenstämme zeigten keine einheitlichen Veränderungen hinsichtlich des Phänotyps und der Biofilmbildung. So waren bei *E. coli* ATCC 25922 $\Delta yddM$ und *E. coli* RV308 OEyddM jeweils die Biofilmbildung deutlich ausgeprägter im Vergleich zum WT-Stamm. Es wird ersichtlich, dass die Auswirkungen einer Mutation in einem Stamm, nicht auf andere Stämme übertragen werden können. Als Konsequenz sollten Laborstämme für die Vergleichbarkeit mit anderen Studien in Kombination mit kürzlich gewonnenen klinischen Isolaten genutzt werden. Zusätzlich konnte für YddM näher überprüft werden, dass es wahrscheinlich an der Regulation des Toxin-Antitoxin-Paares *higB/A* beteiligt ist. Die Transkriptomdaten bilden einen Fundus für weitere, an der Adhäsion-beteiligte Gene.

Abschließend geben die in diesem Rahmen erzielten Ergebnisse Anhaltspunkte über die Adhäsion von *E. coli*-Bakterien und können als Grundlage zur Hypothesengenerierung genutzt werden, die sich mit spezifischen (Adhäsions-)Mechanismen und deren Reaktionen auseinandersetzen. Ein somit vertieftes Verständnis für verschiedene Adhäsionsmechanismen ist Voraussetzung zur Generierung von wirksameren antiadhäsiven und -mikrobiellen Oberflächen.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADKINS, J.N., VARNUM, S.M., AUBERRY, K.J., MOORE, R.J., ANGELL, N.H., SMITH, R.D., SPRINGER, D.L. & POUNDS, J.G. (2002) Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 947–955.
- AKANNY, E., BONHOMMÉ, A., BESSUEILLE, F., BOURGEOIS, S. & BORDES, C. (2020) Surface enhanced Raman spectroscopy for bacteria analysis: a review. *Applied Spectroscopy Reviews* **0**, 1–43.
- ALDEA, M., HERNÁNDEZ-CHICO, C., DE LA CAMPA, A.G., KUSHNER, S.R. & VICENTE, M. (1988) Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**, 5169–5176.
- ANDERSON, G.G., PALERMO, J.J., SCHILLING, J.D., ROTH, R., HEUSER, J. & HULTGREN, S.J. (2003) Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**, 105–107.
- ANDERSON, J.M., RODRIGUEZ, A. & CHANG, D.T. (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology* **20**, 86–100.
- AOKI, S.K., DINER, E.J., DE ROODENBEKE, C. T'KINT, BURGESS, B.R., POOLE, S.J., BRAATEN, B.A., JONES, A.M., WEBB, J.S., HAYES, C.S., COTTER, P.A. & LOW, D.A. (2010) A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* **468**, 439–442.
- ARCIOLA, C.R., CAMPOCCIA, D. & MONTANARO, L. (2018) Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 397–409.
- ARTHUR, J.C., PEREZ-CHANONA, E., MÜHLBAUER, M., TOMKOVICH, S., URONIS, J.M., FAN, T.-J., CAMPBELL, B.J., ABUJAMEL, T., DOGAN, B., ROGERS, A.B., RHODES, J.M., STINTZI, A., SIMPSON, K.W., HANSEN, J.J., KEKU, T.O., ET AL. (2012) Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338**, 120–123.
- AZEREDO, J., AZEVEDO, N.F., BRIANDET, R., CERCA, N., COENYE, T., COSTA, A.R., DESVAUX, M., BONAVENTURA, G.D., HÉBRAUD, M., JAGLIC, Z., KAČÁNIOVÁ, M., KNØCHEL, S., LOURENÇO, A., MERGULHÃO, F., MEYER, R.L., ET AL. (2017) Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* **43**, 313–351.
- BABA, T., ARA, T., HASEGAWA, M., TAKAI, Y., OKUMURA, Y., BABA, M., DATSENKO, K.A., TOMITA, M., WANNER, B.L. & MORI, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* **2**, 2006.0008.
- BARBOUR, M.E., O'SULLIVAN, D.J., JENKINSON, H.F. & JAGGER, D.C. (2007) The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **18**, 1439–1447.
- BAYRAMOGLU, B., TOUBIANA, D. & GILLOR, O. (2017) Genome-wide transcription profiling of aerobic and anaerobic *Escherichia coli* biofilm and planktonic cultures. *FEMS Microbiology Letters* **364**.
- BAZAKA, K., JACOB, M.V., CRAWFORD, R.J. & IVANOVA, E.P. (2011) Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta Biomaterialia* **7**, 2015–2028.
- BELOIN, C., HOURLY, A., FROMENT, M., GHIGO, J.-M. & HENRY, N. (2008) A Short-Time Scale Colloidal System Reveals Early Bacterial Adhesion Dynamics. *PLoS Biology* **6**, e167.
- BENDER, R.A. (2010) A NAC for regulating metabolism: the nitrogen assimilation control protein (NAC) from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **192**, 4801–4811.
- BERNE, C., DUCRET, A., HARDY, G.G. & BRUN, Y.V. (2015) Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiology spectrum* **3**, Chapter 9.
- BLANQUER, A., HYNOWSKA, A., NOGUÉS, C., IBÁÑEZ, E., SORT, J., BARÓ, M.D., ÖZKALE, B., PANÉ, S., PELLICER, E. & BARRIOS, L. (2016) Effect of surface modifications of Ti₄₀Zr₁₀Cu₃₈Pd₁₂ bulk metallic glass and Ti-6Al-4V alloy on human osteoblasts *in vitro* biocompatibility. *PLoS ONE* **11**, e0156644.
- BLOUNT, Z.D. (2015) The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife* **4**, e05826.

- BRZOSKA, P. & BOOS, W. (1988) Characteristics of a *ugp*-encoded and *phoB*-dependent glycerophosphoryl diester phosphodiesterase which is physically dependent on the Ugp transport system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**, 4125–4135.
- BUFE, T., HENNIG, A., KLUMPP, J., WEISS, A., NIESELT, K. & SCHMIDT, H. (2019) Differential transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains reveals differences in response to plant-derived compounds. *BMC Microbiology* **19**, 212.
- BURY-MONÉ, S., NOMANE, Y., REYMOND, N., BARBET, R., JACQUET, E., IMBEAUD, S., JACQ, A. & BOULOC, P. (2009) Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics* **5**, e1000651.
- BUSSCHER, H.J. & MEI, H.C. VAN DER (2012) How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLOS Pathogens* **8**, e1002440.
- CACCIAFESTA, P., HUMPHRIS, A.D.L., JANDT, K.D. & MERVYN J., M. (2000) Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic force microscopy. *Langmuir* **16**, 8167–8175.
- CAGLIERO, C., GRAND, R.S., JONES, M.B., JIN, D.J. & O’SULLIVAN, J.M. (2013) Genome conformation capture reveals that the *Escherichia coli* chromosome is organized by replication and transcription. *Nucleic Acids Research* **41**, 6058–6071.
- CAI, K., MÜLLER, M., BOSSERT, J., RECHTENBACH, A. & JANDT, K.D. (2005) Surface structure and composition of flat titanium thin films as a function of film thickness and evaporation rate. *Applied Surface Science* **250**, 252–267.
- CARATTOLI, A., ZANKARI, E., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., VOLDBY LARSEN, M., LUND, O., VILLA, L., MØLLER AARESTRUP, F. & HASMAN, H. (2014) *In silico* detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 3895–3903.
- CEGELSKI, L., PINKNER, J.S., HAMMER, N.D., CUSUMANO, C.K., HUNG, C.S., CHORELL, E., ÅBERG, V., WALKER, J.N., SEED, P.C., ALMQVIST, F., CHAPMAN, M.R. & HULTGREN, S.J. (2009) Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology* **5**, 913–919.
- CHAPMAN, M.R., ROBINSON, L.S., PINKNER, J.S., ROTH, R., HEUSER, J., HAMMAR, M., NORMARK, S. & HULTGREN, S.J. (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**, 851–855.
- CHEN, S.L., HUNG, C.-S., XU, J., REIGSTAD, C.S., MAGRINI, V., SABO, A., BLASIAR, D., BIERI, T., MEYER, R.R., OZERSKY, P., ARMSTRONG, J.R., FULTON, R.S., LATREILLE, J.P., SPIETH, J., HOOTON, T.M., ET AL. (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5977–5982.
- CHENG, Y., FENG, G. & MORARU, C.I. (2019) Micro- and nanotopography sensitive bacterial attachment mechanisms: a review. *Frontiers in Microbiology* **10**, 191.
- CHEVANCE, F.F.V. & HUGHES, K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 455–465.
- CHRISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., YOUNGER, J.J., BADDOUR, L.M., BARRETT, F.F., MELTON, D.M. & BEACHEY, E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* **22**, 996–1006.
- COENYE, T. & NELIS, H.J. (2010) *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* **83**, 89–105.
- CORNELISSEN, R., BØGGILD, A., THIRUVALLUR EACHAMBADI, R., KONING, R.I., KREMER, A., HIDALGO-MARTINEZ, S., ZETSCHKE, E.-M., DAMGAARD, L.R., BONNÉ, R., DRIJKONINGEN, J., GEELHOED, J.S., BOESEN, T., BOSCHKER, H.T.S., VALCKE, R., NIELSEN, L.P., ET AL. (2018) The cell envelope structure of cable bacteria. *Frontiers in Microbiology* **9**, 3044.
- CRAIG, L., PIQUE, M.E. & TAINER, J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 363–378.

- CRAWFORD, R.J., WEBB, H.K., TRUONG, V.K., HASAN, J. & IVANOVA, E.P. (2012) Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Advances in Colloid and Interface Science* **179–182**, 142–149.
- CRÉMET, L., BROQUET, A., BRULIN, B., JACQUELINE, C., DAUVERGNE, S., BRION, R., ASEHNOUNE, K., CORVEC, S., HEYMANN, D. & CAROFF, N. (2015) Pathogenic potential of *Escherichia coli* clinical strains from orthopedic implant infections towards human osteoblastic cells. *Pathogens and Disease* **73**, ftv065.
- CRÉMET, L., CORVEC, S., BATARD, E., AUGER, M., LOPEZ, I., PAGNIEZ, F., DAUVERGNE, S. & CAROFF, N. (2013) Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **75**, 252–255.
- CRÉMET, L., CORVEC, S., BEMER, P., BRET, L., LEBRUN, C., LESIMPLE, B., MIEGEVILLE, A.F., REYNAUD, A., LEPELLETIER, D. & CAROFF, N. (2012) Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. *Journal of Infection* **64**, 169–175.
- CRICK, F.H.C., BARNETT, L., BRENNER, S. & WATTS-TOBIN, R.J. (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* **192**, 1227–1232.
- DAMIATI, L., EALES, M.G., NOBBS, A.H., SU, B., TSIMBOURI, P.M., SALMERON-SANCHEZ, M. & DALBY, M.J. (2018) Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *Journal of tissue engineering* **9**, 2041731418790694–2041731418790694.
- DARK, M.J. (2013) Whole-genome sequencing in bacteriology: state of the art. *Infection and Drug Resistance* **6**, 115–123.
- DAUBEN, T.J., DEWALD, C., FIRKOWSKA-BODEN, I., HELBING, C., PEISKER, H., ROTH, M., BOSSERT, J. & JANDT, K.D. (2020) Quantifying the relationship between surfaces' nano-contact point density and adhesion force of *Candida albicans*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **194**, 111177.
- DAVEY, M.E. & DUNCAN, M.J. (2006) Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* **188**, 5510–5523.
- DELCHER, A.L., PHILLIPPY, A., CARLTON, J. & SALZBERG, S.L. (2002) Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Research* **30**, 2478–2483.
- DENICH, T.J., BEAUDETTE, L.A., LEE, H. & TREVORS, J.T. (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 149–182.
- DEUTSCHER, M.P. (2003) Degradation of stable RNA in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 45041–45044.
- DIJCK, P.V., SJOLLEMA, J., CAMMUE, B.P.A., LAGROU, K., BERMAN, J., D'ENFERT, C., ANDES, D.R., ARENDRUP, M.C., BRAKHAGE, A.A., CALDERONE, R., CANTÓN, E., COENYE, T., COS, P., COWEN, L.E., EDGERTON, M., ET AL. (2018) Methodologies for *in vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microbial Cell* **5**, 300–326.
- DING, X., ZHOU, L., WANG, J., ZHAO, Q., LIN, X., GAO, Y., LI, S., WU, J., RONG, M., GUO, Z., LAI, C., LU, H. & JIA, F. (2015) The effects of hierarchical micro/nanosurfaces decorated with TiO₂ nanotubes on the bioactivity of titanium implants *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Nanomedicine* **10**, 6955–6973.
- DOLATSHAHI-PIROUZ, A., RECHENDORFF, K., HOVGAARD, M.B., FOSS, M., CHEVALLIER, J. & BESENBACHER, F. (2008) Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **66**, 53–59.
- DRESSAIRE, C., MOREIRA, R.N., BARAHONA, S., MATOS, A.P.A. DE & ARRAIANO, C.M. (2015) BolA is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development. *mBio* **6**, e2352-14.
- DUBOIS-BRISSONNET, F., TROTIER, E. & BRIANDET, R. (2016) The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1673.
- EFRON, B. (1979) Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals of Statistics* **7**, 1–26.

- EID, J., FEHR, A., GRAY, J., LUONG, K., LYLE, J., OTTO, G., PELUSO, P., RANK, D., BAYBAYAN, P., BETTMAN, B., BIBILLO, A., BJORNSON, K., CHAUDHURI, B., CHRISTIANS, F., CICERO, R., ET AL. (2009) Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)* **323**, 133–138.
- ELPERS, L. & HENSEL, M. (2020) Expression and functional characterization of various chaperon-usher fimbriae, curli fimbriae, and type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai. *Frontiers in Microbiology* **11**, 378.
- FISH, K.E., COLLINS, R., GREEN, N.H., SHARPE, R.L., DOUTERELO, I., OSBORN, A.M. & BOXALL, J.B. (2015) Characterisation of the physical composition and microbial community structure of biofilms within a model full-scale drinking water distribution system. *PLoS ONE* **10**, e0115824.
- FITZGERALD, R.H. (1979) Microbiologic environment of the conventional operating room. *Archives of Surgery* **114**, 772–775.
- FLEMMING, H.-C., NEU, T.R. & WOZNIAK, D.J. (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology* **189**, 7945–7947.
- FLEMMING, H.-C. & WINGENDER, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 623–633.
- FLETCHER, M. & FLOODGATE, G.D. (1973) An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *Microbiology* **74**, 325–334.
- FRAIKIN, N., GOORMAGHTIGH, F. & MELDEREN, L.V. (2020) Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions. *Journal of Bacteriology* **202**, e00763-19.
- FREIRE, P., NEVES MOREIRA, R. & ARRAIANO, C.M. (2009) BofA inhibits cell elongation and regulates MreB expression levels. *Journal of Molecular Biology* **385**, 1345–1351.
- FRIEDLANDER, R.S., VLAMAKIS, H., KIM, P., KHAN, M., KOLTER, R. & AIZENBERG, J. (2013) Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 5624–5629.
- FRIEDLANDER, R.S., VOGEL, N. & AIZENBERG, J. (2015) Role of flagella in adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces. *Langmuir* **31**, 6137–6144.
- FRÖJD, V., LINDERBÄCK, P., WENNERBERG, A., CHÁVEZ DE PAZ, L., SVENSÅTER, G. & DAVIES, J.R. (2011) Effect of nanoporous TiO₂ coating and anodized Ca²⁺ modification of titanium surfaces on early microbial biofilm formation. *BMC Oral Health* **11**, 8.
- GAO, Y., YURKOVICH, J.T., SEO, S.W., KABIMOLDAJEV, I., DRÄGER, A., CHEN, K., SASTRY, A.V., FANG, X., MIH, N., YANG, L., EICHNER, J., CHO, B.-K., KIM, D. & PALSSON, B.O. (2018) Systematic discovery of uncharacterized transcription factors in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Nucleic Acids Research* **46**, 10682–10696.
- GEESEY, G.G., MUTCH, R., COSTERTON, J.W. & GREEN, R.B. (1978) Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnology and Oceanography* **23**, 1214–1223.
- GENG, J., BELOIN, C., GHIGO, J.-M. & HENRY, N. (2014) Bacteria hold their breath upon surface contact as shown in a strain of *Escherichia coli*, using dispersed surfaces and flow cytometry analysis. *PLoS One* **9**, e102049.
- GENZER, J. & EFIMENKO, K. (2006) Recent developments in superhydrophobic surfaces and their relevance to marine fouling: a review. *Biofouling* **22**, 339–360.
- GHATAK, S., KING, Z.A., SASTRY, A. & PALSSON, B.O. (2019) The γ -ome defines the 35% of *Escherichia coli* genes that lack experimental evidence of function. *Nucleic Acids Research* **47**, 2446–2454.
- GIACHINO, A. & WALDRON, K.J. (2020) Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. *Molecular Microbiology* **114**, 377–390.
- GIBSON, D.G., YOUNG, L., CHUANG, R.-Y., VENTER, J.C., HUTCHISON, C.A. & SMITH, H.O. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**, 343–345.
- GOORMANS, A.R., SNOECK, N., DECADT, H., VERMEULEN, K., PETERS, G., COUSSEMENT, P., VAN HERPE, D., BEAUPREZ, J.J., DE MAESENEIRE, S.L. & SOETAERT, W.K. (2020) Comprehensive study on *Escherichia coli* genomic expression: Does position really matter? *Metabolic Engineering* **62**, 10–19.

- GORDON, V.D. & WANG, L. (2019) Bacterial mechanosensing: the force will be with you, always. *Journal of Cell Science* **132**, jcs227694.
- GUINOTE, I.B., MOREIRA, R.N., BARAHONA, S., FREIRE, P., VICENTE, M. & ARRAIANO, C.M. (2014) Breaking through the stress barrier: the role of BolA in Gram-negative survival. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**, 2559–2566.
- GUZMÁN-SOTO, I., MCTIERNAN, C., GONZALEZ-GOMEZ, M., ROSS, A., GUPTA, K., SUURONEN, E.J., MAH, T.-F., GRIFFITH, M. & ALARCON, E.I. (2021) Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. *iScience* **24**, 102443.
- HASMAN, H., CHAKRABORTY, T. & KLEMM, P. (1999) Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *Journal of Bacteriology* **181**, 4834–4841.
- HENRICI, A.T. (1933) Studies of freshwater bacteria. *Journal of Bacteriology* **25**, 277–287.
- HERMAN, A., SERFECZ, J., KINNALLY, A., CROSBY, K., YOUNGMAN, M., WYKOFF, D. & WILSON, J.W. (2016) The bacterial *iprA* gene is conserved across *Enterobacteriaceae*, is involved in oxidative stress resistance, and influences gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **198**, 2166–2179.
- HIZAL, F., CHOI, C.-H., BUSSCHER, H.J. & VAN DER MEI, H.C. (2016) Staphylococcal adhesion, detachment and transmission on nanopillared Si surfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**, 30430–30439.
- HOOK, A.L., CHANG, C.-Y., YANG, J., LUCKETT, J., COCKAYNE, A., ATKINSON, S., MEI, Y., BAYSTON, R., IRVINE, D.J., LANGER, R., ANDERSON, D.G., WILLIAMS, P., DAVIES, M.C. & ALEXANDER, M.R. (2012) Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nature Biotechnology* **30**, 868–875.
- HSU, L.C., FANG, J., BORCA-TASCIUC, D.A., WOROBO, R.W. & MORARU, C.I. (2013) Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 2703–2712.
- HUFNAGEL, D.A., DEPAS, W.H. & CHAPMAN, M.R. (2015) The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology Spectrum* **3**, 10.1128/microbiolspec.MB-0014–2014.
- IVANOVA, E.P., HASAN, J., WEBB, H.K., GERVINSKAS, G., JUODKAZIS, S., TRUONG, V.K., WU, A.H.F., LAMB, R.N., BAULIN, V.A., WATSON, G.S., WATSON, J.A., MAINWARING, D.E. & CRAWFORD, R.J. (2013) Bactericidal activity of black silicon. *Nature Communications* **4**.
- IVANOVA, E.P., TRUONG, V.K., WANG, J.Y., BERNDT, C.C., JONES, R.T., YUSUF, PEAKE, I., SCHMIDT, H.W., FLUKE, C., BARNES, D. & CRAWFORD, R.J. (2010) Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir* **26**, 1973–1982.
- IVANOVA, E.P., TRUONG, V.K., WEBB, H.K., BAULIN, V.A., WANG, J.Y., MOHAMMODI, N., WANG, F., FLUKE, C. & CRAWFORD, R.J. (2011) Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. *Scientific Reports* **1**, 165.
- IWADATE, Y. & KATO, J. (2019) Identification of a formate-dependent uric acid degradation pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **201**, e00573-18.
- JENKINS, J., MANTELL, J., NEAL, C., GHOLINIA, A., VERKADE, P., NOBBS, A.H. & SU, B. (2020) Antibacterial effects of nanopillar surfaces are mediated by cell impedance, penetration and induction of oxidative stress. *Nature Communications* **11**, 1626.
- JENSEN, S.I., LENNEN, R.M., HERRGÅRD, M.J. & NIELSEN, A.T. (2015) Seven gene deletions in seven days: fast generation of *Escherichia coli* strains tolerant to acetate and osmotic stress. *Scientific Reports* **5**, 17874.
- JIA, K., WANG, G., LIANG, L., WANG, M., WANG, H. & XU, X. (2017) Preliminary transcriptome analysis of mature biofilm and planktonic cells of *Salmonella enteritidis* exposure to acid stress. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1861.
- JOLMA, A., KIVIOJA, T., TOIVONEN, J., CHENG, L., WEI, G., ENGE, M., TAIPALE, M., VAQUERIZAS, J.M., YAN, J., SILLANPÄÄ, M.J., BONKE, M., PALIN, K., TALUKDER, S., HUGHES, T.R., LUSCOMBE, N.M., ET AL. (2010) Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities. *Genome Research* **20**, 861–873.

- JUSTICE, S.S., HUNG, C., THERIOT, J.A., FLETCHER, D.A., ANDERSON, G.G., FOOTER, M.J. & HULTGREN, S.J. (2004) Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 1333–1338.
- JUSTICE, S.S., HUNSTAD, D.A., CEGELSKI, L. & HULTGREN, S.J. (2008) Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 162–168.
- KALLAS, P., HAUGEN, H.J., GADEGAARD, N., STORMONTH-DARLING, J., HULANDER, M., ANDERSSON, M. & VALEN, H. (2020) Adhesion of *Escherichia coli* to nanostructured surfaces and the role of type 1 fimbriae. *Nanomaterials* **10**, 2247.
- KAMENŠEK, S. & ŽGUR-BERTOK, D. (2013) Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* **13**, 42.
- KANG, S., HERZBERG, M., RODRIGUES, D.F. & ELIMELECH, M. (2008) Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir* **24**, 6409–6413.
- KAPER, J.B., NATARO, J.P. & MOBLEY, H.L.T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 123–140.
- KIM, J.-S., KIM, Y.J., SEO, S., SEONG, M.-J. & LEE, K. (2015) Functional role of *bdm* during flagella biogenesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **70**, 369–373.
- KIM, Y., WANG, X., MA, Q., ZHANG, X.-S. & WOOD, T.K. (2009) Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *Journal of Bacteriology* **191**, 1258–1267.
- KIMKES, T.E.P. & HEINEMANN, M. (2019) How bacteria recognise and respond to surface contact. *FEMS Microbiology Reviews* **44**, 106–122.
- KIRCHHOFF, J., GLASER, U., BOHNERT, J.A., PLETZ, M.W., POPP, J. & NEUGEBAUER, U. (2018) Simple ciprofloxacin resistance test and determination of minimal inhibitory concentration (MIC) within 2 h using Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* **90**, 1811–1818.
- KLEIN, M.I., SCOTT-ANNE, K.M., GREGOIRE, S., ROSALEN, P.L. & KOO, H. (2012) Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Molecular Oral Microbiology* **27**, 350–361.
- KLEMM, P., HJERRILD, L., GJERMANSEN, M. & SCHEMBRI, M.A. (2004) Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **51**, 283–296.
- KNÖPPEL, A., KNOPP, M., ALBRECHT, L.M., LUNDIN, E., LUSTIG, U., NÄSVALL, J. & ANDERSSON, D.I. (2018) Genetic adaptation to growth under laboratory conditions in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Frontiers in Microbiology* **9**, 756.
- KRAM, K.E., HENDERSON, A.L. & FINKEL, S.E. (2020) *Escherichia coli* has a unique transcriptional program in long-term stationary phase allowing identification of genes important for survival. *mSystems* **5**, e00364-20.
- KREMPL, P.M., MAIRHOFER, J., STRIEDNER, G. & THALLINGER, G.G. (2014) Finished genome sequence of the laboratory strain *Escherichia coli* K-12 RV308 (ATCC 31608). *Genome Announcements* **2**, e00971-14.
- KWAN, B.W., VALENTA, J.A., BENEDIK, M.J. & WOOD, T.K. (2013) Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 1468–1473.
- LADOMERSKY, E., KHAN, A., SHANBHAG, V., CAVET, J.S., CHAN, J., WEISMAN, G.A. & PETRIS, M.J. (2017) Host and pathogen copper-transporting P-type ATPases function antagonistically during *Salmonella* infection. *Infection and Immunity* **85**, e00351-17.
- LAMMERS, A.J., DE PORTO, A.P., FLORQUIN, S., DE BOER, O.J., BOOTSMAN, H.J., HERMANS, P.W. & VAN DER POLL, T. (2011) Enhanced vulnerability for *Streptococcus pneumoniae* sepsis during asplenia is determined by the bacterial capsule. *Immunobiology* **216**, 863–870.
- LEE, J.-H., KIM, Y.-G., CHO, M.H., WOOD, T.K. & LEE, J. (2011) Transcriptomic analysis for genetic mechanisms of the factors related to biofilm formation in *Escherichia coli* O157:H7. *Current Microbiology* **62**, 1321–1330.

- LEIMBACH, A., HACKER, J. & DOBRINDT, U. (2013) E. coli as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Between Pathogenicity and Commensalism*, 3–32.
- LEWIS, K. (2010) Persister Cells. *Annual Review of Microbiology* **64**, 357–372.
- LI, B. & LOGAN, B.E. (2004) Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* **36**, 81–90.
- LI, J., ATTILA, C., WANG, L., WOOD, T.K., VALDES, J.J. & BENTLEY, W.E. (2007) Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: Effects on small RNA and biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* **189**, 6011–6020.
- LINKLATER, D.P., BAULIN, V.A., JUODKAZIS, S. & IVANOVA, E.P. (2018) Mechano-bactericidal mechanism of graphene nanomaterials. *Interface Focus* **8**, 20170060.
- LINTON, K.J. & HIGGINS, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Molecular Microbiology* **28**, 5–13.
- LIU, L., BHATIA, R. & WEBSTER, T.J. (2017) Atomic layer deposition of nano-TiO₂ thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 8711–8723.
- LOURENÇO, A., FERREIRA, A., VEIGA, N., MACHADO, I., PEREIRA, M.O. & AZEVEDO, N.F. (2012) BioOmics: A web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PLOS ONE* **7**, e39960.
- LÜDECKE, C., BOSSERT, J., ROTH, M. & JANDT, K.D. (2013) Physical vapor deposited titanium thin films for biomedical applications: Reproducibility of nanoscale surface roughness and microbial adhesion properties. *Applied Surface Science* **280**, 578–589.
- LÜDECKE, C., JANDT, K.D., SIEGISMUND, D., KUJAU, M.J., ZANG, E., RETTENMAYR, M., BOSSERT, J. & ROTH, M. (2014) Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter. *PLoS ONE* **9**, e84837.
- LÜDECKE, C., ROTH, M., YU, W., HORN, U., BOSSERT, J. & JANDT, K.D. (2016) Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* via nano adhesion points. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* **145**, 617–625.
- LUKJANCENKO, O., WASSENAAR, T.M. & USSERY, D.W. (2010) Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology* **60**, 708–720.
- MACNAB, R.M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annual Review of Microbiology* **57**, 77–100.
- MARCHLER-BAUER, A., BO, Y., HAN, L., HE, J., LANCZYCKI, C.J., LU, S., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M.K., GEER, R.C., GONZALES, N.R., GWADZ, M., HURWITZ, D.I., LU, F., MARCHLER, G.H., SONG, J.S., ET AL. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* **45**, D200–D203.
- MARSHALL, K.C., STOUT, R. & MITCHELL, R. (1971) Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology* **68**, 337–348.
- MARTINEZ-GIL, M., GOH, K.G.K., RACKAITYTE, E., SAKAMOTO, C., AUDRAIN, B., MORIEL, D.G., TOSHIKA, M., GHIGO, J.-M., SCHEMBRI, M.A. & BELOIN, C. (2017) YeeJ is an inverse autotransporter from *Escherichia coli* that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation. *Scientific Reports* **7**, 11326.
- MCCRATE, O.A., ZHOU, X., REICHHARDT, C. & CEGELSKI, L. (2013) Sum of the parts: Composition and architecture of the bacterial extracellular matrix. *Journal of Molecular Biology* **425**, 4286–4294.
- MEERKAM, H. (2014) *Schaeffler Technisches Taschenbuch STT*.
- METTERT, E.L. & KILEY, P.J. (2014) Coordinate regulation of the Suf and Isc Fe-S cluster biogenesis pathways by IscR is essential for viability of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **196**, 4315–4323.
- MEYE, P. (2020) Albumin- und Fibrinogenadsorption auf nanorauen Titanoberflächen.
- MOREIRA, R.N., DRESSAIRE, C., BARAHONA, S., GALEGO, L., KAEVER, V., JENAL, U. & ARRAIANO, C.M. (2017) Bola is required for the accurate regulation of c-di-GMP, a central player in biofilm formation. *mBio* **8**, e00443-17.

- MUHAMMAD, M.H., IDRIS, A.L., FAN, X., GUO, Y., YU, Y., JIN, X., QIU, J., GUAN, X. & HUANG, T. (2020) Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology* **11**, 928.
- MUYRERS, J.P.P., ZHANG, Y., TESTA, G. & STEWART, A.F. (1999) Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Research* **27**, 1555–1557.
- NAVES, P., PRADO, G.D., HUELVES, L., GRACIA, M., RUIZ, V., BLANCO, J., RODRÍGUEZ-CERRATO, V., PONTE, M.C. & SORIANO, F. (2008) Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 585–590.
- NCBI (2021) *E. coli* genome assembly and annotation report. *Genome Information by Organism*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/167/> [accessed 27 February 2021].
- NEYROLLES, O., MINTZ, E. & CATTY, P. (2013) Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**, 89.
- NIRENBERG, M., LEDER, P., BERNFIELD, M., BRIMACOMBE, R., TRUPIN, J., ROTTMAN, F. & O'NEAL, C. (1965) RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **53**, 1161–1168.
- NORRANDER, J., KEMPE, T. & MESSING, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101–106.
- NUCCIO, S.-P. & BÄUMLER, A.J. (2007) Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: Fimbrial classification goes greek. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 551–575.
- O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T. & POGNAN, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5421–5426.
- OLSÉN, A., JONSSON, A. & NORMARK, S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**, 652–655.
- ONG, J.L., CARNES, D.L. & BESSHO, K. (2004) Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants *in vivo*. *Biomaterials* **25**, 4601–4606.
- OXGENE (2016) pSF-OXB20. [https://connex.oxgene.com/Products/Plasmids/Details/Mammalian/pSF-OXB20_\(previously_pSF-RecA\)/OG50](https://connex.oxgene.com/Products/Plasmids/Details/Mammalian/pSF-OXB20_(previously_pSF-RecA)/OG50) [accessed 9 December 2020].
- PASINLI, A., YUKSEL, M., CELIK, E., SENER, S. & TAS, A.C. (2010) A new approach in biomimetic synthesis of calcium phosphate coatings using lactic acid–Na lactate buffered body fluid solution. *Acta Biomaterialia* **6**, 2282–2288.
- PETERSON, S.N., MEISSNER, T., SU, A.I., SNESRUD, E., ONG, A.C., SCHORK, N.J. & BRETZ, W.A. (2014) Functional expression of dental plaque microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 108.
- PETROVA, O.E. & SAUER, K. (2012) Sticky situations: Key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology* **194**, 2413–2425.
- PISITHKUL, T., SCHROEDER, J.W., TRUJILLO, E.A., YEESIN, P., STEVENSON, D.M., CHAIAMARIT, T., COON, J.J., WANG, J.D. & AMADOR-NOGUEZ, D. (2019) Metabolic remodeling during biofilm development of *Bacillus subtilis*. *mBio* **10**, e00623-19.
- PORTILLO, M.E., SALVADO, M., TRAMPUZ, A., PLASENCIA, V., RODRIGUEZ-VILLASANTE, M., SORLI, L., PUIG, L. & HORCAJADA, J.P. (2013) Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *Journal of Clinical Microbiol* **51**, 591–594.
- POTTER, L.C., MILLINGTON, P., GRIFFITHS, L., THOMAS, G.H. & COLE, J.A. (1999) Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: Does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochemical Journal* **344**, 77–84.
- PRATT, L.A. & KOLTER, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285–293.
- PRIGENT-COMBARET, C., PRENSIER, G., LE THI, T.T., VIDAL, O., LEJEUNE, P. & DOREL, C. (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology* **2**, 450–464.

- PRUITT, K.D., TATUSOVA, T. & MAGLOTT, D.R. (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research* **35**, D61–D65.
- PRZEKORA, A. (2019) Current trends in fabrication of biomaterials for bone and cartilage regeneration: materials modifications and biophysical stimulations. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 435.
- QIAGEN (2013) Growth Of Bacterial Cultures. <https://www.qiagen.com/dk/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/plasmid-resource-center/growth-of-bacterial-cultures/#Origins%20of%20replication%20and%20copy%20numbers%20of%20various%20plasmids%20and%20cosmids> [accessed 15 December 2020].
- R CORE TEAM (2018) R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/> [accessed 30 June 2020].
- RAGHAVAN, S.S., CHEE, S., LI, J., POSCHMANN, J., NAGARAJAN, N., JIA WEI, S., VERMA, C.S. & GHADDESSY, F.J. (2019) Development and application of a transcriptional sensor for detection of heterologous acrylic acid production in *E. coli*. *Microbial Cell Factories* **18**, 139.
- RAHIMPOUR, M., MONTERO, M., ALMAGRO, G., VIALE, A.M., SEVILLA, Á., CÁNOVAS, M., MUÑOZ, F.J., BAROJA-FERNÁNDEZ, E., BAHAJI, A., EYDALLIN, G., DOSE, H., TAKEUCHI, R., MORI, H. & POZUETA-ROMERO, J. (2013) GlgS, described previously as a glycogen synthesis control protein, negatively regulates motility and biofilm formation in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal* **452**, 559–573.
- RASKO, D.A., ROSOVITZ, M.J., MYERS, G.S.A., MONGODIN, E.F., FRICKE, W.F., GAJER, P., CRABTREE, J., SEBAIHIA, M., THOMSON, N.R., CHAUDHURI, R., HENDERSON, I.R., SPERANDIO, V. & RAVEL, J. (2008) The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology* **190**, 6881–6893.
- REISNER, A., KROGFELT, K.A., KLEIN, B.M., ZECHNER, E.L. & MOLIN, S. (2006) *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriology* **188**, 3572–3581.
- REN, Y., WANG, C., CHEN, Z., ALLAN, E., VAN DER MEI, H.C. & BUSSCHER, H.J. (2018) Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiology Reviews* **42**, 259–272.
- RIZZELLO, L., GALEONE, A., VECCHIO, G., BRUNETTI, V., SABELLA, S. & POMPA, P.P. (2012) Molecular response of *Escherichia coli* adhering onto nanoscale topography. *Nanoscale Research Letters* **7**, 575.
- RIZZELLO, L., SORCE, B., SABELLA, S., VECCHIO, G., GALEONE, A., BRUNETTI, V., CINGOLANI, R. & POMPA, P.P. (2011) Impact of nanoscale topography on genomics and proteomics of adherent bacteria. *ACS Nano* **5**, 1865–1876.
- SANDBERG, M.E., SCHELLMANN, D., BRUNHOFER, G., ERKER, T., BUSYGIN, I., LEINO, R., VUORELA, P.M. & FALLARERO, A. (2009) Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *Journal of Microbiological Methods* **78**, 104–106.
- SANTORO, F., ZHAO, W., JOUBERT, L.-M., DUAN, L., SCHNITKER, J., VAN DE BURGT, Y., LOU, H.-Y., LIU, B., SALLES, A., CUI, L., CUI, Y. & CUI, B. (2017) Revealing the cell-material interface with nanometer resolution by FIB-SEM. *ACS nano* **11**, 8320–8328.
- SAUER, K. (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology* **4**, 219.
- SCHEMBRI, M.A., DALSGAARD, D. & KLEMM, P. (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of Bacteriology* **186**, 1249–1257.
- SCHEMBRI, M.A. & KLEMM, P. (2001) Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *The EMBO Journal* **20**, 3074–3081.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J.-Y., WHITE, D.J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P., ET AL. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682.

- SCHNEIDER, B.L., HERNANDEZ, V.J. & REITZER, L. (2013) Putrescine catabolism is a metabolic response to several stresses in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **88**, 537–550.
- SCHRÖDER, M.-L., ANGRISANI, N., FADEEVA, E., HEGERMANN, J. & REIFENRATH, J. (2020) Laser-structured spike surface shows great bone integrative properties despite infection *in vivo*. *Materials Science and Engineering: C* **109**, 110573.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* **7**, 3.
- SCHWARTZ, D.J., CHEN, S.L., HULTGREN, S.J. & SEED, P.C. (2011) Population dynamics and niche distribution of uropathogenic *Escherichia coli* during acute and chronic urinary tract infection. *Infection and Immunity* **79**, 4250–4259.
- SEELBINDER, B., WOLF, T., PRIEBE, S., MCNAMARA, S., GERBER, S., GUTHKE, R. & LINDE, J. (2019) GEO2RNAseq: An easy-to-use R pipeline for complete pre-processing of RNA-seq data [Preprint]. *bioRxiv: The preprint server for biology*.
- SERRA, D.O. & HENGGE, R. (2014) Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental Microbiology* **16**, 1455–1471.
- SERRA, D.O., RICHTER, A.M. & HENGGE, R. (2013a) Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Bacteriology* **195**, 5540–5554.
- SERRA, D.O., RICHTER, A.M., KLAUCK, G., MIKA, F. & HENGGE, R. (2013b) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* **4**, e00103-13.
- SERRA, D.O., RICHTER, A.M., KLAUCK, G., MIKA, F. & HENGGE, R. (2013c) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* **4**, e00103-00113.
- SEVIOUR, T., DERLON, N., DUEHOLM, M.S., FLEMMING, H.-C., GIRBAL-NEUHAUSER, E., HORN, H., KJELLEBERG, S., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LOTTI, T., MALPEI, M.F., NERENBERG, R., NEU, T.R., PAUL, E., YU, H. & LIN, Y. (2019) Extracellular polymeric substances of biofilms: suffering from an identity crisis. *Water Research* **151**, 1–7.
- SHAFFER, C.L., ZHANG, E.W., DUDLEY, A.G., DIXON, B.R.E.A., GUCKES, K.R., BRELAND, E.J., FLOYD, K.A., CASELLA, D.P., ALGOOD, H.M.S., CLAYTON, D.B. & HADJIFRANGISKOU, M. (2016) Purine biosynthesis metabolically constrains intracellular survival of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **85**, e00471-16.
- SHERLOCK, O., SCHEMBRI, M.A., REISNER, A. & KLEMM, P. (2004) Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **186**, 8058–8065.
- SHIMADA, T., TANAKA, K. & ISHIHAMA, A. (2017) The whole set of the constitutive promoters recognized by four minor sigma subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *PLOS ONE* **12**, e0179181.
- SIDAMBE, A.T. (2014) Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants—a review. *Materials* **7**, 8168–8188.
- SINGH, A.V., GALLUZZI, M., BORGHI, F., INDRIERI, M., VYAS, V., PODESTA, A. & GADE, W.N. (2013) Interaction of bacterial cells with cluster-assembled nanostructured titania surfaces: an atomic force microscopy study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **13**, 77–85.
- SINGH, A.V., VYAS, V., PATIL, R., SHARMA, V., SCOPELLITI, P.E., BONGIORNO, G., PODESTÀ, A., LENARDI, C., GADE, W.N. & MILANI, P. (2011) Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLOS ONE* **6**, e25029.
- SJOLLEMA, J., ZAAT, S.A.J., FONTAINE, V., RAMSTEDT, M., LUGINBUEHL, R., THEVISSSEN, K., LI, J., VAN DER MEI, H.C. & BUSSCHER, H.J. (2018) *In vitro* methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. *Acta Biomaterialia* **70**, 12–24.

- SPENGLER, C., NOLLE, F., MISCHO, J., FAIDT, T., GRANDTHYLL, S., THEWES, N., KOCH, M., MÜLLER, F., BISCHOFF, M., KLATT, M.A. & JACOBS, K. (2019) Strength of bacterial adhesion on nanostructured surfaces quantified by substrate morphometry. *Nanoscale* **11**, 19713–19722.
- SPRIANO, S., YAMAGUCHI, S., BAINO, F. & FERRARIS, S. (2018) A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomaterialia* **79**, 1–22.
- STARK, R., GRZELAK, M. & HADFIELD, J. (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics* **20**, 631–656.
- STEFANI, N., SCHROECKH, V., NEUGEBAUER, U., BOHNERT, J. & BRAKHAGE, A.A. (2020) Genome sequence of *Escherichia coli* KI683, isolated from a urosepsis patient. *Microbiology Resource Announcements* **9**, e01297-19, /mra/9/9/MRA.01297-19.atom.
- STEWART, V., LU, Y. & DARWIN, A.J. (2002) Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **184**, 1314–1323.
- STOLZOFF, M., BURNS, J.E., ASLANI, A., TOBIN, E.J., NGUYEN, C., DE LA TORRE, N., GOLSHAN, N.H., ZIEMER, K.S. & WEBSTER, T.J. (2017) Decreased bacterial growth on titanium nanoscale topographies created by ion beam assisted evaporation. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 1161–1169.
- STRAUB, H., BIGGER, C.M., VALENTIN, J., ABT, D., QIN, X.-H., EBERL, L., MANIURA-WEBER, K. & REN, Q. (2019) Bacterial adhesion on soft materials: passive physicochemical interactions or active bacterial mechanosensing? *Advanced Healthcare Materials* **8**, e1801323.
- SUKHISHVILI, S. & GRANICK, S. (1999) Adsorption of human serum albumin: dependence on molecular architecture of the oppositely charged surface. *The Journal of Chemical Physics* **110**, 10153–10161.
- SULLIVAN, G.M. & FEINN, R. (2012) Using effect size—or why the p value is not enough. *Journal of Graduate Medical Education* **4**, 279–282.
- THEVENOT, P., HU, W. & TANG, L. (2008) Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **8**, 270–280.
- TORRES-CERNA, C.E., MORALES, J.A. & HERNANDEZ-VARGAS, E.A. (2019) Modeling quorum sensing dynamics and interference on *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* **10**.
- TOUCHON, M., HOEDE, C., TENAILLON, O., BARBE, V., BAERISWYL, S., BIDET, P., BINGEN, E., BONACORSI, S., BOUCHIER, C., BOUVET, O., CALTEAU, A., CHIAPELLO, H., CLERMONT, O., CRUVEILLER, S., DANCHIN, A., ET AL. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLOS Genetics* **5**, e1000344.
- TRAPNELL, C., WILLIAMS, B.A., PERTEA, G., MORTAZAVI, A., KWAN, G., VAN BAREN, M.J., SALZBERG, S.L., WOLD, B.J. & PACTER, L. (2010) Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature Biotechnology* **28**, 511–515.
- TU, Q., YIN, J., FU, J., HERRMANN, J., LI, Y., YIN, Y., STEWART, A.F., MÜLLER, R. & ZHANG, Y. (2016) Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific Reports* **6**.
- TUCSON, H.H. & WEIBEL, D.B. (2013) Bacteria-surface interactions. *Soft Matter* **9**, 4368–4380.
- TURLIN, E., SISMEIRO, O., LE CAER, J.P., LABAS, V., DANCHIN, A. & BIVILLE, F. (2005) 3-phenylpropionate catabolism and the *Escherichia coli* oxidative stress response. *Research in Microbiology* **156**, 312–321.
- TURSI, S.A. & TÜKEL, Ç. (2018) Curli-containing enteric biofilms inside and out: matrix composition, immune recognition, and disease implications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* **82**.
- TUTTLE, A.R., TRAHAN, N.D. & SON, M.S. (2021) Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Current Protocols* **1**, e20.
- VAN MOOY, B.A.S., HMELO, L.R., FREDRICKS, H.F., OSSOLINSKI, J.E., PEDLER, B.E., BOGORFF, D.J. & SMITH, P.J.S. (2014) Quantitative exploration of the contribution of settlement, growth, dispersal and

- grazing to the accumulation of natural marine biofilms on antifouling and fouling-release coatings. *Biofouling* **30**, 223–236.
- VANDECANDELAERE, I., VAN ACKER, H. & COENYE, T. (2016) A microplate-based system as *in vitro* model of biofilm growth and quantification. In *Bacterial Persistence: Methods and Protocols* (eds J. MICHIELS & M. FAUVART), pp. 53–66.
- VERKKALA, K., EKLUND, A., OJAJARVI, J., TIITTANEN, L., HOBORN, J. & MAKELA, P. (1998) The conventionally ventilated operating theatre and air contamination control during cardiac surgery – bacteriological and particulate matter control garment options for low level contamination. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **14**, 206–210.
- VIEIRA, H.L.A., FREIRE, P. & ARRAIANO, C.M. (2004) Effect of *Escherichia coli* morphogene *bolA* on biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5682–5684.
- VITAL, M., CHAI, B., ØSTMAN, B., COLE, J., KONSTANTINIDIS, K.T. & TIEDJE, J.M. (2015) Gene expression analysis of *E. coli* strains provides insights into the role of gene regulation in diversification. *The ISME Journal* **9**, 1130–1140.
- WEBB, H.K., BOSHOVKI, V., FLUKE, C.J., TRUONG, V.K., HASAN, J., BAULIN, V.A., LAPOVOK, R., ESTRIN, Y., CRAWFORD, R.J. & IVANOVA, E.P. (2013a) Bacterial attachment on sub-nanometrically smooth titanium substrata. *Biofouling* **29**, 163–170.
- WEBB, J.S., NIKOLAKAKIS, K.C., WILLETT, J.L.E., AOKI, S.K., HAYES, C.S. & LOW, D.A. (2013b) Delivery of CdiA nuclease toxins into target cells during contact-dependent growth inhibition. *PLoS ONE* **8**.
- WEBER, A. & JUNG, K. (2002) Profiling early osmopressure-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA microarrays. *Journal of Bacteriology* **184**, 5502–5507.
- WEBER, M.M., FRENCH, C.L., BARNES, M.B., SIEGELE, D.A. & MCLEAN, R.J.C. (2010) A previously uncharacterized gene, *yjfO* (*bsmA*), influences *Escherichia coli* biofilm formation and stress response. *Microbiology* **156**, 139–147.
- WENZEL, R.N. (1936) Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry* **28**, 988–994.
- WHITESIDES, G.M. & WONG, A.P. (2011) The intersection of biology and materials science. *MRS Bulletin* **31**, 19–27.
- WIDYARATHI, D.S., HAGEDOORN, P.-L., OTTEN, L.G., GANJIAN, M., TÜMER, N., APACHITEI, I., HAGEN, C.W., FRATILA-APACHITEI, L.E. & ZADPOOR, A.A. (2019) Towards osteogenic and bactericidal nanopatterns? *Nanotechnology* **30**, 20LT01.
- WIJETUNGE, D.S.S., KARUNATHILAKE, K.H.E.M., CHAUDHARI, A., KATANI, R., DUDLEY, E.G., KAPUR, V., DEBROY, C. & KARIYAWASAM, S. (2014) Complete nucleotide sequence of pRS218, a large virulence plasmid, that augments pathogenic potential of meningitis-associated *Escherichia coli* strain RS218. *BMC Microbiology* **14**, 203.
- WOOD, T.K., GONZÁLEZ BARRIOS, A.F., HERZBERG, M. & LEE, J. (2006) Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 361–367.
- WOOD, T.K., SONG, S. & YAMASAKI, R. (2019) Ribosome dependence of persister cell formation and resuscitation. *Journal of Microbiology* **57**, 213–219.
- WU, A.R., NEFF, N.F., KALISKY, T., DALERBA, P., TREUTLEIN, B., ROTHENBERG, M.E., MBURU, F.M., MANTALAS, G.L., SIM, S., CLARKE, M.F. & QUAKE, S.R. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nature Methods* **11**, 41–46.
- WU, Y. & OUTTEN, F.W. (2009) IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *Journal of Bacteriology* **191**, 1248–1257.
- WURPEL, D.J., BEATSON, S.A., TOSHIKA, M., PETTY, N.K. & SCHEMBRI, M.A. (2013) Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One* **8**, e52835.
- WUTTGE, S., BOMMER, M., JÄGER, F., MARTINS, B.M., JACOB, S., LICHT, A., SCHEFFEL, F., DOBBEK, H. & SCHNEIDER, E. (2012) Determinants of substrate specificity and biochemical properties of the sn-glycerol-3-phosphate ATP binding cassette transporter (UgpB–AEC2) of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **86**, 908–920.

- XU, L., DONG, Z., FANG, L., LUO, Y., WEI, Z., GUO, H., ZHANG, G., GU, Y.Q., COLEMAN-DERR, D., XIA, Q. & WANG, Y. (2019) OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research* **47**, W52–W58.
- YUAN, Y., HAYS, M.P., HARDWIDGE, P.R. & KIM, J. (2017) Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances* **7**, 14254–14261.
- YURKOV, G.Y., GUBIN, S.P. & OVCHENKOV, E.A. (2009) Magnetic nanocomposites based on the metal-containing (Fe, Co, Ni) nanoparticles inside the polyethylene matrix. In *Magnetic Nanoparticles* pp. 87–115.
- ZHANG, Y., BUCHHOLZ, F., MUYRERS, J.P.P. & STEWART, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics* **20**, 123–128.
- ZHANG, Y., GAO, J., HUANG, Y. & WANG, J. (2018a) Recent developments in single-cell RNA-seq of microorganisms. *Biophysical Journal* **115**, 173–180.
- ZHANG, Y., XIA, B., LI, M., SHI, J., LONG, Y., JIN, Y., BAI, F., CHENG, Z., JIN, S. & WU, W. (2018b) HigB reciprocally controls biofilm formation and the expression of type III secretion system genes through influencing the intracellular c-di-GMP level in *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* **10**.
- ZHAO, B., VAN DER MEI, H.C., RUSTEMA-ABBING, M., BUSSCHER, H.J. & REN, Y. (2015) Osteoblast integration of dental implant materials after challenge by sub-gingival pathogens: a co-culture study *in vitro*. *International Journal of Oral Science* **7**, 250–258.
- ZIMMERLI, W. & SENDI, P. (2011) Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Seminars in Immunopathology* **33**, 295–306.

ANHANG

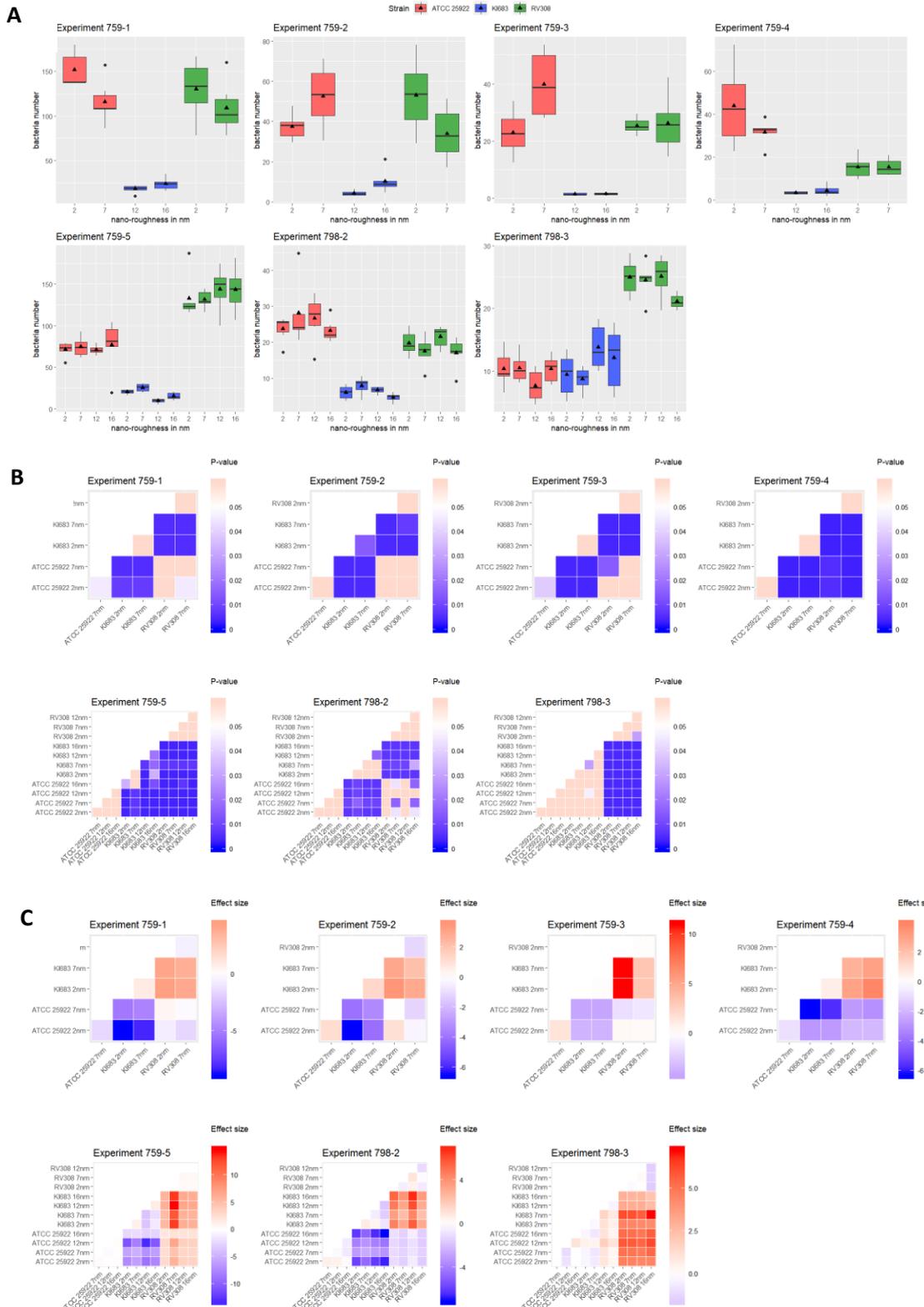


Abb. A1: Bildanalyse der adhärennten *E. coli*-Stämme ATCC 25922, KI683 und RV308 auf 2, 7, 12 und 16 nm rauen Titanoberflächen in den Einzelversuchen. A) Bakterien wurden pro nanorauhe Titanoberfläche (n = 6 pro Gruppe, N = für 2

(Fortsetzung von Abb. A1) und 7 nm; n = 6, N = 3 für 12 und 16 nm) quantifiziert. Die Werte sind auf ATCC 25922 normalisiert. Kreise sind Ausreißer. Dreiecke sind Mittelwerte. B) p-Wert zwischen den Gruppen nach Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur. C) Effektgrößen zwischen den Gruppen mittels Hedges' g. Bildanalyse in Zusammenarbeit mit Bianca Hoffmann (Leibniz-HKI, Angewandte Systembiologie).

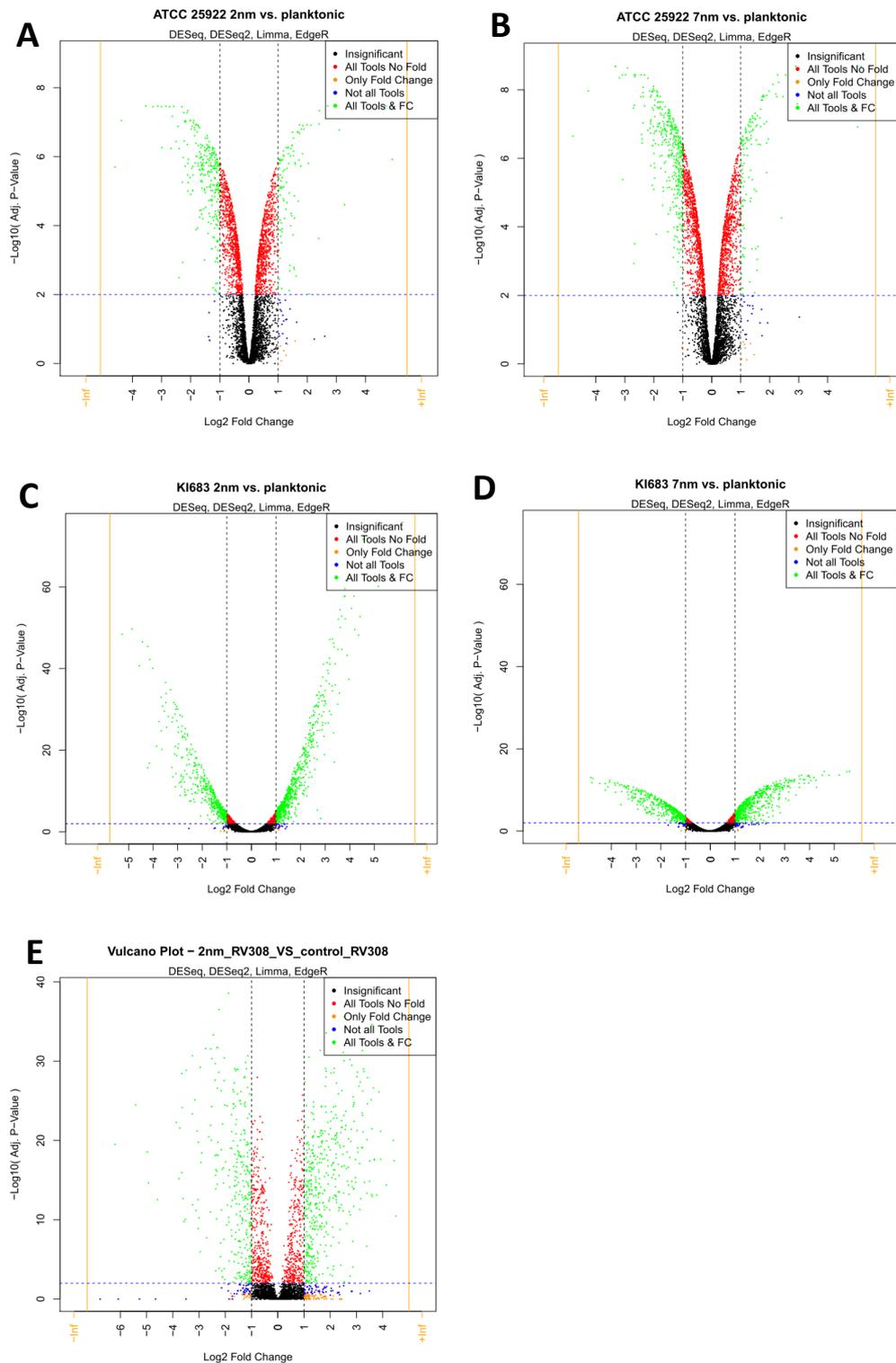


Abb. A2: Vulcanoplots der differentiell exprimierten Gene mit zugehörigen $-\log_{10}$ (adj. p-Werts) und dem \log_2 (FC) auf Basis der Konditionen adhärierend auf 2 nm („2nm“) und planktonisch („planktonic“). A) ATCC 25922 2 nm zu planktonisch, B) ATCC 25922 7 nm zu planktonisch, C) KI683 2 nm zu planktonisch, D) KI683 7 nm zu planktonisch, E) RV308 2 nm zu planktonisch. Zugehörige Tabellen befinden sich in Tab. S1-S3. Transkriptomanalyse in Zusammenarbeit mit Thomas Wolf und Tongta Sae-Ong (Leibniz-HKI, Systembiologie und Bioinformatik).

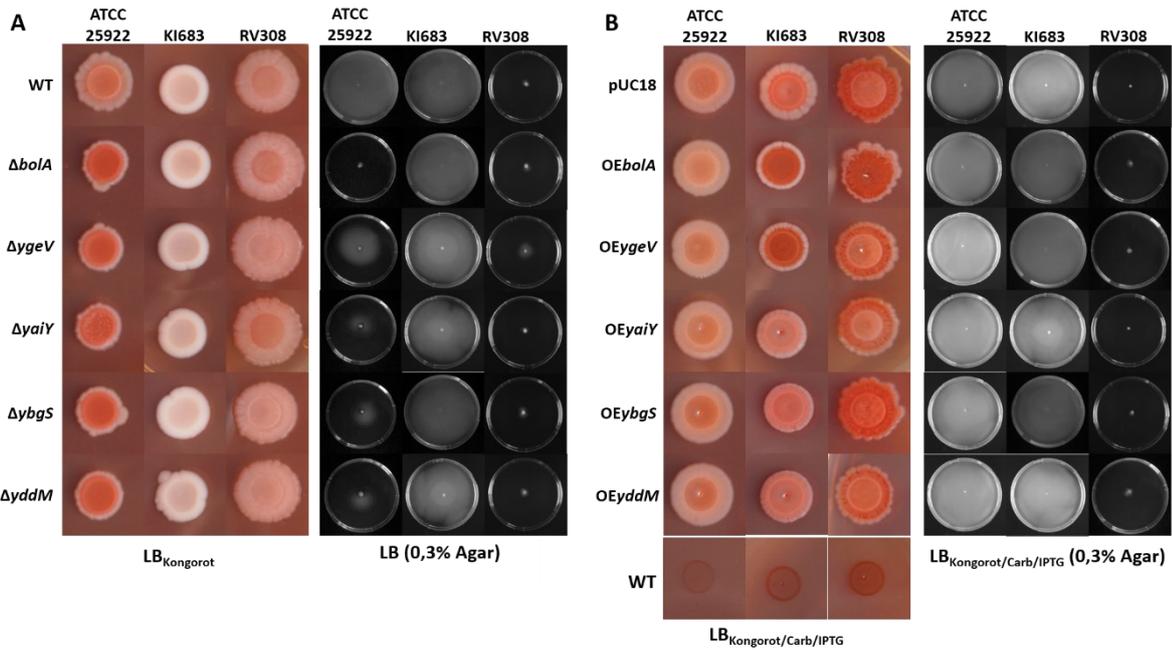


Abb. A3: Phänotypische Charakterisierung der verschiedenen Genotypen von *E. coli* ATCC 25922, KI683 und RV308. A) Deletionsmutanten. B) Überexpressionsmutanten. Curli- und Zellulose-Nachweis durch Bildung von Makrokolonien auf Kongorot- und Coomassie Blau-haltigen LB- und LB_{Carb/IPTG}-Agarplatten nach 48 h Inkubationszeit. Hell- bis dunkelrote Färbungen der Makrokolonien wurden als Curlibildung bewertet, weiße Färbungen als ausbleibende Curlibildung. Blasen oder andere dreidimensionale Strukturen der Makrokolonien wurden als Zelluloseproduktion bewertet, glatte Oberflächen als ausbleibende Zelluloseproduktion. Motilitäts-Nachweis durch Ausprägung einer Trübung in 0,3%igen LB- und LB_{Carb/IPTG}-Agarplatten nach 17 h Inkubationszeit. Die zugehörige Tabelle ist Tab. 19.

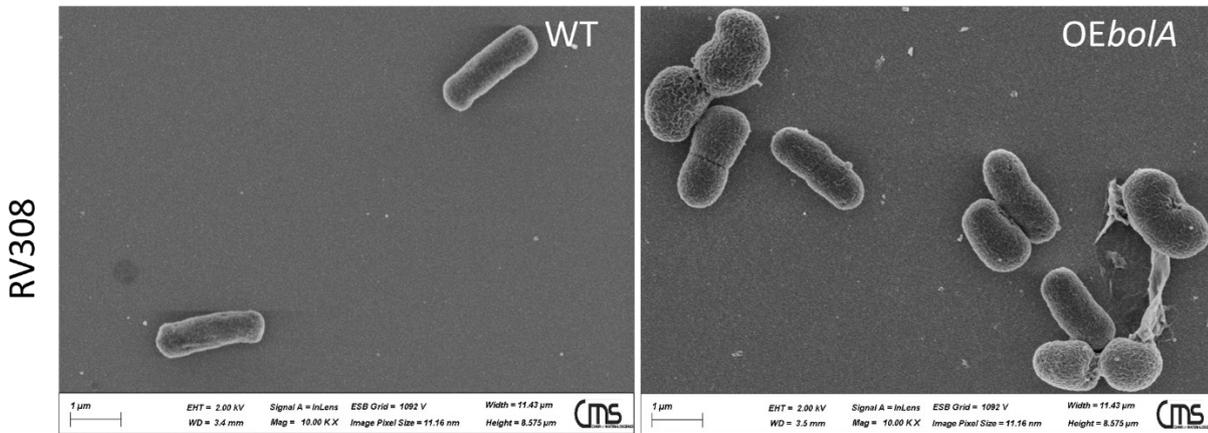


Abb. A4: REM-Aufnahmen adhärerter *E. coli* RV308. Links Wildtyp (WT), rechts Überexpressionsmutante *OEbola* (vgl. Abschnitt C6.3). REM-Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Heidrun Garlipp (OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena).

ATCC 25922

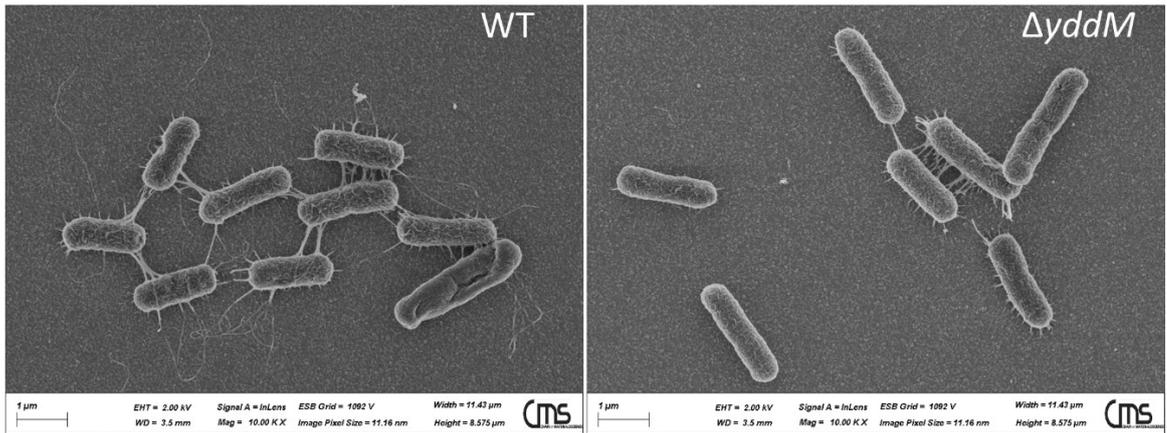


Abb. A5: REM-Aufnahmen adhärrierter *E. coli* ATCC 25922. Links Wildtyp (WT), rechts Deletionsmutante $\Delta yddM$ (vgl. Abschnitt C6.4). REM-Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Heidrun Garlipp (OSIM, Lehrstuhl für Materialwissenschaft Jena).

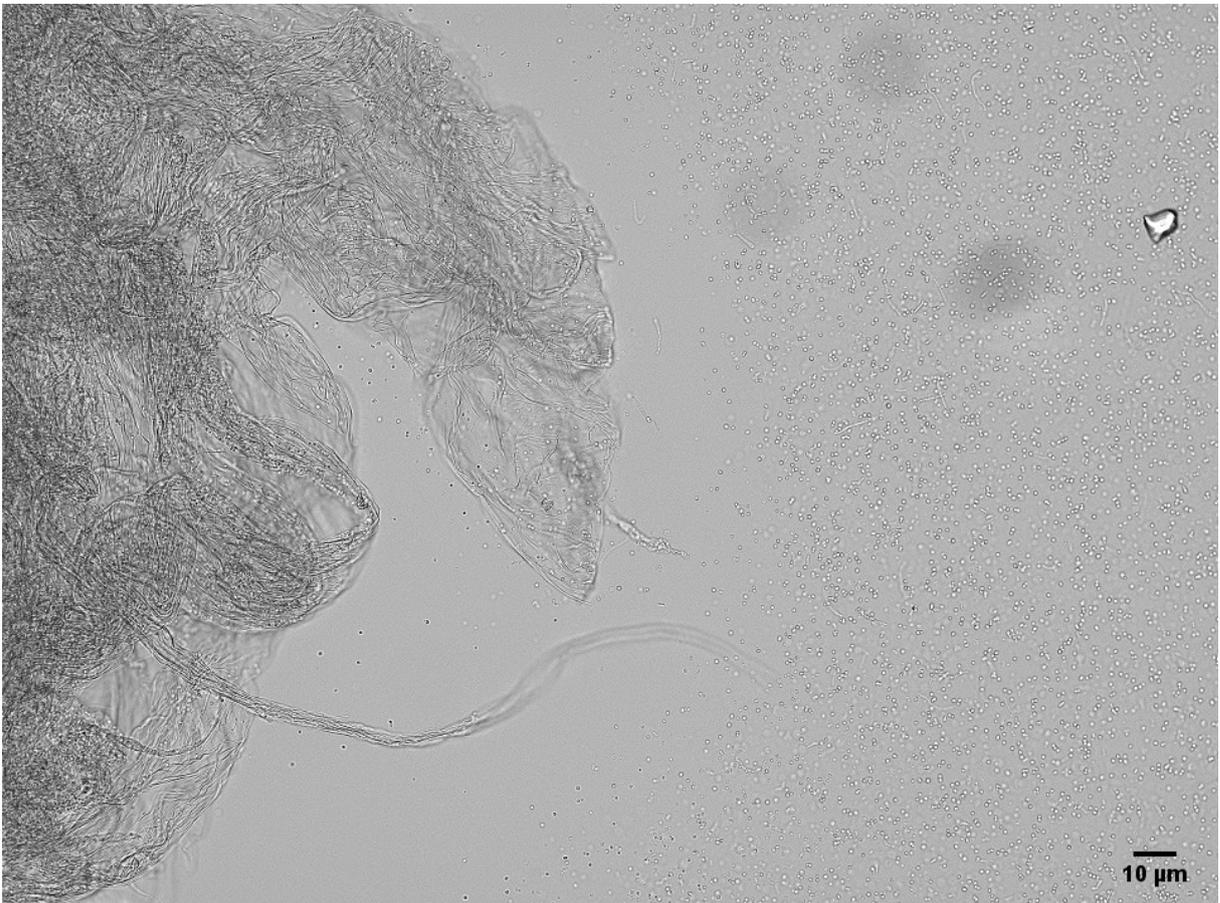


Abb. A6: Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* RV308 OEboIA nach 24 h Inkubationszeit im Biofilmassay. Rechts sind die runden Bakterien zu sehen. Links Zellulose-ähnlicher Biofilm.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	Wachstumskonstante [min ⁻¹]
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
Bit	binäre Ziffer (engl. <i>binary digit</i>)
bp, kb, Mb, Gb	Basenpaar(e), Kilobasenpaar(e), Megabasenpaar(e), Gigabasenpaar(e)
Carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
Kodierende DNA-Sequenzen (CDS)	
<i>cfu</i>	Koloniebildende Einheit (engl. <i>colony forming unit</i>)
ChIP-Seq	Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing
CT	Zyklus-Schwelle (engl. <i>cycle threshold</i>)
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DEG	differentiell exprimierte(s) Gen(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENA	European Nucleotide Archive
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FaCOP	<i>Functional Annotation and Classification of Proteins of Prokaryotes</i> (engl. Funktionelle Annotierung und Klassifizierung von prokaryotischen Proteinen)
FDR	Falscherkennungsrate (engl. <i>false discovery rate</i>)
Fe	Eisen
FIB	Fokussierter Ionenstrahl (engl. <i>focused ion beam</i>)
Flp	Flippase
for, fw	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
FRT	Flp-Erkennungsequenz (engl. <i>flip recombination target</i>)
g	Erdbeschleunigung (ca. 9,81 m/s ²)
gDNA	genomische DNA
GSEA	Genanreicherungsanalyse (engl. <i>gene set enrichment analysis</i>)
h	Stunde
HKI	Hans-Knöll-Institut
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMW	hohes Molekulargewicht (engl. <i>high molecular weight</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KI	Klinisches Isolat
l, ml	Liter, Mililiter
lac-SBF	Laktat-gepufferte simulierte Körperflüssigkeit
LB	Lysogenic Broth (englischer Eigenname für Nährmedium)
LMW	niedriges Molekulargewicht (engl. <i>low molecular weight</i>)
M, mM	Molar (mol/l), Milimolar
mg, ng	Miligramm, Nanogramm
mRNA	messengerRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
X	

OD	Optische Dichte
OE	Überexpression (engl. <i>overexpression</i>)
Ori	Ursprung der Replikation (engl. <i>origin of replication</i>)
OSIM	Otto-Schott -Institut für Materialforschung
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
px	Pixel
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rev, rv	rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
RIN	RNA-Integrität (engl. <i>RNA Integrity Number</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sa.</i>	<i>Salmonella</i>
SOB	Super Optimal Broth (englischer Eigenname für Nährmedium)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
t_d	Verdopplungszeit [min]
Tet	Tetrazyklin
TF	Transkriptionsfaktor
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V, kV	Volt, Kilovolt
V/V	Volumen pro Volumen
m/V	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
Δ	Deletion

LISTE DER WISSENSCHAFTLICHEN PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

Schriftliche Veröffentlichungen

N. Stefani, V. Schroeckh, U. Neugebauer, J. Bohnert und A. A. Brakhage (2020) *Genome sequence of Escherichia coli K1683, isolated from a urosepsis patient*, Microbiology Resource Announcements, vol. 1(9), e01297-19

Tagungsbeiträge

N. Stefani, M. Schürmann, T. Wolf, S. Dietrich, V. Schroeckh, J. Bossert, K. D. Jandt und A. A. Brakhage (2019) *Adhesion of E. coli onto nano-rough titanium surfaces – Image and genetic analyses*, BioMAT, Weimar

N. Stefani, M. Schürmann, T. Wolf, S. Dietrich, V. Schroeckh, J. Bossert, K. D. Jandt und A. A. Brakhage (2019) *Adhesion of E. coli on nano-rough titanium surfaces – Image and genetic analyses*, VAAM, Mainz

N. Stefani, M. Schürmann, V. Schroeckh, J. Bossert, K. D. Jandt und A. A. Brakhage (2017) *Reduction of microorganisms on nano-rough titanium surfaces and related microbial genetic response*, BioMAT, Weimar

N. Stefani, M. Schürmann, V. Schroeckh, J. Bossert, K. D. Jandt und A. A. Brakhage (2017) *Bacteria adhered on nano-rough Titanium surfaces and the search for nano-rough sensitive genes*, JSMC Symposium, Jena

DANKSAGUNG

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich direkt oder indirekt bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ich möchte Herrn Professor Brakhage danken, der mir die Mitarbeit in diesem Forschungsprojekt und damit mein Ziel, mehr über die Interaktion von Mikroben und Oberflächen zu lernen, ermöglichte. Außerdem für die experimentellen Freiheiten, die Förderungen nach Projektende, die strategisch wertvollen Wegweiser und für die schnelle Hilfe beim Endspurt dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank geht ebenso an die Kooperationspartner am Otto-Schott-Institut für Materialforschung am Lehrstuhl für Materialwissenschaft. Michaela, Thomas, Carolin und Christian für die Herstellung sehr vieler Titanoberflächen, einige Diskussionen und Ratschläge in Sachen Oberflächenphysik und Proteinablagerungen. Heidrun und Herrn Wagner danke ich besonders für die zahlreichen Stunden am REM und die exzellenten Bilder!

Auch danke ich sehr Thomas Wolf und Tongta Sae-Ong für die Einführung in bioinformatische Analysen und Stephanie Dietrich und Bianca Hoffmann für statistische Fragestellungen und die Analysen von mehreren tausend Bildern. Ich habe von euch sehr viel gelernt!

Mein Dank gilt auch Volker, der jemanden wie mir mit „oberflächlichen“ Kenntnissen zahlreichen Fragen Rede und Antwort über Mikrobiologie und Genetik stand und viele taktische Wegweiser mitgab. Außerdem für das akribische Korrekturlesen aller meiner Texte. Dadurch konnte ich deren Qualität stets weiter verbessern.

Ich danke herzlichst den guten Feen Carmen, Christina und Sylke, für die reibungslosen Abläufe im Laboralltag, die Hilfsbereitschaft und besonders für ihr Krisenmanagement in allen Bereichen der täglichen und unvermeidlichen Laborkatastrophen.

Vielen herzlichen Dank an meine Mitstreiter Mareike und Carolin für die Abenteuer in und außerhalb Jena und Mario, Linda, Lukas und Hanno für die Abenteuer in Aventurien. Ihr habt mir sehr geholfen Jena heimeliger zu machen und seid mir sehr ans Herz gewachsen.

Vielen Dank auch an meine zahlreichen MAM-Kollegen für die freundliche Atmosphäre. Besonders an Daniela für die Verwaltung und Organisation. Ich habe von jedem Einzelnen, egal ob persönliche Angewohnheit, Essensgericht, Labormethode oder Sprachliches etwas gelernt und mitgenommen!

Vielen herzlichen Dank an meine FreundInnen, die mich jede/r auf ihre/seine Weise beim Entstehen dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Speziell Philipp möchte ich für die Begleitung, die Anregungen und die Ratschläge bezüglich meines wissenschaftlichen Lebensweges danken!

Ein großes, herzliches Danke geht auch an meine Mutter, die mich zu diesem Werdegang nicht nur ermutigte, sondern mich auch konstant unterstützt hat und mir mit „Survival-Paketen“ aus der Ferne den Alltag versüßte.

Zuletzt, aber ausdrücklich danke ich Tobias von Herzen, der mir in jeglicher Phase mit Rat, moralischem Beistand, gutem Essen, geduldigem Korrekturlesen und Tat zur Seite stand.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich bestätige hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig angefertigt und keine Textabschnitte von Dritten oder aus eigenen Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen. Von mir in dieser Arbeit verwendete Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind angegeben. Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung von Manuskripten unterstützt haben, sind in der Danksagung erwähnt. Personen, die an der Erstellung von Manuskripten beteiligt waren, sind in der Publikationsliste aufgeführt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, von mir erhalten.

Ich habe diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht. Des Weiteren habe ich weder die gleiche noch in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den

Nathalie Stefani

CD MIT ERGÄNZENDEN TABELLEN DER TRANSKRIPTOMANALYSE