

# 1 Einleitung

Pathogenitätsinseln (PAIn) sind große chromosomale DNS-Regionen, die verschiedene Virulenzfaktoren kodieren und über einen horizontalen Gentransfer erworben wurden (18, 50). Ein häufiger Insertionsort von Pathogenitätsinseln stellen tRNS-Gene dar (86). Der Locus of Enterocyte Effacement (LEE) stellt eine solche Pathogenitätsinsel dar. Die meisten enteropathogenen *Escherichia (E.) coli* (EPEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) verfügen über eine solche LEE-PAI. Sie konnte aber auch in verwandten Bakterienspezies, wie *Citrobacter (C.) rodentium* und *Escherichia (E.) alvei*, nachgewiesen werden. Der LEE kodiert ein Typ III-Sekretionssystem, ein Adhäsion (Intimin), welches den engen Kontakt des Bakteriums zur Epithelzelle vermittelt, sowie verschiedene über das Sekretionssystem sezernierte Proteine. Der LEE ist verantwortlich für die Ausbildung sog. Attaching-and-Effacing- (AE-) Läsionen des Darmepithels (73).

Der Prototyp des LEE, der innerhalb des tRNS-Locus für Selenocystein (*selC*) inseriert ist, wurde 1995 bei dem humanen EPEC-Stamm E2348/69 (O127:H6) entdeckt und definiert (93). Innerhalb desselben Insertionsortes befindet sich ein weiterer LEE bei dem EHEC-Stamm EDL933 (O157:H7) (112). Benkel et al. (14) beschrieben einen zweiten LEE-Insertionsort für den bovinen EHEC-Stamm 413/89-1 (O26:H-) innerhalb des tRNS-Locus für Phenylalanin (*pheU*). Jores et al. (69) wiesen den dritten LEE-Insertionsort bei dem bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) innerhalb des *pheV*-Locus nach. Des Weiteren wurde im *pheU*-Locus des Stammes RW1374 eine LEE-negative genomische Insel nachgewiesen (25). Der Erwerb einer LEE-PAI stellt ein Schlüsselereignis während der Entwicklung pathogener *E. coli*-Stämme dar. Die Insertion einer LEE-PAI in unterschiedliche tRNS-Gene wirft jedoch noch immer diverse Fragen hinsichtlich der Evolution AE-positiver Bakterien auf:

- Gab es ursprünglich nur einen LEE-positiven Urstamm, von dem ausgehend sich alle anderen LEE-positiven Stämme entwickelt haben?
- Oder wurde der LEE zu unterschiedlichen Zeiten in unterschiedliche Orte einer oder verschiedener Abstammungslinien eingefügt?

Für viele *E. coli*- und verwandte Bakterienstämme gibt es noch keine klaren Erkenntnisse über einen LEE-Insertionsort, obschon die Existenz eines LEE sicher nachgewiesen ist. Whittam et al. (165, 96) teilten verschiedene EPEC- und EHEC-Stämme in 4 Cluster ein, bei

denen bereits zwei LEE-Insertionsorte bestimmt wurden (168, 144). Dennoch gab es Hinweise auf einen unbekanntem Insertionsort bei einigen dieser Stämme.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der LEE-Insertionsort der *E. coli*-Stämme des EPEC2- und EHEC2-Clusters, einiger boviner EHEC- sowie *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämme mittels Polymerase-Kettenreaktion und DNS-DNS-Hybridisierungen bestimmt werden, um aus den Ergebnissen Hinweise auf die Evolution LEE-positiver AE-Bakterien zu ziehen. Weiterhin sollte insbesondere die LEE-PAI des bovinen EHEC-Stammes RW1374 (O102:H3) untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten die flankierenden Regionen der LEE-PAI mittels einer in der Literatur beschriebenen Methode durch die Insertion von Erkennungssequenzen für eine Restriktionsendonuklease markiert werden, um die Pathogenitätsinsel aus dem Genom herauszuschneiden. Die Isolierung der LEE-PAI könnte einer zukünftigen Charakterisierung der auf ihr lokalisierten Virulenzfaktoren und der damit assoziierten Pathogenität dienen. Des Weiteren sollte das Intimin-Gen (*eae*) des LEE von RW1374 markiert und der mutagenisierte Stamm in einem Konjugationsexperiment eingesetzt werden. Die Übertragung des LEE in apathogene *E. coli*-Laborstämme sollte die Hypothese eines horizontalen Gentransfers via konjugativer Transposition bekräftigen, um die Entwicklung von AE-Pathogenen weiter aufzuklären. Die Mutation des *eae*-Gens und die Markierung der LEE-PAI dieses bovinen EHEC-Stammes sollten zudem funktionellen Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit im Rahmen eines Zellkulturtests die typischen AE-Läsionen auszulösen, dienen. Somit leistet dieser Test einen Beitrag zur Aufklärung von Fragen bezüglich AE-Läsionen auslösender Faktoren.