

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Schrifttum	11
2.1	Darmpathogene <i>Escherichia coli</i>	11
2.2	Pathogenitätsinseln	13
2.2.1	Insertionsorte von Pathogenitätsinseln	15
2.2.2	Mobilitätselemente und Transfer von Pathogenitätsinseln	19
2.2.3	Deletion von Pathogenitätsinseln	21
2.2.4	Rearrangement, Homing und kompakte Pathogenitätsinseln	22
2.2.5	Locus of Enterocyte Effacement (LEE)	23
3	Material und Methoden	32
3.1	Material	32
3.1.1	Verwendete Bakterienstämme	32
3.1.2	Plasmidvektoren und <i>Escherichia coli</i> -Laborstämme	34
3.1.3	Eukaryotische Zellkulturen	35
3.1.4	Geräte	35
3.1.5	Chemikalien, Nährmedien und Lösungen	37
3.1.5.1	Chemikalien	37
3.1.5.2	Nährmedien	38
3.1.5.3	Lösungen	39
3.1.5.3.1	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese (DNS)	39
3.1.5.3.2	Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.1.5.3.3	Lösungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	40
3.1.5.3.4	Lösungen für das Kapillar-Blot-Verfahren (Southern-Blot)	41
3.1.5.3.5	Lösungen für die DNS-DNS-Hybridisierung	42
3.1.5.3.6	Lösungen für den Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test)	43
3.1.5.3.7	Lösungen für die Ligation	44
3.1.5.3.8	Lösungen für die Restriktion von DNS	44
3.1.6	Oligonukleotid-Primer und Sonden	45
3.1.6.1	Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation	45
3.1.6.2	Oligonukleotid-Sonden für die DNS-DNS-Hybridisierung	48
3.2	Methoden	49
3.2.1	Lagerung und Kultivierung	49

3.2.2	DNS-Isolierung	50
3.2.2.1	Gewinnung genomischer DNS.....	50
3.2.2.2	Gewinnung von Plasmid-DNS.....	50
3.2.2.3	Gewinnung von DNS-Fragmenten und PCR-Produkten	50
3.2.2.4	Konzentrierung von Nukleinsäuren	51
3.2.3	DNS-DNS-Hybridisierung.....	51
3.2.3.1	Sondenherstellung mittels Polymerase-Kettenreaktion	51
3.2.3.2	Dot Blot.....	52
3.2.3.3	Southern Blot.....	52
3.2.3.4	Hybridisierungsvorgang und Visualisierung.....	52
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion	53
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	55
3.2.6	Counter-clamped homogeneous electric field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)	56
3.2.7	Restriktionsendokukleasen-Analyse	57
3.2.8	Klonierung.....	57
3.2.8.1	Dephosphorylierung.....	57
3.2.8.2	Ligation	58
3.2.8.3	Transformation	58
3.2.8.3.1	Calciumchlorid-Transformation.....	58
3.2.8.3.2	Elektroporation.....	59
3.2.9	Markierung von DNS-Segmenten	60
3.2.10	Konjugation.....	61
3.2.11	Funktionelle Testsysteme zur Bestimmung der Adhäsivität.....	62
3.2.11.1	Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test).....	62
4	Ergebnisse	64
4.1	Untersuchungen zur Lokalisation der LEE-Pathogenitätsinsel im Chromosom AE- positiver Bakterien.....	64
4.1.1	Bestimmung des Insertionsortes der LEE-Pathogenitätsinsel bei <i>Escherichia coli</i> -Stämmen mittels Polymerase-Kettenreaktion	64
4.1.1.1	Bestimmung des LEE-Insertionsortes humaner <i>Escherichia coli</i> -Stämme	65
4.1.1.2	Bestimmung des LEE-Insertionsortes boviner <i>Escherichia coli</i> -Stämme ...	66
4.1.2	Makrorestriktions-Analyse der <i>Escherichia coli</i> -Stämme	68

4.1.3	Bestimmung des Insertionsortes der LEE-Pathogenitätsinsel auf Makrorestriktions-Fragmenten mittels DNS-DNS-Hybridisierung	69
4.1.3.1	Bestimmung des LEE-Insertionsortes humaner <i>Escherichia coli</i> -Stämme .	70
4.1.3.2	Bestimmung des LEE-Insertionsortes boviner <i>Escherichia coli</i> -Stämme ...	71
4.1.4	Bestimmung des Insertionsortes der LEE-Pathogenitätsinsel bei <i>Citrobacter rodentium</i> - und <i>Escherichia alvei</i> -Stämmen.....	73
4.1.4.1	Nachweis des <i>Escherichia coli</i> „attaching and effacing“-Gens (<i>eae</i>) bei <i>Citrobacter rodentium</i> - und <i>Escherichia alvei</i> -Stämmen	74
4.1.4.2	Bestimmung des LEE-Insertionsortes mittels Polymerase-Kettenreaktion .	75
4.1.4.3	Makrorestriktions-Analyse der <i>Citrobacter rodentium</i> - und <i>Escherichia alvei</i> -Stämme.....	75
4.1.4.4	Bestimmung des LEE-Insertionsortes mittels DNS-DNS-Hybridisierung ..	75
4.2	Markierung und Mutagenisierung der LEE-PAI.....	78
4.2.1	Mutagenisierung des Intimin-Gens und Mobilisierung des LEE bei dem bovinen EHEC-Stamm RW1374.....	78
4.2.2	Einfügung von Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen in <i>pheV</i> flankierende Genbereiche des bovinen EHEC-Stammes RW1374.....	80
4.2.3	Einfügung von Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen in <i>pheV</i> flankierende Genbereiche des humanen EHEC-Stammes 3030A-86	89
4.3	Untersuchungen zu phänotypischen Eigenschaften der Wildtyp-Stämme und ihrer Mutanten.....	91
4.4	Klonierung der LEE-Pathogenitätsinsel AE-positiver Bakterien.....	95
4.4.1	Klonierung der LEE-PAI _{RW1374} in <i>Escherichia coli</i> K12-Stämme	95
4.4.2	Klonierung der LEE-PAI _{DBS100} in <i>Escherichia coli</i> K12-Stämme.....	96
5	Diskussion.....	97
5.1	Bestimmung des LEE-Insertionsortes AE-positiver Bakterien.....	97
5.2	Markierung des Intimin-Gens und Übertragung des LEE	106
5.3	Markierung und Klonierung der LEE-PAI.....	107
6	Zusammenfassung.....	114
7	Summary	117
8	Literaturverzeichnis	119