

## 2 Schrifttum

### 2.1 Darmpathogene *Escherichia coli*

*Escherichia (E.) coli* sind im Intestinaltrakt von Mensch und warmblütigen Tieren vorkommende Gram-negative fakultative Anaerobier. Neben apathogenen Eigenschaften und dem Vorkommen als Kommensale oder Saprobiont des Darmtrakts weisen einige Stämme dieser Spezies besondere Pathogenitätsmechanismen auf. Diese hoch adaptierten Stämme sind nun in der Lage, z.T. letal verlaufende Erkrankungen beim Menschen auszulösen (126, 48). Infektionen, die durch pathogene *E. coli* verursacht werden, beschränken sich entweder auf Schleimhautoberflächen oder führen zu einer Erregerstreuung durch den Organismus. Im Wesentlichen rufen sie drei klinische Erkrankungen hervor: (i) Erkrankungen des Harntrakts, (ii) Sepsis/Meningitis und (iii) Darmerkrankungen/Durchfall.

Wie bei anderen Schleimhautpathogenen besteht auch die Infektionsstrategie von *E. coli* zunächst in einer Kolonisation der Schleimhaut, dem Unterlaufen der Wirtsabwehr und der Vermehrung, resultierend in der Wirtsschädigung. Das gemeinsame Merkmal darmpathogener *E. coli* (DEC) beruht auf der Fähigkeit, die Darmschleimhaut trotz Peristaltik und Konkurrenz mit der autochthonen Darmflora zu besiedeln. Diese Eigenschaft ist auf spezifische Oberflächen-Adhäsionsfaktoren (Fimbrien) zurückzuführen, welche es darmpathogenen *E. coli* erlaubt, die normalerweise unbesiedelte Dünndarm-Mukosa zu kolonisieren (87, 161). Hat eine Kolonisierung stattgefunden, sind die darauf folgenden Infektionsschritte sehr vielfältig: Produktion von Enterotoxinen durch enterotoxische *E. coli* (ETEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Invasion durch enteroinvasive *E. coli* (EIEC) in Enterozyten und/oder das enge Anhaften an Darmepithelzellen durch enteropathogene *E. coli* (EPEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) (105). Die dafür verantwortlichen Virulenzfaktoren werden auf z.T. mobilen DNS-Elementen wie Pathogenitätsinseln, Virulenzplasmiden, Transposons oder Bakteriophagen kodiert (109, 50). Deren Verbreitung durch horizontalen Gentransfer via Transformation, Konjugation oder Transduktion ist die Ursache für die große Vielfalt der Virulenzfaktoren darmpathogener *E. coli*. In Tab. 1 sind die Pathovaren durchfallerregernder DEC mit ihren Virulenzfaktoren und Daten zu ihrer Epidemiologie aufgelistet.

Tab. 1 Pathovare darmpathogener *Escherichia coli* (105)

Pathovar	Krankheitsbild	Inzidenz, Prävalenz	Hauptvirulenzfaktoren
➤ <b>Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)</b>	Wässriger Durchfall (Cholera-ähnlich), Reisediarrhoe Jungtierdurchfall	Kinder und Touristen in Entwicklungsländern Nahrungsmittel-Infektion Pathogen für Jungtiere	Enterotoxine (LT, ST) Wirtsspezifische fimbrielle Adhäsine
➤ <b>Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)</b>	Wässriger Durchfall, Erbrechen Jungtierdurchfall	Kinder in Entwicklungsländern, sporadisch in westlichen Ländern Reservoir: symptomatische und asymptomatische Kinder und Erwachsene Pathogen für Jungtiere	Bundle forming pilus (BFP) Locus of Enterocyte Effacement (LEE)
➤ <b>Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)</b>	Hämorrhagische Colitis (HC) Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUC) Tier: blutiger Durchfall, Ödemkrankheit	Nahrungsmittel-Infektion der westlichen Länder Reservoir: symptomatische Jungtiere und asymptomatische Adulte	Locus of Enterocyte Effacement (LEE) Adhäsine Zytotoxine (Shiga-Toxin, EAST-1) pO157-Plasmid
➤ <b>Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)</b>	Chronisch persistierender Durchfall	Kinderdurchfall	Zytotoxine (EAST-1) Fimbrielle Adhäsine (AAF/I, AAF/II)
➤ <b>Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)</b>	Wässriger Durchfall (Ruhr-ähnliche Dysenterie)	Nahrungsmittel-Infektion	Enterotoxine ( <i>Shigella</i> enterotoxin 2, <i>sen</i> ) OMP 140-Mda Plasmid (pInv)
➤ <b>Diffus adhärente <i>E. coli</i> (DAEC)</b>	Assoziiert mit Durchfall	möglicher Durchfallerreger der westlichen Länder	Fimbrie (F1845) 100kDa OMP (AIDA-I)
➤ <b>Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)</b>	Durchfall Extraintestinale Infektionen	Pathogen für Mensch und Tier	Zytonekrosefaktor (CNF1, CNF2) CDT (cytotoxic distending toxin)

## 2.2 Pathogenitätsinseln

In den frühen 80'er Jahren entdeckte man, dass sich uropathogene *E. coli* (UPEC) durch die Präsenz chromosomal lokalisierter, virulenzassoziierter Gene von anderen *E. coli*-Stämmen unterschieden (53, 89). Diese Beobachtung wurde ebenfalls für darmpathogene *E. coli* und andere pathogene Bakterien gemacht (93). Schließlich wurden solche DNS-Regionen als Pathogenitätsinseln (PAIn) bezeichnet (49, 18). Pathogenitätsinseln sind vornehmlich chromosomal lokalisiert, können jedoch auch Bestandteil bakterieller Plasmide und Bakteriophagen sein.

Pathogenitätsinseln werden durch mehrere Merkmale klar definiert (52):

- (i) Sie tragen Gene, die mindestens einen, aber i.d.R. mehrere Virulenzfaktoren kodieren.
- (ii) Sie kommen im Genom pathogener Bakterien vor, jedoch nicht bei apathogenen Vertretern derselben oder von verwandten Spezies.
- (iii) Sie weisen eine Größe von 10 bis 200 kb, vereinzelt auch mehr auf. Wenn sie kleiner als 10 kb sind, werden sie als „Islets“ bezeichnet.
- (iv) Der G+C-Gehalt und die Codon-Nutzung der PAIn unterscheiden sich vom restlichen Genom („core region“) - es sei denn, Donor und Rezipient weisen ähnliche G+C-Gehalte auf.
- (v) Sie sind oftmals von 9 bis 135 bp großen Direct Repeat- (DR-) Sequenzen flankiert, die via Rekombination nach Erwerb PAI-spezifischer DNS-Regionen ins Genom integriert sind. Diese DR-Sequenzen stellen Erkennungssequenzen für Phagen-Integrasen dar.
- (vi) Sie sind häufig in transfer-RNS- (tRNS-) Gene integriert, die einen Hotspot für die Integration fremder DNS darstellen (62, 125).
- (vii) Sie enthalten oft kryptische oder noch funktionelle Gene, die für Mobilitätsfaktoren, wie IS-Elemente, Integrasen und Transposasen, kodieren. PAIn können auch von Insertionssequenzen (IS) oder Teilen von ihnen begrenzt sein. PAIn stellen selten homogene DNS-Regionen dar. Vielmehr verkörpern sie mosaikähnliche Strukturen als Kennzeichen eines „Multistep-Prozesses“.
- (viii) Sie stellen oft instabile DNS-Regionen dar, wobei Deletionen über Direct Repeats, Insertionssequenzen oder ähnliche homologe Sequenzen erfolgen. Einige PAIn, wie die High Pathogenicity Island (HPI) von *Yersinia (Y.) pseudotuberculosis*, sind fähig,

sich zwischen verschiedenen tRNS-Loci zu bewegen (21). Andere PAIn können mobilisiert und mittels Bakteriophagen übertragen werden (75, 88). Einzelne PAIn stellen integrierte Plasmide, konjugative Transposons, komplette oder Teile von Bakteriophagen dar.

Zunächst wurden PAIn bei Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae* beschrieben. Sie kommen jedoch auch bei anderen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien vor. Pathogenitätsinseln sind unter den pathogenen Bakterien von Mensch und Tier, sogar im Pflanzenreich weit verbreitet. Dabei beschränkt sich das Vorhandensein einer PAI nicht auf bestimmte Gruppen pathogener Bakterien. Vielmehr sind PAIn unter allen pathogenen Gruppen vertreten, was darauf hinweist, dass sie horizontal übertragen werden (52).

Über die Aufnahmemechanismen von PAIn von Vertretern der *Enterobacteriaceae* wird jedoch noch spekuliert. Mögliche Vektoren der Übertragung von PAIn zwischen Bakterien stellen Mobilitäts-elemente wie konjugative Transposons, Plasmide oder Bakteriophagen dar. Konjugative Transposons werden via Konjugation übertragen, integrieren aber nach demselben Mechanismus ins Genom wie Phagen durch eine ortsspezifische („site specific“) Rekombination oder durch Transposition (20).

Der horizontale Gentransfer von mobilen, virulenzassoziierten Genclustern, wie dies Phagen, Plasmide und PAIn darstellen, hat eine große Auswirkung auf die Evolution von Bakterien (51). Bei den horizontal übertragenen DNS-Elementen muss es sich jedoch nicht immer um Gene handeln, die dem Wirt pathogene Eigenschaften verleihen. Man hat für *E. coli* K12 berechnet, dass das Genom dieses apathogenen Stammes etwa 18 % DNS-Sequenzen enthält, die über einen horizontalen Gentransfer ins Genom integriert sind (84). Diese Regionen, die als „genomische Inseln“ bezeichnet werden, vermitteln dem Rezipient zusätzliche Funktionen, wie die Ausbildung einer Antibiotikum-Resistenz oder Fähigkeiten, die mit mikrobieller Fitness oder Pathogenese verbunden sind.

Es ist bereits lange bekannt, dass diese mobilen genetischen Elemente via Gentransfer übertragen werden, wie z.B. das auf Bakteriophagen kodierte Shiga-Toxin der STEC oder das auf einem Transposon kodierte Hitze-stabile Enterotoxin der ETEC (105). Andere wichtige Virulenzfaktoren sind auf Plasmiden kodiert (73). Auch Pathogenitätsinseln stellen eine Untergruppe genomischer Inseln dar. Sie kommen ebenso bei apathogenen Bakterien vor und werden manchmal als „Fitness-Inseln“ bezeichnet, da sie durch die neuen Eigenschaften das Wachstum der Bakterien unter bestimmten Bedingungen ermöglichen oder fördern. Dazu zählt z.B. die HPI, die bei *Yersinia* spp. als Virulenzeigenschaft betrachtet wird, während sie

bei apathogenen *E. coli* lediglich als Anpassung an eisenarme Bedingungen gewertet wird (77). Weitere als „Fitness-Inseln“ bezeichnete PAIn sind z.B. die sog. Symbiose-Insel von *Mesorhizobium (M.) loti*, die der Stickstoff-Fixierung dient (153), oder die *scr*-Insel (für: sucrose) von *Salmonella* und apathogenen *E. coli*, die ein Saccharose-Aufnahme- und Metabolisierungssystem kodiert (61). In *Pseudomonas (P.) putatida* sind die Gene zum Abbau von Catechol auf einer 105 kb großen Insel kodiert (122).

### 2.2.1 Insertionssorte von Pathogenitätsinseln

Pathogenitätsinseln sind häufig in der Nähe von tRNS-Genen integriert. Diese stellen generell einen Hotspot für die Integration von Fremd-DNS wie Plasmide oder Phagen dar (62, 125). Auch extrachromosomale genetische Elemente können tRNS-Gene oder Teile von ihnen tragen, wie z.B. der T4-Phage von Enterobakterien. Die Integration solcher extrachromosomalen DNS-Elemente in chromosomale tRNS-Gene verläuft über Mechanismen der homologen Rekombination, wobei das tRNS-Gen intakt bleibt. Es scheint, dass das tRNS-3'-Ende den Zielpunkt der Integration darstellt. Ein Hinweis darauf ist die Existenz überlappender Nukleotide zwischen dem tRNS-3'-Ende und PAI-spezifischer Sequenzen (62).

Der besondere Aufbau einer Pathogenitätsinsel bietet jedoch auch die Möglichkeit der Integration über den Mechanismus der ortsspezifischen Rekombination. Mindestens eine PAI-Grenzregion stellt ein Direct Repeat des 3'-Endes eines tRNS-Gens dar. DR-Sequenzen entstehen vermutlich erst, nachdem Prä-PAI-Elemente (wie Bakteriophagen oder Plasmide) ins Wirtsgenom integriert sind. Das 3'-Ende von tRNS-Genen dient dabei sehr oft als Anlagerungsstelle („attachment site“, att) für die Integration von Bakteriophagen. Diese enge Verbindung zwischen tRNS-Locus und PAI lässt vermuten, dass sich PAIn aus Bakteriophagen entwickelt haben könnten (125). Einige PAIn, wie die HPI von *Y. pseudotuberculosis* (21), die *Shigella* Island 2 (SHI-2) von *Shigella (S.) flexneri* und die *she*-PAI (für: *Shigella flexneri* 2a mucinase gene) von *S. flexneri* 2a besitzen zudem funktionelle Phagen-Integrase-Gene, was auf einen phagenähnlichen Integrations- bzw. Transduktionsmechanismus schließen lässt (103, 7). Die *Vibrio* Pathogenicity Island (VPI) von *Vibrio (V.) cholerae* beinhaltet das Genom eines filamentösen Bakteriophagen und kann aufgrund dessen via Transduktion auf andere *V. cholerae*-Stämme übertragen werden (75). Auch die SaPI1 (für: *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island 1) von *Staphylococcus (S.) aureus* enthält Sequenzen und ein homologes Integrase-Gen eines bei

Gram-positiven Bakterien vorkommenden Phagen, was auf eine PAI-Übertragung via Transduktion schließen lässt (128). Analog dieser bisherigen Ergebnisse könnten auch viele PAIn der *Enterobacteriaceae* Reste von Bakteriophagen darstellen, die ins Genom integrierten und via Transduktion übertragen wurden (20).

Andere PAIn wiederum besitzen IS-Elemente, die eine transpositionsähnliche PAI-Übertragung ermöglichen (103, 119, 162). IS-Elemente scheinen dabei die Integration von Fremd-DNS zu unterstützen. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass IS-Elemente häufig Verbindungselemente zwischen nativer und übertragener DNS darstellen (84).

Die Beobachtung, dass PAIn auch Reste von Plasmid- oder Replikations-Genen enthalten, erlaubt die Schlussfolgerung, dass PAIn das Resultat der Integration von Virulenzplasmiden sind, wie z.B. die LEE-PAI von *Citrobacter (C.) rodentium*, die an einer Seite von Plasmidsequenzen flankiert ist (32).

Die Tatsache, dass konjugative Transposons ins Genom eines Rezipienten integrieren, bewies die Entdeckung des innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *pheV* integrierten Transposons CT<sub>ncr94</sub> in *E. coli* K12, der als „Fitness-Insel“ zu verstehen ist. Die Integration erfolgte vermutlich als ein RecA-unabhängiger, ortsspezifischer Rekombinationsprozess (61). RecA ist ein normalerweise den Mechanismus der homologen Rekombination katalysierendes Protein.

Die chromosomale Integration von PAIn in tRNS-Gene, die Existenz von Direct Repeats des tRNS-3'-Endes sowie phagenähnliche Integrase-Gene deuten aber v.a. darauf hin, dass die Mehrzahl der PAIn durch ortsspezifische Rekombination nach demselben Mechanismus wie Bakteriophagen in das Genom integrieren. Bei den meisten PAIn sind die Integrase-Gene sowie deren Erkennungssequenzen jedoch mutiert, so dass der Integrationsmechanismus i.d.R. nicht bewiesen werden konnte (52). Lediglich bei der HPI von *Yersinia* ssp. wurde eine RecA-unabhängige Integration via „site specific“ Rekombination erfolgreich nachgewiesen (118).

Obwohl tRNS-Loci einen Hotspot für die Integration von PAIn und extrachromosomalen DNS-Elementen darstellen, scheint es Präferenzen für bestimmte tRNS-Gene zu geben. Vornehmlich werden tRNS-Loci für eine PAI-Integration ausgewählt (52),

- (i) die „attachment sites“ für Bakteriophagen besitzen,
- (ii) wenn es sich um tRNS-Gene handelt, die tRNS mit unterschiedlichen Kapazitäten kodieren (z.B. *leuX*),
- (iii) wenn sie einen homologen tRNS-Locus im Genom besitzen (z.B. *pheU/pheV*) oder

(iv) wenn es sich um nicht-essentielle tRNS-Gene handelt (z.B. *selC*).

Häufige PAI-Insertionsorte stellen die tRNS-Gene für Selenocystein (*selC*) und die identischen Phenylalanin-spezifischen tRNS-Gene *pheU* und *pheV* dar. In Tab. 2 ist eine Auswahl an Pathogenitätsinseln einschließlich ihrer Insertionsorte und Virulenzfaktoren aufgelistet.

**Tab. 2** Auflistung einer Auswahl an Pathogenitätsinseln

Spezies	Name der PAI	Größe (kb)	Funktion	Assoziierter Integrationsort	Referenz
<i>E. coli</i> UPEC	PAI I <sub>536</sub>	70	Hämolysin	<i>selC</i>	(18)
	PAI II <sub>536</sub>	190	Hämolysin, P-Fimbrie	<i>leuX</i>	(18)
	PAI III <sub>536</sub>	25	S-Fimbrie	<i>thrW</i>	(102)
	PAI IV <sub>536</sub>	45	Yersiniabaktin-Synthese und -Aufnahme	<i>asnT</i>	(138)
	PAI IV <sub>J96</sub>	170	$\alpha$ -Hämolysin, P-Fimbrie	<i>pheV</i>	(17, 154)
	PAI V <sub>J96</sub>	110	$\alpha$ -Hämolysin, <i>prs</i> -Fimbrie, CNF1	<i>pheU</i>	(18, 154)
	PAI I <sub>CFT073</sub>	58	Hämolysin, P-Fimbrie	<i>metV</i>	(73)
<i>E. coli</i> EPEC	LEE-PAI <sub>E2348/69</sub>	35	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>selC</i>	(40)
	LEE-PAI	35	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>pheU</i> u.a.	(144, 168)
<i>E. coli</i> EHEC	LEE-PAI <sub>EDL933</sub>	43	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>selC</i>	(112)
	LEE-PAI	43	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>pheU</i> u.a.	(144, 168)
	LEE-PAI <sub>RW1374</sub>	110	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>pheV</i>	(70)
	PAI	33	Serin-Protease, Adhärenz-assoziiertes Locus	<i>selC</i>	(135)
	PAI OI122	22	Toxine, PagC-ähnlicher Virulenzfaktor	<i>pheV</i>	(57, 113)
<i>E. coli</i> REPEC	LEE-PAI <sub>RDEC-1</sub>	34	Typ III Sekretion, Adhäsion	unbekannt	(174)
	LEE-PAI <sub>83/39</sub>	59,5	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>pheU</i>	(157)
	LEE-PAI <sub>84/110-1</sub>	85	Typ III Sekretion, Adhäsion	<i>pheV</i>	(157)
<i>E. coli</i> ETEC	Tia-PAI	46	Invasion	<i>selC</i>	(73)
<i>E. coli</i> K1	<i>kps</i> -PAI	20	Kapsel-Synthese	<i>pheV</i>	(28)

Tab. 2 (Fortsetzung)

Spezies	Name der PAI	Größe (kb)	Funktion	Assoziierter Integrationsort	Referenz
pathogene <i>E. coli</i>	Yps-HPI	42	Yersiniabaktin-Synthese, -Transport	<i>asnT</i>	(138, 21, 55, 137)
	PAI I <sub>AL862</sub>	61	Adhäsın	<i>pheU</i>	(83)
	PAI II <sub>AL862</sub>	61	Adhäsın	<i>pheV</i>	(83)
apathogene <i>E. coli</i>	<i>scr</i> -Insel	100	Saccharose-Aufnahme- und Metabolisierungssystem	<i>pheU</i> , - <i>V</i>	(61)
<i>Yersinia (Y.) enterocolitica</i>	Yen-HPI	43	Yersiniabaktin-Synthese, -Transport	<i>asnT</i>	(24, 119, 120)
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Yps-HPI	36	Yersiniabaktin-Synthese, -Transport	<i>asnT</i> , <i>U</i> , <i>W</i>	(21, 55, 120, 137)
<i>Y. pestis</i>	Yps-HPI ( <i>pgm</i> Locus)	102	Yersiniabaktin-Synthese, -Transport, Häminaufnahme	<i>asnT</i>	(21, 55, 120, 137)
<i>Yersinia</i> spp.	Yop-Virulon	47	Typ III Sekretion	Plasmid	(29, 30)
<i>Shigella (S.) flexneri</i>	SHI-1	51	Enterotoxin, Protease	unbekannt	(116)
<i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i>	SHI-2	23-30	Aerobaktin-Synthese, und -Transport	<i>selC</i>	(103, 162)
<i>S. flexneri 2a</i>	<i>she</i> -PAI	46,6	Enterotoxin, verschiedene Proteine	<i>pheV</i> , - <i>U</i>	(7)
<i>S. boydii</i>	SHI-3	21	Aerobaktin-Synthese, und -Transport	<i>pheU</i>	(115)
<i>Salmonella (S.) typhimurium</i>	SPI-1	40	Typ III Sekretion, Invasion in Epithelzellen, Apoptose	unbekannt	(46)
	SPI-2	40	Typ III Sekretion, Invasion in Monozyten	<i>valV</i>	(58, 59, 140)
	SPI-3	17	Invasion, Überleben in Monozyten	<i>selC</i>	(15)
	SPI-4	25	Invasion, Überleben in Monozyten	vermutlich tRNS-Gen	(170)
<i>Salmonella (S.) enterica</i> Serovar Typhimurium	SPI-5	7	Enteropathogenese	<i>serT</i>	(171)
<i>Vibrio (V.) cholerae</i>	VPI	39,5	TCP-Adhäsın, Regulator	<i>ssrA</i>	(74)
	VPI-2	57,3	Neuraminidase	<i>ser tRNS-Gen</i>	(67)
<i>Helicobacter (H.) pylori</i>	Cag-PAI	40	Typ IV Sekretion, <i>cag</i> -Antigen	<i>glr</i>	(26)
<i>Dichelobacter (D.) nodosus</i>	<i>vap</i> -Region	12	Vap-Antigene	<i>serV</i>	(27)
<i>Citrobacter (C.) rodentium</i>	LEE	42	Typ III Sekretion, Adhäsın	unbekannt	(32)
<i>Staphylococcus (S.) aureus</i>	SaPI-1	15,2	TSST-1, Superantigen	<i>tyrB</i>	(88, 128)
<i>Mesorhizobium (M.) loti</i>	Symbiose-Insel	500	Stickstoff-Fixation	<i>pheU</i>	(153)



## 2.2.2 Mobilitätselemente und Transfer von Pathogenitätsinseln

Pathogenitätsinseln besitzen eine Vielzahl sog. Mobilitätsgene, v.a. jene, die für Integrasen von Phagen und Insertionssequenzen (IS)/Transposons kodieren. Diese Gene können wiederum für intakte und somit funktionelle Integrasen oder aber aufgrund von Genmutationen für nicht-funktionelle Integrasen kodieren. Diese Proteine katalysieren die Integration und Exzision einer PAI. Oftmals sind Integrase-Gene an der Grenze der PAI lokalisiert (162, 103, 55, 10, 112, 153). Mobilitätsgene und die von ihnen kodierten Proteine sind für die Bildung, Integration, Deletion und Mobilität von PAIn verantwortlich.

Die PAIn pathogener *E. coli*- und *Salmonella (S.) typhimurium*-Stämme besitzen einige mobile genetische Elemente und sind aufgrund dessen zu Deletionen fähig. Jedoch wurde bisher weder Mobilität beobachtet, noch konnten Mobilitätsmechanismen nachgewiesen werden (93, 99, 140, 157). Ein sehr gutes Beispiel für die Mobilität von PAIn stellt die HPI von *Yersinia* ssp. dar, die für das Eisenaufnahmesystem Yersiniabaktin kodiert und in *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, aviären pathogenen *E. coli* (APEC), EAEC sowie EHEC der Serovar O26:H11/H- nachgewiesen wurde (11, 64, 138, 136). Sequenzen einer P4-Integrase kommen in der HPI von *Yersinia (Y.) pestis* und *Y. pseudotuberculosis* vor (21, 118) und wurden auch in enteroaggregativen *E. coli* (138), einigen STEC-Serotypen (77) und in der UPEC-PAI IV<sub>536</sub> nachgewiesen (138). Bei den meisten Stämmen scheint es sich um eine funktionelle Integrase zu handeln. Die P4-Integrase in der UPEC-PAI II<sub>536</sub> und in *E. coli* K12 scheint jedoch aufgrund des Vorhandenseins von Stopcodons nicht funktionell zu sein (73). Die HPI pathogener *Yersinia* spp. trägt hingegen intakte Integrase-Gene und wird von 17 bp großen DR-Sequenzen flankiert, die eine Mobilität bedingen. Die HPIs sind ursprünglich innerhalb des tRNS-Gens *asnT* (für: Asparagin) integriert. Es konnte jedoch in einigen *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen nachgewiesen werden, dass auch in den tRNS-Genen *asnW* und *asnV* eine HPI inseriert ist, was auf einen Transfer der HPI schließen lässt (21).

Die VPI von *V. cholerae* kodiert für verschiedene Proteine, deren DNS-Sequenzen Ähnlichkeiten zu Proteinen von Bakteriophagen aufweisen. Die in der VPI vorkommende Integrase zeigt dabei Homologien zu dem kryptischen Bakteriophagen CP4-57 von *E. coli* und kodiert ein Protein, das an der ortsspezifischen Rekombination beteiligt ist (82). Es wurde inzwischen bestätigt, dass es sich bei der VPI um einen Bakteriophagen handelt und dass die VPI-Übertragung von Bakteriophagenfunktionen abhängt. Die VPI ist weiterhin von 20 bp großen DR-Sequenzen flankiert, die Phagen-att-sites darstellen. Experimentell konnte via Transduktion die VPI auf einen VPI-negativen Stamm übertragen werden (75).

Für eine weitere PAI konnte ebenfalls Mobilität nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um die das Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST) kodierende SaPII von *S. aureus*. Sie gehört zu der Gruppe mobiler PAIn, die vermutlich aus Bakteriophagen entstanden sind. Die Mobilität dieser PAI ist dabei von Integrase-ähnlichen Genen abhängig, die die PAI-Integration bedingen (128). Die SaPII ist Teil eines 15 kb großen defekten Bakteriophagen, der durch Helferphagen (wie  $\phi 13$  und  $\phi 80\alpha$ ) ausgeschnitten und zirkularisiert werden kann. Nachdem die Insel herausgeschnitten wird, kann sie in andere Staphylokokken-Stämme transduziert werden, was für einen Phagen-abhängigen Übertragungsmechanismus spricht (88).

Weiterhin kommen in PAIn Integrasen mit Homologien zur  $\phi 73$ -Integrase in der UPEC-PAI II<sub>536</sub>, der SHI-2 PAI von *Shigella* spp. (162) und in der *vap*-Region (für: virulence-associated protein) von *Dichelobacter (D.) nodosus* vor (73), die für eine PAI-Übertragung via Phagentransfer sprechen. Phagentransfer kann auch mit der Übertragung der 5,8 kb-Region von *S. flexneri*, die von 45 bp großen att-Sequenzen und IS-Elementen flankiert ist, in Verbindung gebracht werden. Ein Bereich dieser Region enthält ein Gen, das für eine Bakteriophagen-homologe Integrase kodiert und im *thrW*-tRNS-Gen (für: Threonin) inseriert ist (2). Ein anderes Beispiel ist das SopE-Protein (für: *Salmonella* outer protein) von *Salmonella*, das über ein auf der SPII PAI (für: *Salmonella* Pathogenicity Island) kodiertes Typ III-Sekretionssystem sezerniert wird. Das SopE-Protein jedoch wird auf einem temperenten Bakteriophagen der P2-Familie kodiert (100).

Diese substantiellen Homologien zwischen Integrasen verschiedener Bakteriengenera sprechen sehr dafür, dass es sich um übertragene DNS-Sequenzen handelt. Integrasen und Proteine von Bakteriophagen scheinen deshalb eine große Rolle in der Mobilisierung von PAIn zu spielen (52). Es gibt jedoch auch Phagen, die erst nach der Integration einer PAI ins Chromosom inseriert sind. Ein solcher Phage ist der Prophage 933L des LEE des EHEC-Stammes EDL933 (O157:H7). Dieser Prophage kommt jedoch nicht im LEE des EPEC-Stammes E2348/69 vor (112). Dennoch scheinen diese Phagen aufgrund der Existenz eines dem Prophagen 933L ähnlichen Integrase-Gens in der *Shigella* SHI-2 PAI eine Bedeutung in der Mobilisation von PAIn zu haben (162).

Neben Integrasen spielen auch innerhalb von PAIn lokalisierte IS-Elemente und Transposonsequenzen eine Rolle in der Mobilisierung von PAIn. Sie können mitverantwortlich für die ursprüngliche Mobilisierung oder nachfolgende Neugestaltung einer PAI sein. IS-Elemente können auch nachträglich in eine PAI inserieren und haben dann eine

untergeordnete oder keine Bedeutung in der Entstehung einer PAI (52). Zum Beispiel ist die Insertion des IS605 in die Cag-PAI (für: cytotoxin-associated gene) von *Helicobacter (H.) pylori* bedeutungslos für die PAI-Mobilisierung, scheint jedoch an Deletionsprozessen und der daraus resultierenden Evolution beteiligt zu sein (26). Die SHI-2 PAI von *S. flexneri* besitzt zahlreiche komplette IS-Elemente und Teile von ihnen. Vergleichende Untersuchungen von SHI-2-Inseln zwei verschiedener *S. flexneri*-Stämme ergaben eine große Ähnlichkeit der linken PAI-Seite einschließlich derselben IS-Elemente, jedoch substantielle Unterschiede der IS-Elemente und anderer Sequenzen in der rechten Seite der PAI. Die SHI-2 PAIn von *Shigella (S.) sonnei* und *Shigella (S.) boydii* wiesen im Gegensatz zu den *S. flexneri*-Stämmen andere IS-Elemente in der linken PAI-Seite auf (103, 162). IS-Elemente sind an der Umgestaltung von PAIn über große Zeitabschnitte beteiligt (Makroevolution), spielen aber auch eine nicht untergeordnete Rolle in der Mikroevolution. Das beweist die Insertion und Exzision des IS256 in unterschiedliche Stellen des *ica*-Genclusters (für: intercellular adhesion) von *Staphylococcus (S.) epidermidis*. Dieses Gencluster kontrolliert die Expression eines interzellulären Adhäsins, das eine Hauptkomponente von Staphylokokken-Biofilmen darstellt (175).

### 2.2.3 Deletion von Pathogenitätsinseln

Ein gemeinsames Merkmal aller Pathogenitätsinseln ist deren Instabilität. Deletionen von PAIn werden durch das Vorhandensein von DR-Sequenzen, IS-Elementen oder ähnlichen PAI-spezifischen Sequenzen begünstigt. Es finden Deletionen entweder der kompletten PAI oder nur von Teilen PAI-spezifischer Sequenzen statt. Deletionen scheinen eine bedeutende Rolle in der Anpassung pathogener Mikroorganismen während verschiedener Infektionsstadien zu spielen, indem sie Bakterien selektive Vorteile gegenüber anderen verschaffen. Deletionen können einerseits über längere Zeitintervalle hinweg geschehen und der Optimierung der PAI-Struktur dienen, indem nicht (mehr) benötigte Gene entfernt werden. Andererseits können Deletionen im Rahmen eines Mikroevolutionsprozesses ablaufen. Ein Beispiel dafür stellt der Erwerb der Cag-PAI bei *H. pylori* dar (26).

DR-Sequenzen stellen Zielorte für Integrasen/Exzisionasen (spezifische Rekombinasen) dar, die eine RecA-unabhängige Deletion von PAIn erlauben (42, 49). Es scheinen v.a. PAI-kodierte Integrasen an Deletionsprozessen beteiligt zu sein.

IS-Elemente und ähnliche DNS-Sequenzen, die innerhalb einer PAI lokalisiert sind, scheinen im Gegensatz zu DR-Sequenzen partielle Deletionen zu fördern (21). Deletionen können aber

auch die Folge homologer Rekombinationen sein (42, 21). Die HPI von *Y. pestis* neigt häufig zu spontanen Deletionen der kompletten 102 kb großen PAI aufgrund einer homologen Rekombination zweier flankierender IS-Elemente (42). Deletionen der HPI von *Y. pseudotuberculosis* sind dahingegen das Resultat einer homologen Rekombination zweier Direct Repeats (21). Auch die IS-Elemente der Cag-PAI von *H. pylori* sind an Deletion und Transposition beteiligt (26).

Ein anderes Beispiel stellen die PAI-Elemente von UPEC dar. An diesem Deletionsprozess sind Rekombinasen/Integrasen beteiligt (18, 51). Die PAI I und PAI II des UPEC-Stammes 536 kodieren jedoch für nicht funktionelle Rekombinasen, was darauf schließen lässt, dass an der Deletion Integrasen korrespondierender PAIn beteiligt sind oder dass sie vom restlichen Genom kodiert werden. Der *she*-PAI von *S. flexneri* 2a konnten auch spontane Deletionen nachgewiesen werden, die von der auf der PAI lokalisierten Integrase abhängig sind (7), was eine Übertragung von *she*-PAI-Abschnitten auf andere *Shigella*-Stämme und pathogene *E. coli* zu ermöglichen scheint und die Insertion in andere *phe*-tRNS-Gene erlaubt (7, 6). Ein ähnliches Phänomen wurde bei der SHI-2 PAI von *S. flexneri* und der HPI von *Yersinia* ssp. beschrieben (11, 162, 119).

#### 2.2.4 Rearrangement, Homing und kompakte Pathogenitätsinseln

Aufgrund zahlreicher Faktoren (Transposons, IS-Elemente, repetitive Sequenzen, Prophagen), die zur Mobilität innerhalb des Genoms beitragen, finden auch Rekombinationen und Insertionen innerhalb der betroffenen Bakterien statt (20). Das führt dazu, dass PAIn oft mosaikartige Strukturen besitzen, die Ergebnisse zahlreicher Insertionen und Deletionen innerhalb des Bakteriums darstellen. In der *she*-PAI von *S. flexneri* 2a wurden IS-Elemente, putative Transposasen, eine P4-ähnliche Integrase sowie Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu konjugativen Plasmiden nachgewiesen (7). In der LEE-PAI des EHEC-Stammes RW1374 (O103:H2) wurden ebenfalls mehrere kryptische Bakteriophagen-Sequenzen und IS-Elemente beschrieben (69).

Spielt eine PAI eine bedeutende Rolle in der mikrobiellen Fitness oder Pathogenität eines Bakteriums, können Mobilitätselemente, die zuvor an Transfer, Deletion oder Exzision beteiligt waren, inaktiviert oder deletiert werden. Es wird angenommen, dass die Inaktivierung der kryptischen Mobilitätsgene die Stabilisierung der PAI ermöglicht (50, 77). Unter dem selektiven Druck wird die PAI durch Inaktivierung oder Verlust der Mobilitätselemente stabil im Genom eingebaut (52). Dieser Prozess wird als „Homing“

bezeichnet. Bei der LEE-PAI in EPEC oder der SP I und SP II von *Salmonella (S.) enterica* handelt es sich um stabile PAIn.

Nach der Stabilisierung entwickelt sich die PAI langsam zu einer Post-PAI weiter. Hierbei werden Codon-Nutzung und G+C-Gehalt an den des Rezipientengenoms angepasst. Die Anpassung erfolgt durch direktionelle Mutation, wobei insbesondere die dritte Codon-Base betroffen ist. Vergleiche der Anpassung in der dritten Codon-Stelle und in den ersten zwei Stellen sind ein Hinweis für die Fortsetzung dieses Prozesses. So konnte gezeigt werden, dass potenziell pathogene *Salmonella*- und einige *E. coli*-Stämme oft eine hohe Mutationsrate und Rekombinationseffizienz besitzen, was den Erwerb mobiler Elemente begünstigt (85).

Im Laufe der Zeit kann sich die Größe einer PAI reduzieren, indem nur noch die wichtigsten Gene, die für Schlüsselfunktionen benötigt werden, erhalten bleiben. Die PAI wird mehr und mehr kompakter, wie die LEE-PAI von EPEC. Daneben existieren auch große PAIn, in denen die Virulenzgene noch von großen DNS-Sequenzbereichen mit kryptischen Genen, offenen Leserahmen mit bislang unbekannt Funktionen oder Pseudogenen umrahmt sind, wie z.B. die PAIn der UPEC (73).

Der Erwerb neuer Gene via horizontalem Transfer stellt keinen Einzelfall dar, sondern ist ein Hauptprozess der mikrobiellen Evolution und konnte auch bei apathogenen Bakterien nachgewiesen werden (84). Die meisten Unterschiede zwischen den nach derzeitigen Schätzungen vor 100 Millionen Jahren getrennten *E. coli* und *S. enterica* sind auf horizontal erworbene Gene zurückzuführen. Auf der Basis der Substitutionsrate zwischen *E. coli* und *Salmonella* wurde das Alter pathogener *E. coli* auf ca. 9 Millionen Jahre und das Alter von *E. coli* O157:H7 auf 4,5 Millionen Jahre geschätzt (124).

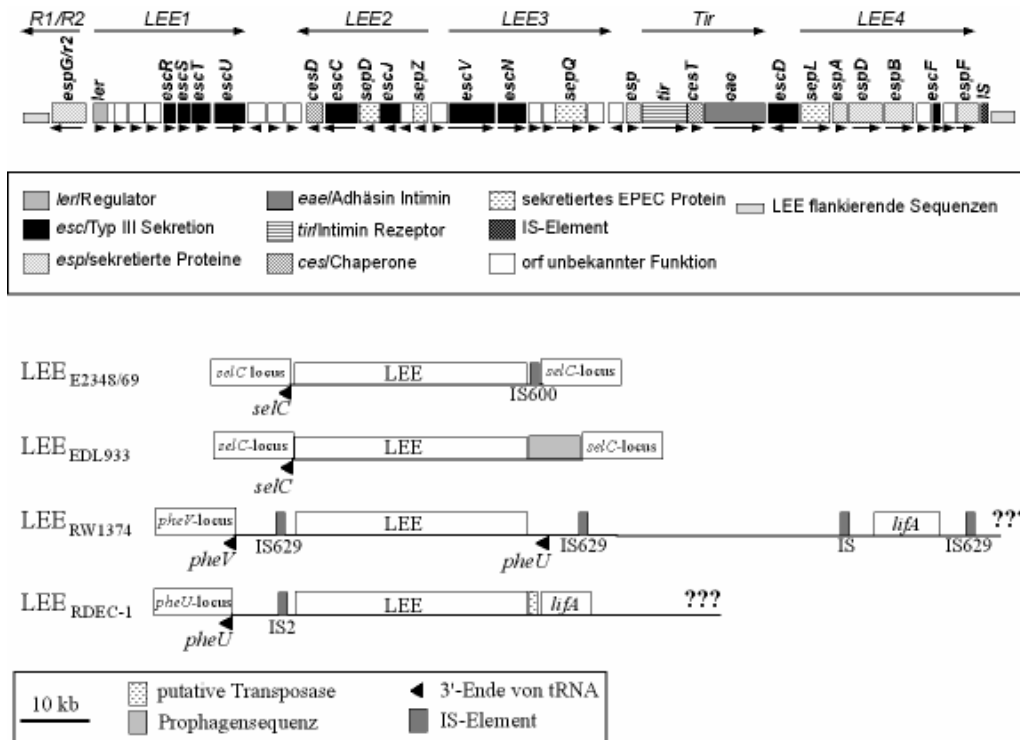
Abschließend soll als Beispiel einer Pathogenitätsinsel die LEE-PAI pathogener *E. coli*-Stämme, einschließlich ihrer Virulenzfaktoren und Regulation, näher erläutert werden.

### **2.2.5 Locus of Enterocyte Effacement (LEE)**

Die LEE-Pathogenitätsinsel ist unter den Enterobakterien weit verbreitet. Sie kommt bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC), diffus adhärennten *E. coli* (DAEC), enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), den für Kaninchen darmpathogenen *E. coli* (RDEC-1), *C. rodentium* sowie *Escherichia (E.) alvei* vor (105). Der niedrige G+C-Gehalt des LEE (38,3 %) im Vergleich zum G+C-Gehalt des *E. coli*-K12-Genoms von 50,8 % ist ein Zeichen dafür, dass der LEE horizontal erworben wurde.

Die gesamte DNS-Sequenz des LEE wurde erstmals für den EPEC-Stamm E2348/69 (O127:H6) durch Elliott et al. (40) bestimmt. Dieser LEE ist 35.624 bp groß und enthält 41 offene Leserahmen („open reading frames“, Orf), die in 10 Operons (*LEE1* – *LEE10*) gruppiert sind, wobei die wichtigsten Operons *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *tir* (für: translocated intimin receptor) und *LEE4* sind. Funktionell ist der LEE in drei Regionen unterteilt. In der mittleren Region befinden sich das für das Adhäsin Intimin kodierende *eae*-Gen (für: *E. coli* attaching and effacing) sowie das Gen *tir*. Intimin ist ein 94 bis 97 kDa großes äußeres Membranprotein (68). Das Tir-Genprodukt ist der 78 kDa große translozierte Rezeptor für Intimin. Stromabwärts der mittleren Region sind 13 Gene lokalisiert (*esc*- [für: *E. coli* secretion] und *sep*-Gene [für: secreted *E. coli* protein]), die für ein Typ III-Sekretionssystem kodieren (66). Stromaufwärts befinden sich *esp*-Gene (für: *E. coli* secreted proteins), deren kodierte Proteine Esp durch dieses Typ III-Sekretionssystem in die Wirtsepithelzellen eingeschleust werden (81). Die Gene *cesD*, *cesT* (für: chaperone for *E. coli* secreted proteins) und *orf27* kodieren zytosolische Chaperone, die jeweils die Faltung der translozierten Proteine EspB und EspD (CesD und CesD2) sowie Tir (CesT) unterstützen (1, 38, 163, 107).

Inzwischen wurden weitere LEE-PAIn sequenzanalysiert (Abb. 1). Es handelt sich um den LEE des humanen O157:H7 EHEC-Stammes EDL933 (112), des lapinen darmopathogenen *E. coli*-Stammes RDEC-1 (O15:H-) (174), des bovinen EHEC-Stammes 413/89-1 (O26:H-) (Acc.-N°: AJ277443), des bovinen EHEC-Stammes RW1374 (O103:H2) (69) sowie von *C. rodentium* (32). Alle LEE-PAIn enthalten eine hoch konservierte 34 kb große Kernregion, welche die bereits bei Elliott et al. (40) beschriebenen Gene beherbergt. Allerdings weisen viele der einzelnen Gene einen hohen Polymorphismus auf. Weiterhin bestehen Unterschiede bezüglich der Größe der einzelnen LEE-enthaltenden PAIn. Auch die LEE flankierenden Bereiche sind sehr unterschiedlich. Ferner sind diese LEE-PAIn in unterschiedliche chromosomale tRNS-Loci inseriert.



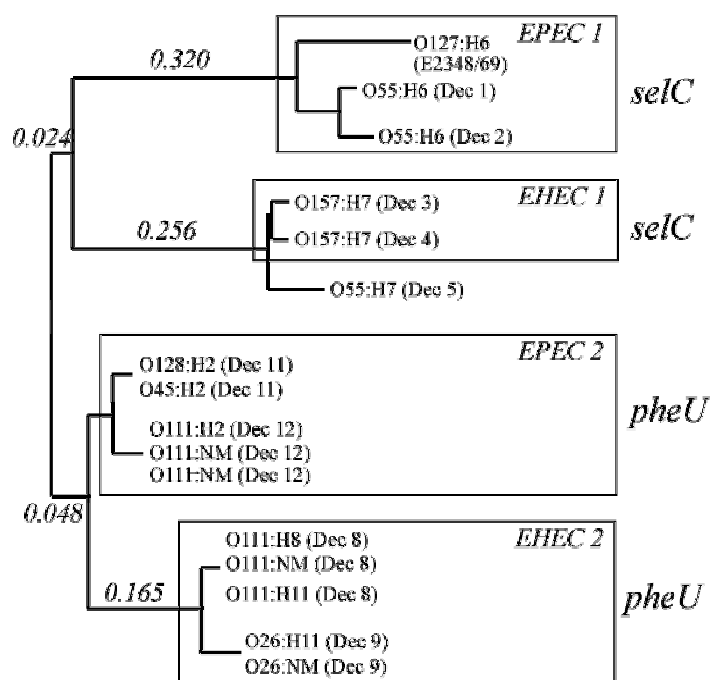
**Abb. 1** Schematische Darstellung der gesamten EPEC-LEE-Sequenz (nach Elliott et al., 1998 (40), Deng et al., 2001 (32); oben) und Vergleich der verschiedenen sequenzierten LEE-PAIs (nach Jores et al., 2003 (70), Zhu et al., 2001 (174); unten)

Im O157:H7-Stamm EDL933 ist der LEE 43.359 bp groß. Die Kernregion enthält 41 Orfs, die zu 93,9 % zu der des EPEC-LEE E2348/69 identisch sind (112). Der Größenunterschied beruht auf einem 7,5 kb großen 933L Prophagen, der Ähnlichkeit zu der P4-Prophagen-Familie hat. Die Enden dieser beiden LEE besitzen eine geringere Ähnlichkeit zu IS-Elementen der IS600-Familie und enthalten einen kleinen Orf mit Ähnlichkeit zu einer putativen Transposase (34). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der LEE durch Mobilisierungselemente übertragen wurde und dass dieser Mechanismus im Verlauf eines Stabilisierungsmechanismus inaktiviert und verkürzt wurde. Bei dem EHEC-Stamm EDL933 und dem EPEC-Stamm E2348/69 ist die LEE-PAI im tRNS-Gen *selC* inseriert (112, 40). Der LEE des bovinen EHEC-Stammes 413/89-1 hingegen weist eine Größe von 59,4 kb auf und befindet sich im *pheU*-tRNS-Locus (14). Die 34 kb große LEE-Kernregion des RDEC-1 umfasst nur 40 Orfs, die zu 89,3 % ähnlich dem LEE des EPEC-Stammes E2348/69 ist. Der LEE-Insertionsort ist bislang unbekannt (174). Die 36 kb große Kernregion des LEE von *C. rodentium* enthält 41 Orfs, die zu 98 % denen der LEE von E2348/69 und EDL933 homolog sind. Auch hier ist der LEE-Insertionsort unbekannt (32). Im bovinen EHEC-Stamm RW1374 wiederum befindet sich der LEE auf einer mindestens 120 kb großen PAI und ist im *pheV*-tRNS-Gen inseriert, einer zu *pheU* identischen Phenylalanin spezifischen tRNS, die sich

bei 64' auf dem *E. coli*-Chromosom befindet (69). Diese PAI hat eine Mosaikstruktur. Die Anwesenheit von Insertionssequenzen und Homologen des 23 bp 3'-Endes des *pheV*- und *pheU*-Gens angrenzend an den LEE lassen vermuten, dass der LEE in eine schon vorhandene PAI inseriert ist (127).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass zwischen dem Insertionsort des LEE in AE-positiven *E. coli* und der jeweiligen phylogenetischen Herkunft der Stämme eine Assoziation besteht (168). EPEC- und EHEC-Pathovaren wurden nach Berechnung der genetischen Distanzen mittels Multi-Locus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) in 4 phylogenetische Gruppen eingeteilt (Abb. 2): EPEC1 und EPEC2 sowie EHEC1 und EHEC2 (96). Die EPEC-Cluster umfassen eine Vielzahl verschiedener Serovaren, die in 9 DEC-Klone eingeteilt wurden. Während EHEC2 und EPEC2 eine monophyletische Gruppe bilden, sind EPEC1 und EHEC1 entfernte Verwandte (36). Der Hauptvertreter der EHEC1-Gruppe ist O157:H7. Dieser Klon ist nahe verwandt mit einem atypischen O55:H7-EPEC-Klon, der als Vorläufer der O157:H7-Klone gilt. Die EHEC2-Gruppe enthält einige nicht-O157:H7-EHEC-Serovaren, wie O111:H8/H- und O26:H11/H-. Diese Gruppe beinhaltet auch den nahe verwandten RDEC-1 (O15:H-), obwohl dieser kein EHEC ist (96). In Stämmen der Cluster EPEC1 und EHEC1 ist der LEE in der *selC*-tRNS inseriert, während der LEE-Insertionsort bei Stämmen der EPEC2- und EHEC2-Cluster unbekannt ist (168). Jedoch konnten Sperandio et al. (144) zeigen, dass der LEE der EHEC-Serovaren O111:H8/H- und O26:H11/H- innerhalb des *pheU*-tRNS-Gens inseriert ist. Sie konnten außerdem zeigen, dass in 2 Stämmen der Serovar O111:H25 die *selC*- und *pheU*-tRNS-Gene intakt waren, was auf einen noch unbekanntem LEE-Insertionsort schließen lässt.





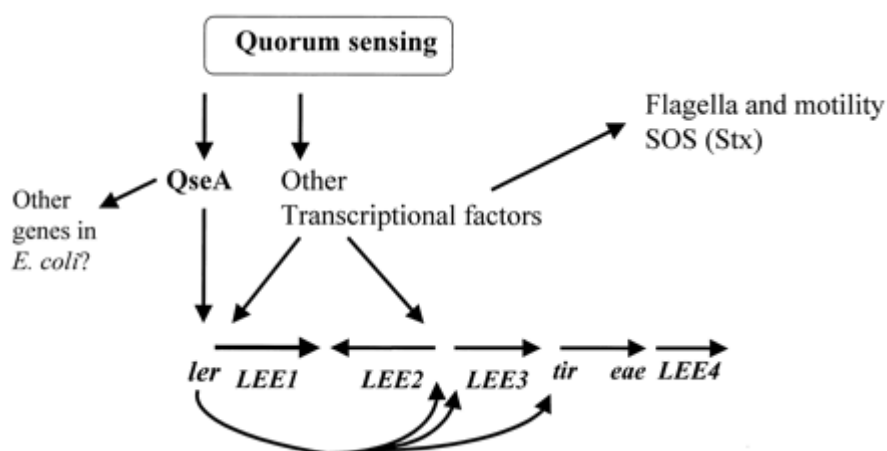
**Abb. 2** Dendrogramm LEE-positiver DEC-Klone auf Basis der Multi-Locus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) in bezug auf LEE-Insertionsort und Intimintyp (modifiziert nach Whittam et al., 1993 (165); Wieler et al., 1997 (168) und Sperandio et al., 1998 (144))

Die Ermittlung unterschiedlicher LEE-Insertionsorte bestätigte einen horizontalen Transfer dieser Pathogenitätsinsel zwischen verschiedenen EPEC- und EHEC-Stämmen. Jedoch kann nicht nur allein der Insertionsort die Phylogenese von *E. coli*-Stämmen erklären, sondern auch die Tatsache, dass verschiedene LEE-kodierte Intimintypen existieren, die offensichtlich auch den phylogenetischen DEC-Klonen zugeordnet werden können. Es wurden bislang sechs verschiedene Intimintypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\theta$ ) publiziert, wobei die einzelnen Intimintypen bestimmten *E. coli*-Serovaren zuzuordnen sind (3, 111, 156). Demnach enthalten die DEC-Klone 1 und 2 des EPEC1-Clusters sowie *E. alvei*-Stämme den Intimintyp  $\alpha$ , die DEC-Klone 11 und 12 des EPEC2-Clusters und die DEC-Klone 9 und 10 des EHEC2-Clusters einschließlich RDEC-1 sowie *C. rodentium*-Stämme den Intimintyp  $\beta$ . Die DEC-Klone 3 und 4 des EHEC1-Clusters sowie der EPEC-Stamm O55:H7 (DEC 5) enthalten den Intimintyp  $\gamma$  (3, 123). Der Intimintyp der DEC 8-Klone (O111:H8) des EHEC2-Clusters wurde von Tarr und Whittam (156) als  $\theta$ -Intimintyp identifiziert. EPEC-Stämme der Serovar O86:H34 bilden den Intimintyp  $\delta$  aus (3) und EHEC-Stämme der Serogruppen O8, O11, O45, O103, O121 und O165 den Intimintyp  $\varepsilon$  (111). Des weiteren wurden bei anderen humanen und bovinen *E. coli*-Stämmen weitere Intimintypen ( $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\zeta$ ) bestimmt (71, 173).

Da der LEE durch horizontalen Gentransfer erworben wurde, steht die regulatorische Verbindung zwischen dem LEE und dem jeweiligen *E. coli*-Genom im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Die Transformation des LEE des EPEC-Stammes E2348/69 in einen apathogenen *E. coli* K12 vermittelt den Phänotyp der AE-Läsion (94). Offensichtlich sind an der Expression der LEE-kodierten Gene in EPEC sowohl chromosomal als auch episomal kodierte Faktoren involviert. Friedberg et al. (45) zeigten, dass der auch in *E. coli* K12 vorhandene Integration Host Factor (IHF) für die Expression des LEE notwendig ist. IHF aktiviert die Expression der Gene des *LEE1*-Operons durch Bindung des stromaufwärts gelegenen *LEE1*-Promotors. Bei EPEC-Stämmen wird die Expression von *LEE1* zusätzlich durch das AraC-ähnliche Protein Per (für: plasmid encoded regulator) erhöht. Per ist ein Regulationsfaktor, der auf dem EAF-Plasmid kodiert ist (97). In EHEC-Stämmen wurde bislang kein Per-Homologon identifiziert (47). Per reguliert auch die Expression von Intimin und des *bfp*-Operons (47, 159), das für die primäre Adhäsion der EPEC verantwortlich ist. In einer Kaskade aktiviert dann der *LEE1*-kodierte Ler (für: LEE encoded regulator) die Expression der anderen LEE-Promotoren von *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* und *tir* sowie weitere LEE-kodierte Gene, die nicht an der Ausbildung von AE-Läsionen beteiligt sind (97, 45, 39). Ler reguliert ebenfalls die Expression von Proteinen, die außerhalb des LEE kodiert sind (39). Sperandio et al. (146) zeigten, dass Ler an die stromaufwärts des *LEE2*-Operons gelegene regulatorische Region bindet und die Transkription der *LEE2*- und *LEE3*-Operons aktiviert. Des Weiteren hebt Ler die Unterdrückung der Transkription der *LEE2*, *LEE3*- und des *tir*-Operons auf, die durch histonähnliche Proteine und andere negative Regulatoren verursacht wird (22, 131).

Der LEE von EHEC O157:H7 wird jedoch offensichtlich anders reguliert. Elliott et al. (38) konnten zeigen, dass der klonierte O157:H7 LEE im Gegensatz zu dem des EPEC-Stammes O127:H6 im *E. coli* K12 Hintergrund keine AE-Läsionen verursachte. In RDEC-1 sowie in EPEC O127:H6-Stämmen und in EHEC O157:H7-Stämmen sind die Promotoren der *LEE2*-, *LEE3*-, *tir*- und *LEE4*-Operons hoch konserviert. Diese Operons sind alle durch Ler reguliert. Hingegen sind die Sequenzen stromaufwärts von *tir* und vom *LEE1*-Promotor sehr unterschiedlich, was auf eine unterschiedliche Regulation hindeutet (174). Dies könnte der Grund dafür sein, dass der EPEC, aber nicht der EHEC-LEE, in der Lage ist, den AE-Phänotyp in *E. coli* K12 zu vermitteln. Der LEE von nicht-O157:H7 EHEC-Stämmen wurde bislang noch nicht in *E. coli* K12 kloniert. Sperandio et al. (147) konnten jedoch zeigen, dass an der Regulation des EHEC- und EPEC-LEE Quorum Sensing beteiligt ist. Die an der Ausbildung von AE-Läsionen involvierten Gene werden durch einen Quorum Sensing *E. coli*

Regulator A (QseA) reguliert, indem QseA die Transkription von *ler* und Ler die Transkription des *LEE2-*, *LEE3-*, *LEE4-* und *tir*-Operons aktiviert (Abb. 3). Die Transkription von *qseA* wird wiederum von einem Autoinducer (AI-2) reguliert (145). Dieser *luxS*-kodierte AI-2 wird durch Quorum Sensing gebildet (147). Das AI-2-*luxS*-Quorum-Sensing-System würde auch die geringe Infektionsdosis für EHEC im Dickdarm erklären (147). Neben Virulenzfaktoren werden ferner zahlreiche physiologische Hauptfunktionen, auch bei *E. coli* K12 und anderen Spezies, durch Quorum-Sensing-Regulationssysteme reguliert (148, 149).

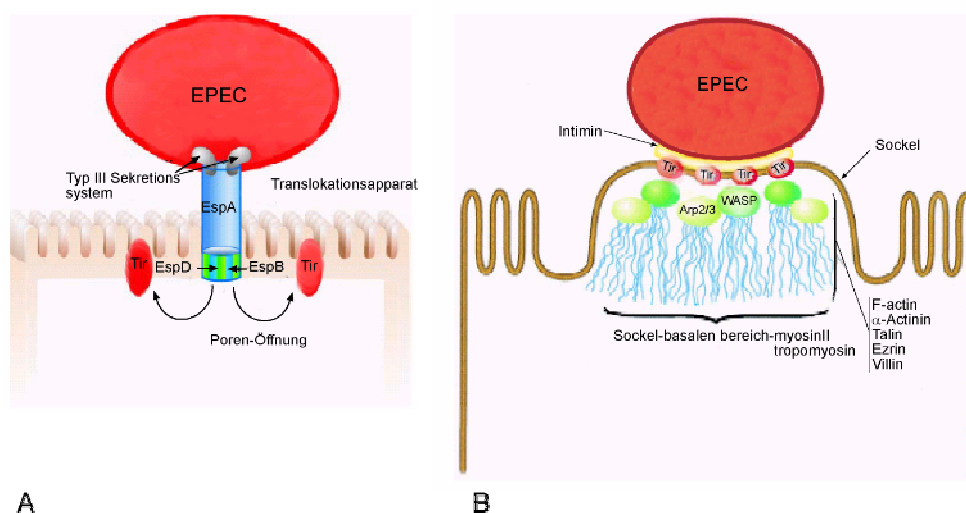


**Abb. 3** Modell der Quorum Sensing Regulationskaskade in EHEC (nach Sperandio et al., 2002 (145))

Alle für die Ausbildung der sog. Attaching and Effacing- (AE-) Läsion (Abb. 4) verantwortlichen Gene sind auf der LEE-PAI kodiert. Die AE-Läsion ist ein Prozess, der in drei Stufen abläuft. Die initiale Adhäsion, die der Ausbildung der AE-Läsion vorausgeht, ist bei den verschiedenen AE-Pathogenen offensichtlich variabel.

Der AE-Phänotyp wurde zuerst in EPEC beschrieben (80, 101). Eine lokalisierte Adhäsion (LA) wird bei EPEC durch BFP (für: Bundle Forming Pilus) vermittelt, während dieses Stadium bei EHEC noch nicht vollständig geklärt ist. Hingegen ist die Ausbildung der AE-Läsion bei den verschiedenen LEE-positiven Pathogenen sehr ähnlich, wobei die Mechanismen am besten im Muster-Stamm EPEC E2348/69 untersucht wurden. Die histopathologische Schädigung der Wirtsenterozyten ist durch eine enge Adhäsion der Bakterien an die Epithelzellmembran über das Adhäsin Intimin („attaching“) und einem Umbau des Zytoskeletts unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien gekennzeichnet. Intimin stellt dabei einen wichtigen Virulenzfaktor von EPEC-Stämmen dar (33). Durch eine Depolymerisierung von Aktinfilamenten verstreichen die Mikrovilli der Enterozyten

(„effacing“). Aktin und andere Zytoskelettkomponenten wie  $\alpha$ -Actinin, Ezrin, Villin und Talin polymerisieren erneut unter der Anheftungsstelle und bilden dabei eine sockelähnliche Struktur aus (43). Nach letzten Untersuchungen muss der eukaryotische Faktor WASP (für: Wiskott-Aldrich syndrome family of proteins) sowie der „actin nucleating factor“ Arp2/3 die Polymerisierung von Aktin in der Wirtszelle aktivieren (72). Auf dem Nachweis dieser lokalisierten Akkumulierung von Aktin mittels Phalloidin beruht die *in vitro* Diagnose von AE-Pathogenen (80).



**Abb. 4 Schematische Darstellung der AE-Läsion; A: Translokationsapparat; B: Struktur des EPEC-Sockels (nach Vallance and Finlay, 2000 (160))**

Eine Besonderheit des LEE-vermittelten Adhäsionssystems ist die Tatsache, dass die Bakterien nicht nur das Adhäsin Intimin, sondern auch dessen Rezeptor Tir synthetisieren (78). Dadurch macht sich das Pathogen unabhängig von der Expression eines Wirtszellrezeptors (160). Der Rezeptor Tir wird über das vom LEE kodierte Typ III-Sekretionssystem sowie einen durch die Proteine EspA, -B und -D gebildeten Translokationsapparat in die Wirtszelle transloziert, wo er schließlich in die Wirtszellmembran inseriert (44). Der ausgelöste Zytoskelettumbau unterstützt die Anheftung von AE-Bakterien durch Bildung einer sockelähnlichen Struktur. Die Bindung zwischen Intimin und Tir scheint für diese Veränderungen maßgeblich zu sein (78). Bis jetzt konnte aber die direkte Verknüpfung zwischen den bakteriellen in die Wirtszelle eingeschleusten Faktoren und der Auslösung der Zytoskelettveränderungen nicht entschlüsselt werden (36).

Durch das Typ III-Sekretionssystem werden Effektorproteine wie Tir in die Wirtszelle transloziert und die Komponenten des Translokationsapparats (EspA, -B, -D) über die innere und äußere bakterielle Membran übertragen. Während EspA ausschließlich Bestandteil des

Translokationsapparates ist, sind die genauen Funktionen von EspB und EspD noch unbekannt. EspB bildet eine Pore in den Enterozyten, die die Translokation von Tir ermöglicht (44). Es wirkt auch als Effektorprotein, indem es die Regulation des Wirtszytoskeletts stört (158). Die Bildung einer AE-Läsion beruht demnach auf der Beeinflussung von Signaltransduktionsketten der Wirtszellen. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob diese Veränderungen ausschließlich spezifisch durch bakterielle Effektorproteine ausgelöst werden oder ob dies auch teilweise auf unspezifische Konsequenzen der Infektion zurückzuführen ist (160).