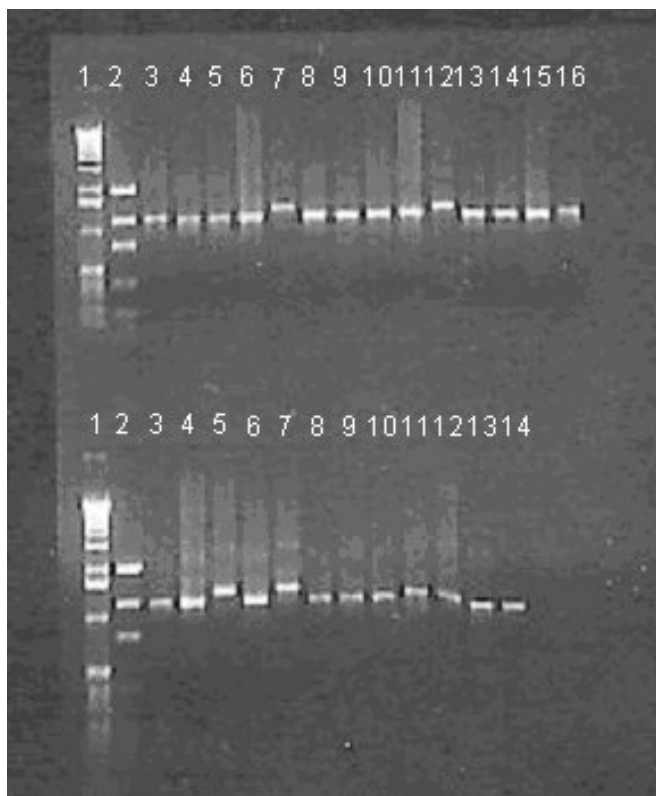


## Virulenzassoziierte Gene

***eae*-Locus.** Im Gegensatz zu den PCR-Analysen der Housekeeping-Gene unterschieden sich die *eae*-Gene bereits bezüglich der Amplifikatgrößen. So waren die Amplifikate, die mit Hilfe der DNA der Stämme IHIT0554, IHIT0597, IHIT2115, IHIT2430, RW1372 und RW1374 generiert wurden, mit 888 bp deutlich größer als die der Stämme IHIT0084, IHIT0578, IHIT2087, IHIT2169, IHIT3641, IHIT5671, IHIT0608, RW1911, RW2297, 303/89, 413/89-1 und 72/90-56 (861 bp). Bei den Stämmen 537/89-1, IHIT1190, IHIT1968, IHIT3000 und IHIT3669 betragen sie 858 bp, und bei IHIT0072, IHIT0304 und IHIT1703 846 bp. Diese deutlichen Größenunterschiede der Amplifikate wurden mittels DNA-Sequenzanalysen verifiziert. Bezüglich der phylogenetischen Auswertung mußten die entsprechenden „Basenlücken“ auf die gleiche Länge angeglichen werden.

**Abb. 3** - Elektropherogramm zur Darstellung der Amplifikate der *eae* PCR



*eae* PCR mit Primerpaar AE19 und *escD*

Spur 1 und Spur 2 M1/M2;  
 IHIT0072; IHIT0084; 303/89;  
 IHIT5671; IHIT0597; 413/89-1;  
 537/89-1; 72/90-56; IHIT0304;  
 IHIT0554; IHIT0578; IHIT0608;  
 IHIT1190; IHIT1703.

Spur 1/Spur 2 M1/M2;  
 IHIT1968; IHIT2087; IHIT2115;  
 IHIT2169; IHIT2430; IHIT3000;  
 IHIT3641; IHIT3669; RW1372;  
 RW1374; RW1911; RW2297.

M1 =  $\lambda$  *Hind* III

M2 = 200 bp Leiter Life Tech

Als Referenzen sind bei den Analysen alle zum Zeitpunkt der Arbeit (Abe et al., 1997; Abe et al., 1998; Adu-Bobie et al., 1998a; Sperandio et al., 1998; McGraw et al., 1999; Oswald et al., 2000; Zhang et al., 2002) zur Verfügung stehenden DNA-Sequenzen der *eae*-Loci mit aufgeführt. Anhand dieser Sequenzen, die zum Teil auch über eine Antikörperentwicklung (Frankel et al., 1994; Adu-Bobie et al., 1998a; Adu-Bobie et al., 1998b) bereits als verschiedene Typen (Tabelle 4 und 5) des *eae*-Gens definiert sind, wurde über die Identitäten der eigenen Stämme eine Abschätzung getroffen. Die Länge des analysierten DNA-Abschnittes betrug 895 bp.

Die Codon-Nutzungsmuster waren bei allen Stämmen identisch. Unterschiede fanden sich jedoch bezüglich der Stop-Codices (siehe Tabelle 4 und 5). Bei den meisten *eae*-Genen beendete ein TAA die kodierende Sequenz, sechs Stämme wichen jedoch mit einem TGA hiervon ab. Dies waren die Stämme IHIT0597, IHIT0554, IHIT2115, IHIT2430, RW1372 und RW1374. Bei diesen Stämmen endete das Intimin (*eae*-Gen Stop-Codon TGA) mit den drei Aminosäuren CVR. Bei den anderen Stämmen traten ebenfalls unterschiedliche Aminosäuresequenzen auf (17 x CVK; 3 x CVE bei den Stämmen IHIT0072, IHIT0304 und IHIT1703).

**Tabelle 5** - Einordnung der analysierten Stämme anhand des Intimin-Typs unter Berücksichtigung der Sequenz des *espB*

Stamm	Serovar	<i>espB</i> -Cluster	<i>eae</i> - bzw. Intimin-Typ
537/89-1 IHIT1190 IHIT1968 IHIT3000 IHIT3669	O92:NM O119:H25 O84:K? O84:H2 O150:NM	Cluster I	ζ-Typ (TAA mit Aminosäuresequenz CVK)
RW1372 RW1374	O103:H2 O103:H2	Cluster II	ε-Typ (TGA mit Aminosäuresequenz CVR) deutliche Homologie zu η-Intimin
IHIT0597 IHIT0554 IHIT2115 IHIT2430	On.t.:NM O157:NM O4:NM O80:NM	Cluster II	ε <sub>2</sub> -Typ (TGA mit Aminosäuresequenz CVR)
IHIT0084 IHIT2169 303/89 RW1911 IHIT0578 413/89-1 RW2297 IHIT3641 IHIT5671 IHIT2087 72/90-56	On.t.:H <sup>+</sup> On.t.:H11 O153:H <sup>+</sup> O118:H16 O15:H11 O26:NM O118:H16 O17,77:H18 O145:H <sup>+</sup> O26:H11 O5:K <sup>-</sup>	Cluster II	β-Typ (TAA mit Aminosäuresequenz CVK)
IHIT0072 IHIT0304	O157:H7 O145:H28	Cluster III	γ-Typ (TAA mit Aminosäuresequenz CVE)
IHIT1703	O111:H2?	Cluster IV	γ-Typ Variante (TAA mit Aminosäuresequenz CVE)
IHIT0608	On.t.:H <sup>+</sup>	Cluster V	θ-Typ (TAA mit Aminosäuresequenz CVK)

**Tabelle 6** – Zusammenfassende Ergebnisse der Analyse der 3'-*eae*-Genabschnitte

Stamm	Serovar	COOH-terminale Aminosäuren	G+C-Gehalt des <i>eae</i> (variable Region) (%)	Länge <sup>13</sup> <i>eae</i> (bp xy bis Stopcodon) (bp)	Clusterzugehörigkeit ( <i>eae</i> - resp. Intimintyp)
IHIT0084	On.t.:H <sup>+</sup>	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
IHIT0578	O15:H11	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
RW1911	O118:H16	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
IHIT2087	O26:H11	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
IHIT2169	On.t.:H11	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
RW2297	O118:H16	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
303/89	O153:H <sup>+</sup>	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
IHIT3641	O17,77:H18	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
413/89-1	O26:NM	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
IHIT5671	O145:H <sup>+</sup>	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
72/90-56	O5:K <sup>-</sup>	CVK	39,5	861	$\beta$ - Intimintyp
IHIT0072	O157:H7	CVE	39,6	846	$\gamma$ - Intimintyp
IHIT0304	O145:H28	CVE	39,4	846	$\gamma$ - Intimintyp
IHIT1703	O111:H2	CVE	39,6	846	$\gamma$ - Intimintyp, Variante (Voss et al., 1998)
RW1372	O103:H2	CVR	38,9	888	$\varepsilon$ -Intimin (Oswald et al., 2000)
RW1374	O103:H2	CVR	38,9	888	$\varepsilon$ -Intimin (Oswald et al., 2000)
IHIT554	On.t.:NM	CVR	37,8	888	$\varepsilon_2$ -Intimin ( $\varepsilon$ -Variante)
IHIT0597	O157:NM	CVR	37,8	888	$\varepsilon_2$ -Intimin
IHIT2115	O4:NM	CVR	37,8	888	$\varepsilon_2$ -Intimin
IHIT2430	O80:NM	CVR	37,8	888	$\varepsilon_2$ -Intimin
537/89-1	O84:NM	CVK	40,5	858	$\zeta$ - Intimin (neuer Typ)(Zhang et al., 2002)
IHIT1190	O92:NM	CVK	40,5	858	$\zeta$ - Intimin
IHIT1968	O119:H25	CVK	40,5	858	$\zeta$ - Intimin
IHIT3000	O150:NM	CVK	40,5	858	$\zeta$ - Intimin
IHIT3669	O84:H2	CVK	40,5	858	$\zeta$ - Intimin
IHIT0608	On.t.:H <sup>+</sup>	CVK	39,3	861	$\theta$ -Intimin (neuer Typ)

<sup>13</sup> Startposition des Primerpaares mit Primer AE19 sense liegt bei Position 1891-1912 im *eae*-Gen; die Startposition des PAS antisense Primers ist variabel, da das *eae*-Gen Längenpolymorphismen zeigt. Für die Bearbeitung mit MEGA wurden alle *eae*-Sequenzlängen einheitlich auf 895 bp „verlängert“

***espB*-Locus (*Escherichia coli* secreted protein - EspB).** Das *eae* konnte bei allen aufgelisteten Stämmen identifiziert und sequenzanalysiert werden. Bei fünf Stämmen stellte sich die Sequenzanalyse des *espB* jedoch als derart schwierig heraus, dass das komplette Gen mittels einer den gesamten Locus überspannenden PCR nachgewiesen und dann vollständig sequenziert werden musste. Es handelte sich um die Stämme 537/89-1, IHIT1190, IHIT1968, IHIT3000 sowie IHIT3669. Die dazu notwendigen Primer und veränderten Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

**Abb. 4** - Elektropherogramm zur Darstellung der Amplifikate der *espB* PCR



*espB* PCR mit  
Primerpaar *espB1* und  
*espB2*

M (1); IHIT0072 (2);  
IHIT0084 (3); 303/89  
(4); IHIT5671 (5);  
IHIT0597 (6); 413/89-  
1 (7); 537/89-1 (8);  
72/90-56 (9);  
IHIT0304 (10);  
IHIT0554 (11);  
IHIT0578 (12);  
IHIT0608 (13);  
IHIT1190 (14);  
IHIT1703 (15).

M (1); IHIT1968 (2);  
IHIT2087 (3);  
IHIT2115 (4);  
IHIT2169 (5);  
IHIT2430 (6);  
IHIT3000 (7);  
IHIT3641 (8);  
IHIT3669 (9);  
RW1372 (10);  
RW1374 (11);  
RW1911 (12);  
RW2297 (13); DH5 $\alpha$   
(14); MG1655 (15).

M = Marker<sup>14</sup>

<sup>14</sup> Low DNA Masse Leiter (LifeTechnologies, Gibco BRL)

**Abb. 5** - Elektropherogramm zur Darstellung der Amplifikate der *espB* PCR



*espB* PCR mit dem Primerpaar –  
generiert long-range PCR

*espB* PCR mit Primerpaar *espB3* und  
*espB4*

Marker (1); 537/89-1 (2); IHIT1190  
(3); IHIT1968 (4); ND (5); ND (6);  
IHIT3000 (7); IHIT3669 (8);  
E2348/69 (9); Marker (10)

Marker<sup>15</sup>

ND: nicht geladen

„Ghost“-Banden stellen unspezifisch  
amplifizierte DNA dar, d.h.,  
Verunreinigungen.

<sup>15</sup> Low DNA Masse Leiter (Life Technologies, Gibco BRL)

**Tabelle 7** - zusammenfassende Ergebnisse der Analyse der mittleren *espB*-Genabschnitte

Stamm	Serovar	G+C-Gehalt <sup>16</sup> (%)	Länge der analysierten <i>espB</i> -Sequenz <sup>17</sup> (bp)	Identitäten des mittleren Drittels der <i>espB</i> -Sequenz
IHIT0084	On.t.:H <sup>+</sup>		600	β-Intimintyp
IHIT0578	O15:H11		600	β-Intimintyp
RW1911	O118:H16		600	β-Intimintyp
IHIT2087	O26:H11		600	β-Intimintyp
IHIT2169	On.t.:H11		600	β-Intimintyp
RW2297	O118:H16		600	β-Intimintyp
303/89	O153:H <sup>+</sup>		600	β-Intimintyp
IHIT3641	O17,77:H18	44,5	564	β-Intimintyp
413/89-1	O26:NM		600 (944)	β-Intimintyp
IHIT5671	O145:H <sup>+</sup>		600	β-Intimintyp
72/90-56	O5:K <sup>-</sup>		600	β-Intimintyp
IHIT0072	O157:H7	48,5	588	γ-Intimintyp
IHIT0304	O145:H28	48,1	588	γ-Intimintyp
IHIT1703	O111:H2		600	γ-Intimintyp Variatio
RW1372	O103:H2		600	ε-Intimintyp.
RW1374	O103:H2		600	ε-Intimintyp
537/89-1	O84:NM	50,3 (46,5)	390 (800)	ζ-Intimintyp
IHIT1190	O92:NM	50,3 (46,5)	390 (800)	ζ-Intimintyp
IHIT1968	O119:H25	50,3 (46,5)	390 (800)	ζ-Intimintyp
IHIT3000	O150:NM	50,3 (46,5)	390 (800)	ζ-Intimintyp
IHIT3669	O84:H2	50,3 (46,5)	390 (800)	ζ-Intimintyp
IHIT0554	On.t.:NM		600	ε <sub>2</sub> -Intimintyp
IHIT0597	O157:NM		600	ε <sub>2</sub> -Intimintyp
IHIT2115	O4:NM		600	ε <sub>2</sub> -Intimintyp
IHIT2430	O80:NM		600	ε <sub>2</sub> -Intimintyp
IHIT0608	On.t.:H <sup>+</sup>	47,6	612	θ-Intimintyp

<sup>16</sup> In Klammern sind die vollständig sequenzierten *espB* und deren G+C-Gehalt beschrieben.<sup>17</sup> In dieser Arbeit ist der *espB*-Locus von fünf Stämmen vollständig sequenziert worden.

Die Größenunterschiede sind auch in diesen Elektropherogrammen deutlich erkennbar. Die vollständigen Amplifikate der Stämme des neuen  $\zeta$ -Intimintypes (s. Tabelle 5) waren beim *espB*-Locus annähernd 200 bp kürzer als bei den anderen Stämmen. Weiterhin fanden sich Abweichungen in der Aminosäuresequenz der bisher bekannten „Muster“ sowie ein deutlicher Längenpolymorphismus bei den Stämmen 537/89-1, IHIT1190, IHIT1968, IHIT3000 und IHIT3669. Die Referenzsequenzen sind deutlich länger (965 bis 938 bp) als die, die in dieser Arbeit gefundenen. Da das Alignment und die Primergenerierung bei den anderen verwendeten Stämmen keine Probleme bereiteten, wurde von einer adäquaten Länge ausgegangen. Die Länge des analysierten DNA-Abschnittes betrug 374 bp.