

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Lokalisation der LEE-Pathogenitätsinsel im Chromosom AE-positiver Bakterien

4.1.1 Bestimmung des Insertionsortes der LEE-Pathogenitätsinsel bei *Escherichia coli*-Stämmen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Aus der Literatur und eigenen Untersuchungen war bekannt, dass die LEE-PAI bei den zu untersuchenden humanen DEC-Klonen des EPEC2- und EHEC2-Clusters nicht innerhalb des tRNS-Locus *selC* inseriert ist, sich jedoch innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *pheV* befinden könnte (168, 144). Ausgehend von dieser Annahme sollte der Insertionsort der LEE-PAI innerhalb dieser beiden tRNS-Loci mittels diverser Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) bei 17 humanen *E. coli*-Stämmen bestimmt werden. Weiterhin sollte der bisher unbekannte LEE-PAI-Insertionsort 26 boviner *E. coli*-Stämme bestimmt werden, wobei zusätzlich zu den tRNS-Genen *pheU* und *pheV* auch *selC* untersucht werden sollte.

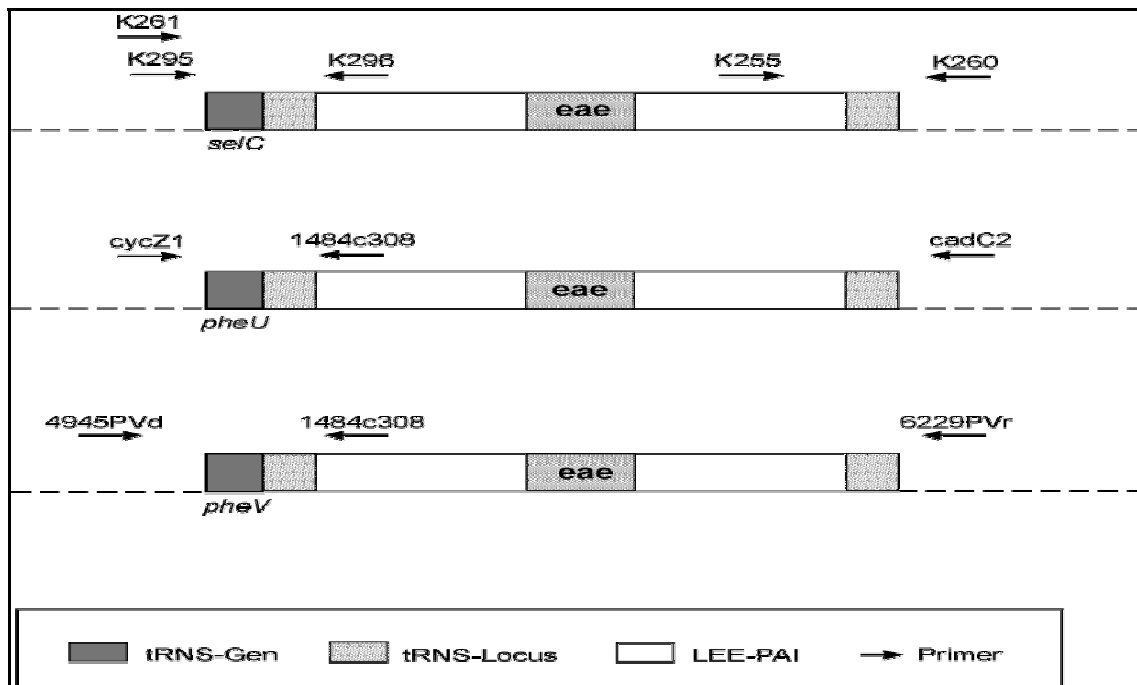


Abb. 5 Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Primerpaare zur Untersuchung der tRNS-Loci

Für diesen Zweck wurden Primerpaare (Abb. 5) verwendet, die einerseits ein intaktes tRNS-Gen (*pheU*: cadC2-cycZ1; *pheV*: 6229PVr-4945PVd; *selC*: K295-K260, K261-K260)

andererseits die Existenz einer PAI innerhalb dieser tRNS-Genloci (***pheU***: 1484c308-cycZ1; ***pheV***: 1484c308-4945PVd; ***selC***: K295-K296, K255-K260) nachweisen. Die Ermittlung einer PAI-Insertion erfolgt über den Nachweis der linken bzw. rechten Verbindungsstelle zwischen PAI und tRNS-Gen. Ein fehlendes PCR-Produkt bei der Überprüfung eines intakten tRNS-Locus spricht für die Zerstörung dieses tRNS-Gens infolge der Insertion einer genomischen Insel.

4.1.1.1 Bestimmung des LEE-Insertionsortes humaner *Escherichia coli*-Stämme

PCR-Reaktionen, die die Insertion einer PAI innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *pheV* untersuchten, wiesen die Existenz einer PAI innerhalb des *pheV*- sowie des *pheU*-Locus bei 12 der 17 DEC-Klone nach. Der Stamm 2254-75 besaß nur eine PAI innerhalb des *pheV*-Locus. Bei diesem Stamm war der *pheU*-Locus intakt. Zwei weitere DEC-Klone (2966-56 und 3291-86) besaßen eine PAI nur innerhalb des *pheU*-tRNS-Locus. Bei dem Stamm 3291-86 wurde kein 6229PVr-4945PVd-PCR-Produkt amplifiziert, was auf einen zerstörten *pheV*-Locus schließen ließ. Dahingegen wies der Stamm 2966-56 einen intakten *pheV*-Locus auf. Die *E. coli*-Stämme 42 und 173 der Serovar O111ab:H25 besaßen jeweils eine PAI nur innerhalb des *pheV*-Locus. Der *pheU*-Locus war bei beiden Stämmen intakt.

Die PCR-Ergebnisse der humanen *E. coli*-Stämme bezüglich der Untersuchung eines PAI-Insertionsortes in den tRNS-Genen *pheU* und *pheV* sind in Tab. 15 aufgelistet. Das Zeichen „+“ steht für ein PCR-Produkt entsprechender Größe, das Zeichen „-“ für ein fehlendes PCR-Amplifikat.

Tab. 15 Ergebnis der Untersuchung von 17 humanen *Escherichia coli*-Stämmen zur Insertion einer Pathogenitätsinsel innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *pheV* mittels Polymerase-Kettenreaktion

Stamm	Serovar	<i>pheU</i> -tRNS-Locus		<i>pheV</i> -tRNS-Locus		PAI-Insertionsort
		1484c308-cycZ1	cadC2-cycZ1	1484c308-4945PVd	6229PVr-4945PVd	
2198-77	O111:NM	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
3030-86	O111:H8	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
C130-53	O111:H11	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
3323-61	O26:H11	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
2262-79	O26:NM	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>

Tab. 15 (Fortsetzung)

Stamm	Serovar	<i>pheU</i> - tRNS-Locus		<i>pheV</i> - tRNS-Locus		PAI- Insertionsort
		1484c308- cycZ1	cadC2- cycZ1	1484c308- 4945PVd	6229PVR- 4945PVd	
C240-52	O26:NM	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
45	O26:H11	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
900105	O26:H11	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
2254-75	O128:H2	-	+	+	-	<i>pheV</i>
A9619-c2	O45:H2	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
E335021	O128:H2	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
2966-56	O111:H2	+	-	-	+	<i>pheU</i>
3942-67	O111:H2	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
9101-83	O111:H2	+	-	+	-	<i>pheU/V</i>
3291-86	O111:NM	+	-	-	-	<i>pheU</i>
42	O111ab:H25	-	+	+	-	<i>pheV</i>
173	O111ab:H25	-	+	+	-	<i>pheV</i>

Zusammenfassend ergaben die PCR-Untersuchungen, dass die Mehrzahl der humanen *E. coli*-Stämme (n = 12) eine genomische Insel sowohl innerhalb des tRNS-Locus *pheU* als auch innerhalb *pheV* besaßen. Drei Stämme enthielten eine PAI innerhalb des *pheV*-tRNS-Locus, weitere 2 Stämme innerhalb *pheU*.

4.1.1.2 Bestimmung des LEE-Insertionsortes boviner *Escherichia coli*-Stämme

Die Untersuchung 26 boviner EHEC-Stämme wies die Insertion einer PAI sowohl innerhalb des *pheU*- als auch des *pheV*-Locus bei 15 Stämmen nach. Drei Stämme (IHIT 5671, 72/90-56 und RW1911) besaßen eine PAI nur innerhalb des tRNS-Locus *pheU*, wobei der *pheV*-tRNS-Locus jeweils zerstört war, die Insertion einer PAI innerhalb *pheV* jedoch nicht nachgewiesen wurde. Der Stamm IHIT 0304 besaß eine PAI sowohl innerhalb des *pheU*- als auch des *selC*-tRNS-Locus. Weitere 4 Stämme (IHIT 0554, IHIT 2115, IHIT 2430, IHIT 3000) enthielten eine PAI nur innerhalb des *pheV*-Locus. Von diesen 4 Stämmen wies die PCR mit dem Primerpaar cadC2-cycZ1 nur bei dem Stamm IHIT 3000 einen intakten *pheU*-Locus nach. Der *pheU*-Locus der anderen 3 Stämme war zerstört, eine PAI-Insertion innerhalb *pheU* wurde jedoch nicht nachgewiesen. Der Stamm IHIT 0072 besaß eine PAI sowohl innerhalb des tRNS-Locus *pheV* als auch *selC*. Den Stämmen IHIT 0597 und IHIT 0608 konnte keine PAI-Insertion innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *pheV* nachgewiesen werden. Jedoch wies der Stamm IHIT 0608 eine PAI innerhalb des tRNS-Locus *selC* auf. Des Weiteren besaß dieser Stamm einen intakten *pheU*-Locus. PCR-

Untersuchungen des Stammes IHIT 0597 konnten auch keine PAI-Insertion innerhalb des tRNS-Locus *selC* nachweisen.

Die PCR-Ergebnisse der bovinen *E. coli*-Stämme bezüglich der Untersuchung eines PAI-Insertionsortes in den tRNS-Genen *selC*, *pheU* und *pheV* sind in Tab. 16 aufgelistet. Das Zeichen „+“ steht für ein PCR-Produkt entsprechender Größe, das Zeichen „-“ für ein fehlendes PCR-Amplifikat.

Tab. 16 Ergebnis der Untersuchung von 26 bovinen EHEC-Stämmen zur Insertion einer Pathogenitätsinsel innerhalb der tRNS-Loci *pheU*, *pheV* und *selC* mittels Polymerase-Kettenreaktion

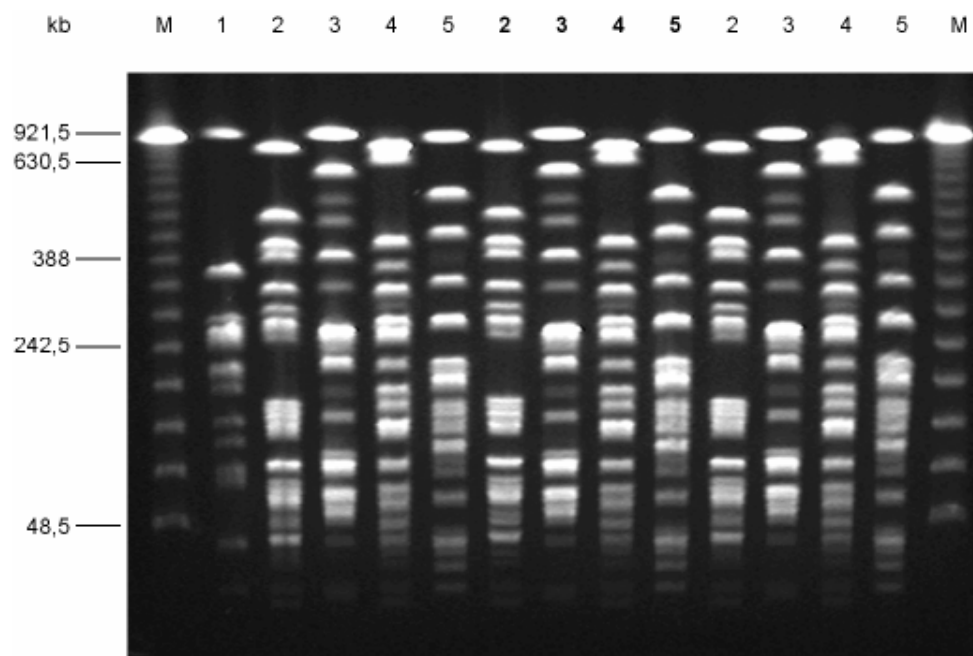
Stamm	Serovar	<i>pheU</i> -tRNS-Locus		<i>pheV</i> -tRNS-Locus		<i>selC</i> -tRNS-Locus		PAI-Insertionsort
		1484c308-cycZ1	cadC2-cycZ1	1484c308-4945PVd	6229Pvr-4945PVd	K295-K296	K295-K260	
IHIT 0084	On.t.:Hn.t.	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
303/89	O153:Hn.t.	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 5671	O145:Hn.t.	+	-	-	-	-	+	<i>pheU</i>
72/90-56	O5:NM	+	-	-	-	-	+	<i>pheU</i>
IHIT 2087	O26:H11	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
RW1911	O118:H16	+	-	-	-	-	+	<i>pheU</i>
RW2297	O118:H16	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 3641	O17,77:H18	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 2169	On.t.:H11	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 0578	O15:H11	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 0304	O145:H28	+	-	-	-	+	-	<i>pheU/selC</i>
IHIT 0608	On.t.:Hn.t.	-	+	-	-	+	-	<i>selC</i>
IHIT 0067	O84:NM	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 3000	O150:NM	-	+	+	-	-	+	<i>pheV</i>
IHIT 3669	O84:H2	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 1190	O92:NM	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 1968	O119:H25	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 0554	On.t.:NM	-	-	+	-	-	+	<i>pheV</i>
IHIT 2430	O80:NM	-	-	+	-	-	+	<i>pheV</i>
IHIT 2115	O4:NM	-	-	+	-	-	+	<i>pheV</i>
RW1372	O103:H2	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 1703	O111:H2	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
IHIT 0597	O157:NM	-	+	-	+	-	+	unbekannt
IHIT 0072	O157:H7	-	+	+	-	+	-	<i>pheV/selC</i>
RW1374	O103:H2	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>
413/89-1	O26:H-	+	-	+	-	-	+	<i>pheU/V</i>

Die PCR-Untersuchungen der 26 bovinen EHEC-Stämme ergab, dass die Mehrzahl der Stämme (n = 15) eine PAI sowohl innerhalb des *pheU*- als auch des *pheV*-tRNS-Locus enthält. Ein Stamm wies eine PAI innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *selC* auf. Ein weiterer

Stamm wies die Insertion einer PAI innerhalb *pheV* und *selC* auf. Nur einem Stamm konnte eine PAI in *pheU* nachgewiesen werden. Die Insertion einer PAI innerhalb *pheV* wurde bei 4 EHEC-Stämmen bestätigt.

4.1.2 Makrorestriktions-Analyse der *Escherichia coli*-Stämme

Die genomische DNS von 44 *E. coli*-Stämmen einschließlich des Kontrollstammes MG1655 wurde zum Zwecke der Bestimmung des LEE-Insertionsortes mittels DNS-DNS-Hybridisierungen mit der selten schneidenden Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut und in der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) untersucht und ist in Abb. 6 exemplarisch dargestellt.



Die DNS-Präparationen der bovinen EHEC-Stämme sind in den Spuren 2 bis 5 aufgetragen. In der Spur **1** ist der *E. coli* K12-Stamm MG1655 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (**M**), 303/89 (**2**), 0554 (**3**), 0578 (**4**), 0608 (**5**); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 6 **Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS von bovinen EHEC-Stämmen**

Mit Ausnahme der Stämme 3323-61 (O26:H11, DEC 09A) und IHIT 1703 (O111:H2) konnten alle *E. coli*-Stämme nach Durchführung der Makrorestriktions-Analyse analysiert werden. Alle Stämme wiesen ein sehr heterogenes *NotI*-Restriktionsmuster auf, wobei die Gesamt-DNS pro Stamm zwischen 11 und 17 DNS-Banden fragmentiert wurde.

4.1.3 Bestimmung des Insertionsortes der LEE-Pathogenitätsinsel auf Makrorestriktions-Fragmenten mittels DNS-DNS-Hybridisierung

Um die Ergebnisse der PCR zu verifizieren und den LEE-Insertionsort innerhalb der tRNS-Loci *pheU* und *pheV* zu bestimmen, sollten DNS-DNS-Hybridisierungen der zuvor *NotI*-restringierten und in der CHEF-PFGE untersuchten sowie auf eine positive Nylonmembran überführten Gesamt-DNS aller *E. coli*-Stämme durchgeführt werden.

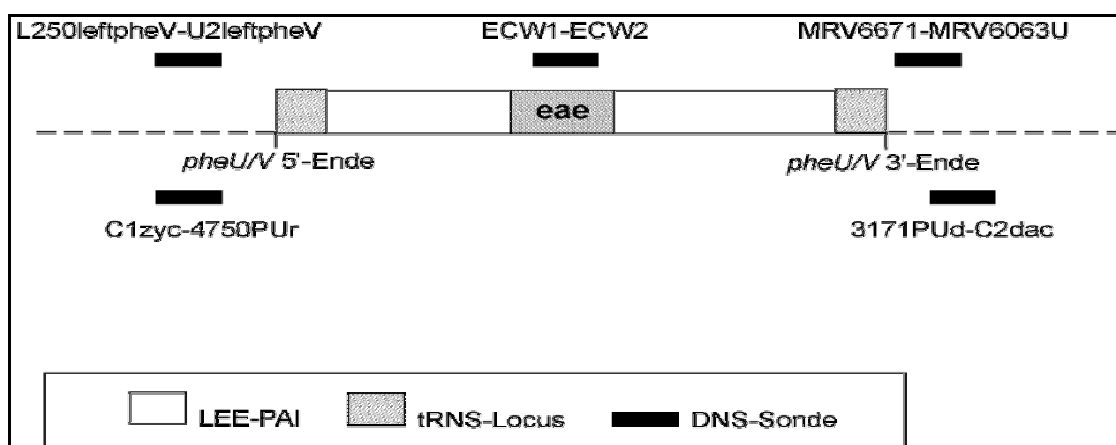
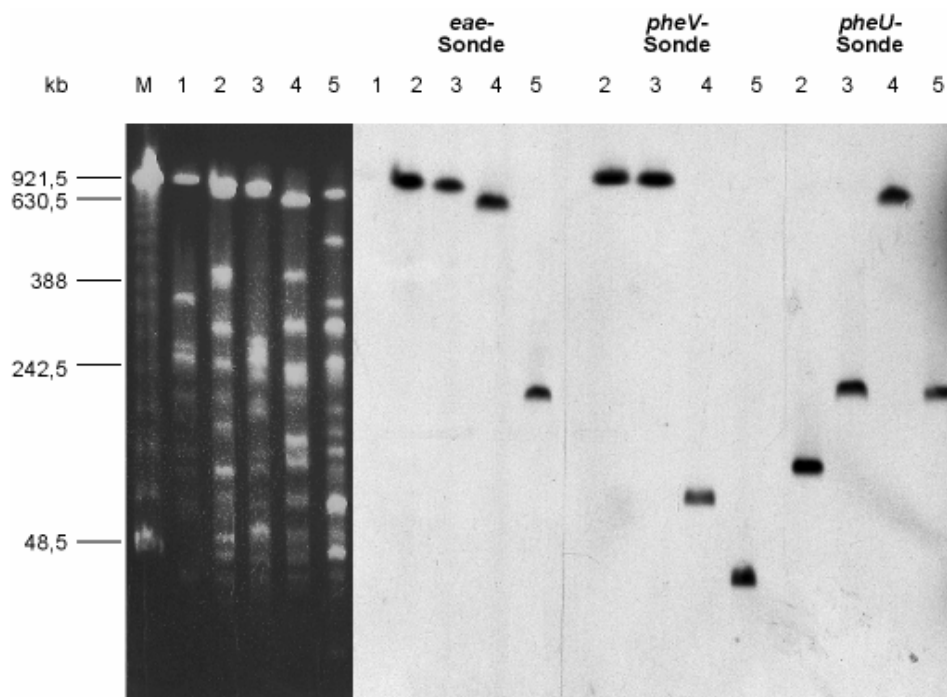


Abb. 7 Schematische Darstellung der Lokalisation der DNS-Sonden zur Bestimmung des LEE-Insertionsortes innerhalb des *pheU*- und *pheV*-Locus

Für diesen Zweck wurden DNS-Sonden (Abb. 7) generiert, die spezifisch die linken (5'-Ende) und rechten (3'-Ende) flankierenden Regionen des *pheU*- (C1zyc-4750PUr, 3171PUd-C2dac) und *pheV*-Locus (U2left*pheV*-L520left*pheV*, MRV6671L-MRV6063U) detektieren. Mit der DNS-Sonde (ECW1-ECW2) zum Nachweis des „attaching and effacing“-Gens (*eae*) sollte die Existenz eines LEE nachgewiesen werden, da dieses Gen ausschließlich im LEE lokalisiert ist. Hybridisierungs-Signale eines DNS-Fragments, welche in der Chemilumineszenz-Reaktion sowohl mit der *eae*-Sonde als auch mit einer der tRNS-Sonden auf demselben DNS-Fragment entstanden, zeigten, dass die LEE-PAI und entsprechende tRNS-Region auf demselben DNS-Fragment lokalisiert sind und sollten somit eine Aussage über den LEE-Insertionsort zulassen (Abb. 8).

4.1.3.1 Bestimmung des LEE-Insertionsortes humaner *Escherichia coli*-Stämme

Mit Ausnahme des DEC-Stammes 2966-56, der die LEE-PAI zu verloren haben schien, reagierte mit der *eae*-Sonde jeweils ein DNS-Fragment bei 15 der 16 DEC-Klone. Von den 15 Intimin-positiven DEC-Klonen hybridisierte das Intimin-Fragment bei 7 Stämmen auch mit der *pheU*-Sonde, die für die linke *pheU* flankierende Region spezifisch ist. Dieses DNS-Fragment reagierte ebenso bei 6 der 7 Stämme mit der für die rechte flankierende Region spezifischen *pheU*-Sonde. Mit der für die linke flankierende Region spezifischen *pheV*-Sonde reagierte das Intimin-Fragment bei 9 der 15 Stämme, dahingegen das Intimin-Fragment von diesen 9 Stämmen nur 3 Stämme mit der für die rechte flankierende Region spezifischen *pheV*-Sonde hybridisierte. Jeweils verschiedene DNS-Fragmente des Stammes 3942-67 reagierten mit den einzelnen DNS-Sonden, so dass sich ein LEE-Insertionsort innerhalb des *pheU*- oder *pheV*-tRNS-Locus nicht bestimmen ließ.



Die DNS-Präparationen der humanen DEC-Stämme sind in den Spuren 2 bis 5 aufgetragen. In der Spur 1 ist der *E. coli* K12-Stamm MG1655 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (M), E335021 (2), 3030A-86 (3), C130-53 (4), 2262-79 (5); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 8 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS von humanen DEC-Stämmen sowie korrespondierendes Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde und den *pheV*- und *pheU*-spezifischen DNS-Sonden für die linken *pheV/U* flankierenden Regionen

In Tab. 17 sind die Ergebnisse der Hybridisierungen mit den spezifischen DNS-Sonden von 16 humanen *E. coli*-Stämmen aufgelistet. Das Zeichen „+“ steht für ein positives Hybridisierungssignal eines Makrorestriktions-Fragments mit den eingesetzten DNS-Sonden, das Zeichen „-“ steht für ein fehlendes Hybridisierungssignal eines Makrorestriktions-Fragments.

Tab. 17 Ergebnis der Untersuchung von 16 humanen *Escherichia coli*-Stämmen zur Bestimmung der Lokalisation der LEE-PAI auf Makrorestriktions-Fragmenten mittels DNS-DNS-Hybridisierung

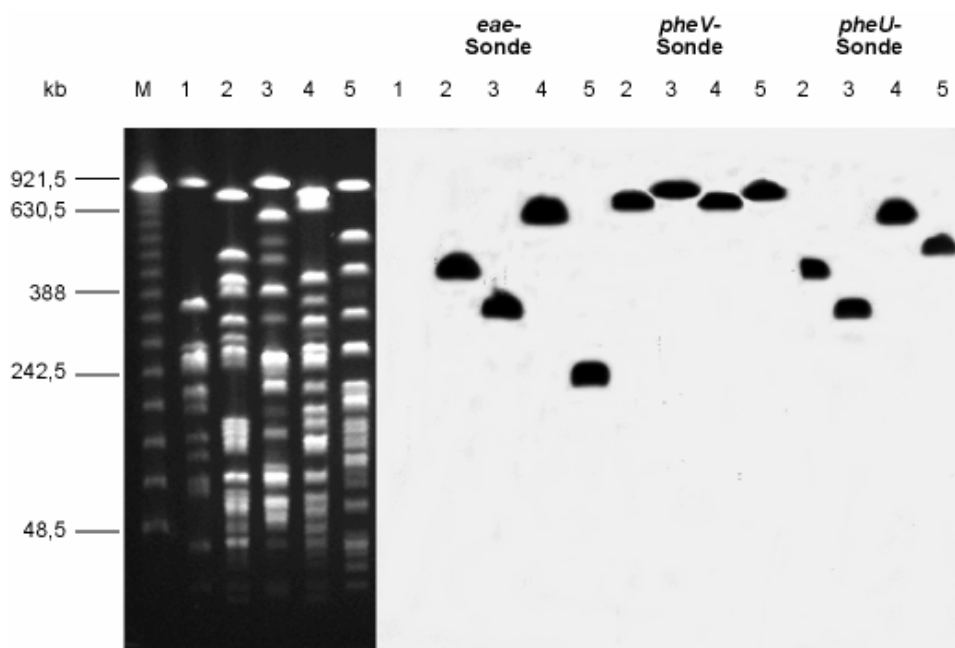
Stamm	Serovar	<i>eae</i> -Sonde	<i>pheU</i> -Sonde		<i>pheV</i> -Sonde		LEE-Insertionsort
		ECW1-ECW2	C1zyc-4750P _{Ur}	3171Pud-C2 _{dac}	U2left <i>pheV</i> -L520left <i>pheV</i>	MRV6671L-MRV6063U	
2198-77	O111:NM	+	+	-	+	+	<i>pheV</i>
3030A-86	O111:H8	+	+	-	+	+	<i>pheV</i>
C130-53	O111:H11	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
2262-79	O26:NM	+	+	-	+	+	<i>pheU</i>
C240-52	O26:NM	+	+	+	+	+	<i>pheU</i>
45	O26:H11	+	+	+	+	+	<i>pheU</i>
900105	O26:H11	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
2254-75	O128:H2	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
A9619-c2	O45:H2	+	+	+	+	-	<i>pheV</i>
E335021	O128:H2	+	+	+	+	-	<i>pheV</i>
2966-56	O111:H2	-	+	+	+	+	kein LEE
3942-67	O111:H2	+	+	-	+	-	unbekannt
9101-83	O111:H2	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
3291-86	O111:NM	+	+	+	+	-	<i>pheV</i>
42	O111ab:H25	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
173	O111ab:H25	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>

Nach Durchführung der DNS-DNS-Hybridisierungen ließ sich zusammenfassend sagen, dass alle Intimin-positiven DEC-Klone eine LEE-PAI nur innerhalb eines tRNS-Locus besaßen. Die Stämme der Serovar O111ab:H25 sowie die EPEC-Stämme der DEC-Klone 11 und 12 besaßen einen LEE innerhalb des tRNS-Locus *pheV*. Die Stämme der DEC 8-Klone wiesen ebenfalls eine LEE-PAI innerhalb des *pheV*-tRNS-Locus auf, dahingegen die LEE-PAI der DEC 9- und DEC 10-Klone innerhalb des *pheU*-tRNS-Locus inseriert war.

4.1.3.2 Bestimmung des LEE-Insertionsortes boviner *Escherichia coli*-Stämme

Wie beispielhaft in Abb. 9 dargestellt, ergab die Untersuchung der bovinen EHEC-Stämme, dass mit der *eae*-Sonde jeweils ein DNS-Fragment der 25 bovinen *E. coli*-Stämme reagierte. Von diesen 25 Intimin-positiven EHEC-Stämmen reagierte das Intimin-Fragment von 16

Stämmen mit der für die linke *pheU* flankierenden Region spezifischen DNS-Sonde. Von diesen 16 Stämmen hybridisierte das Intimin-Fragment von 12 Stämmen gleichfalls mit der für die rechte flankierende Region spezifischen *pheU*-Sonde. Das Intimin-Fragment von 7 der 25 EHEC-Stämme reagierte mit der für die linke flankierende Region spezifischen *pheV*-Sonde. Von diesen 7 Stämmen hybridisierte das Intimin-Fragment bei 6 Stämmen auch mit der für die rechte flankierende Region spezifischen *pheV*-Sonde. Jeweils verschiedene DNS-Fragmente der EHEC-Stämme IHIT 0304 und IHIT 0608 reagierten mit den einzelnen DNS-Sonden, so dass sich ein LEE-Insertionsort innerhalb des *pheU*- oder *pheV*-trNS-Locus nicht zuordnen ließ.



Die DNS-Präparationen der bovinen EHEC-Stämme sind in den Spuren 2 bis 5 aufgetragen. In der Spur 1 ist der *E. coli* K12-Stamm MG1655 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (M), 303/89 (2), IHIT 0554 (3), IHIT 0578 (4), IHIT 0608 (5); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 9 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS von bovinen EHEC-Stämmen sowie korrespondierendes Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde und den *pheV*- und *pheU*-spezifischen DNS-Sonden für die linken *pheV/U* flankierenden Regionen

Tab. 18 zeigt die Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierungen der bovinen EHEC-Stämme. Das Zeichen „+“ steht für ein positives Hybridisierungs-Signal eines Makrorestriktions-Fragments mit den eingesetzten DNS-Sonden, das Zeichen „-“ steht für ein fehlendes Hybridisierungs-Signal eines Makrorestriktions-Fragments.

Tab. 18 Ergebnis der Untersuchung von 25 bovinen EHEC-Stämmen zur Bestimmung der Lokalisation der LEE-PAI auf Makrorestriktions-Fragmenten mittels DNS-DNS-Hybridisierung

Stamm	Serovar	<i>eae</i> -Sonde	<i>pheU</i> -Sonde		<i>pheV</i> -Sonde		LEE-Insertionsort
		ECW1-ECW2	C1zyc-4750Pur	3171Pud-C2dac	U2left <i>pheV</i> -L520left <i>pheV</i>	MRV6671L-MRV6063U	
IHIT 0084	On.t.:Hn.t.	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
303/89	O153:Hn.t.	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
IHIT 5671	O145:Hn.t.	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
72/90-56	O5:NM	+	+	+	+	+	<i>pheU</i>
IHIT 2087	O26:H11	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
RW1911	O118:H16	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
RW2297	O118:H16	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
IHIT 3641	O17,77:H18	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
IHIT 2169	On.t.:H11	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
IHIT 0578	O15:H11	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
IHIT 0304	O145:H28	+	+	+	+	-	unbekannt
IHIT 0608	On.t.:Hn.t.	+	+	+	+	+	unbekannt
IHIT 0067	O84:NM	+	+	+	+	-	<i>pheV</i>
IHIT 3000	O150:NM	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
IHIT 3669	O84:H2	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
IHIT 1190	O92:NM	+	+	-	+	+	<i>pheV</i>
IHIT 1968	O119:H25	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
IHIT 0554	On.t.:NM	+	+	-	+	+	<i>pheU</i>
IHIT 2430	O80:NM	+	+	-	+	+	<i>pheU</i>
IHIT 2115	O4:NM	+	+	-	+	+	<i>pheU</i>
RW1372	O103:H2	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
IHIT 0597	O157:NM	+	+	-	+	+	<i>pheU</i>
IHIT 0072	O157:H7	+	+	+	+	-	<i>pheU</i>
RW1374	O103:H2	+	+	+	+	+	<i>pheV</i>
413/89-1	O26:H-	+	+	+	+	+	<i>pheU</i>

Zusammenfassend wurde ermittelt, dass von den 25 untersuchten bovinen EHEC-Stämmen die LEE-PAI bei 16 Stämmen innerhalb des tRNS-Locus *pheU* inseriert war. Sieben Stämme besaßen eine LEE-PAI innerhalb des *pheV*-tRNS-Locus. Mittels DNS-DNS-Hybridisierung konnte bei 2 Stämmen der LEE-Insertionsort nicht bestimmt werden. Alle LEE-positiven EHEC-Stämme besaßen eine LEE-PAI innerhalb nur eines tRNS-Locus.

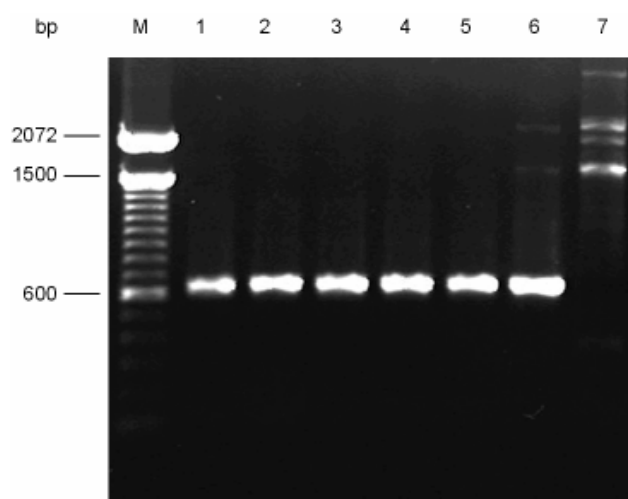
4.1.4 Bestimmung des Insertionsortes der LEE-Pathogenitätsinsel bei *Citrobacter rodentium*- und *Escherichia alvei*-Stämmen

Da über einen chromosomalen Insertionsort des LEE bei AE-positiven *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämmen bisher keine Aussagen vorliegen, war es interessant, diesen bei 7 ausgewählten *C. rodentium*- und 5 *E. alvei*-Stämmen zu ermitteln.

Der LEE-Insertionsort sollte mittels Polymerase-Kettenreaktion und DNS-DNS-Hybridisierung bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden dieselben Primerpaare und DNS-Sonden verwendet, mit denen zuvor die *E. coli*-Stämme hinsichtlich der Bestimmung des LEE-Insertionsortes untersucht wurden.

4.1.4.1 Nachweis des *Escherichia coli* „attaching and effacing“-Gens (*eae*) bei *Citrobacter rodentium*- und *Escherichia alvei*-Stämmen

Unter Verwendung des Primerpaares ECW1-ECW2 wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion bei den *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämmen auf das Vorhandensein des innerhalb des LEE lokalisierten „attaching and effacing“-Gens (*eae*) untersucht. Die entstandenen PCR-Amplifikate wiesen eine Größe von 629 bp auf. Als Positivkontrolle diente der STEC-Stamm RW1374, als Negativkontrolle der *E. coli* K12-Stamm MG1655 (Abb. 10).



Ergebnisse der ECW1-ECW2-PCR (629 bp)
100-bp-ladder (M), 10457 (1), 10790 (2), 12502 (3), 19982 (4), 9194 (5), RW1374 (6), MG1655 (7); (0,7 %iges Agarosegel, 90 V, 90 min).

Abb. 10 Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des Intimin-Gens (*eae*) bei *Escherichia alvei*-Stämmen

Alle 12 untersuchten Stämme verfügten über das für die Ausbildung von AE-Läsionen verantwortliche *eae*-Gen.

4.1.4.2 Bestimmung des LEE-Insertionsortes mittels Polymerase-Kettenreaktion

Eine Bestimmung des LEE-Insertionsortes innerhalb der tRNS-Loci *pheU*, *pheV* und *selC* bei den *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämmen sollte mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgen, wozu die Primerpaare verwendet wurden, die einen intakten tRNS-Locus nachweisen, sowie einen durch die Insertion einer LEE-PAI zerstörten tRNS-Locus (s. Punkt 4.1.1).

Aufgrund fehlender PCR-Produkte nach Durchführung der Polymerase-Kettenreaktionen konnte der Insertionsort einer LEE-PAI innerhalb der untersuchten tRNS-Loci bei keinem der *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämme nachgewiesen werden.

4.1.4.3 Makrorestriktions-Analyse der *Citrobacter rodentium*- und *Escherichia alvei*-Stämme

Die genomische DNS von 7 *C. rodentium*- und 5 *E. alvei*-Stämmen wurde mit der selten schneidenden Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut und in der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) untersucht.

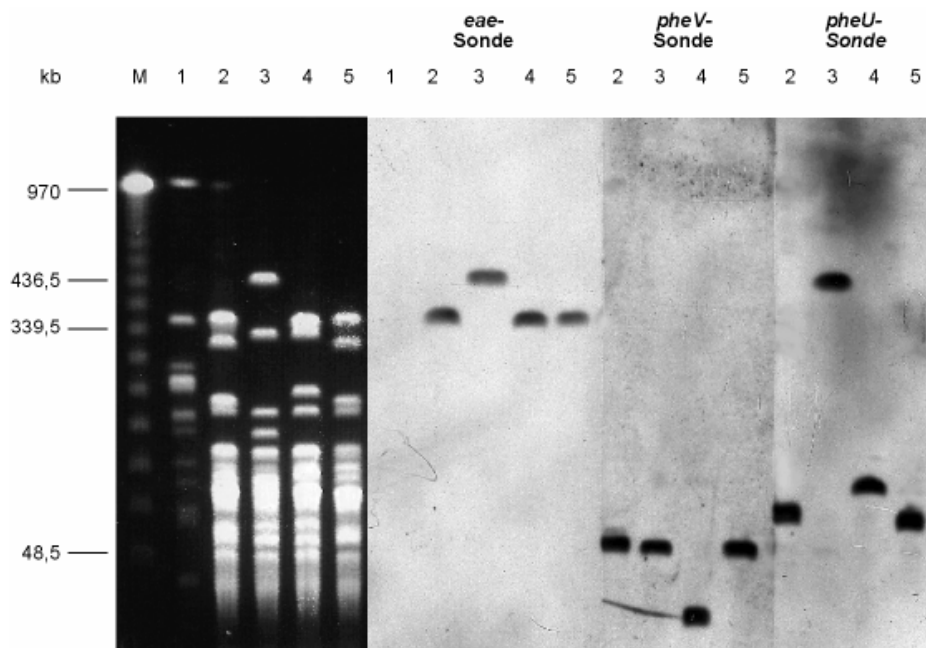
Die Makrorestriktions-Analyse der *C. rodentium*-Stämme ergab ein sehr homogenes *NotI*-Restriktionsmuster in einem Fragmentbereich zwischen 50 und 200 kb. Oberhalb von 200 kb waren geringe Unterschiede im Restriktionsmuster der verschiedenen Stämme ersichtlich, v.a. aber bei dem Stamm DBS125. Pro Stamm wurde die Gesamt-DNS in 12 bis 15 DNS-Banden fragmentiert (Abb. 11). Die Makrorestriktions-Analyse der *E. alvei*-Stämme resultierte in einem identischen *NotI*-Restriktionsmuster der Stämme 5976, 5978, 5980. Das Restriktionsmuster der Stämme 5977 und 5979 war von einer Fragmentgröße zwischen 50 und 300 kb ebenfalls mit dem der anderen Stämme identisch, unterschied sich jedoch geringfügig ab einer Fragmentgröße von 340 kb. Pro Stamm fragmentierte die Gesamt-DNS in 13 bis 16 Banden (Abb. 12).

4.1.4.4 Bestimmung des LEE-Insertionsortes mittels DNS-DNS-Hybridisierung

Mit Hilfe spezifischer DNS-Sonden (s. Punkt 4.1.3) sollte in Hybridisierungs-Reaktionen der Insertionsort einer LEE-PAI ermittelt werden. Für diesen Zweck wurde *NotI*-restringierte

Gesamt-DNS der *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämme, die in der CHEF-PFGE aufgetrennt und auf eine positive Nylonmembran übertragen wurde, verwendet.

Bei allen 7 *C. rodentium*-Stämmen hybridisierte jeweils ein DNS-Fragment mit der *eae*-Sonde, was auf die Existenz des LEE schließen ließ. Bei dem Stamm DBS125 reagierte ein 440 kb großes DNS-Fragment mit der *eae*-Sonde. Bei den anderen 6 Stämmen hybridisierte dahingegen jeweils ein 350 kb großes DNS-Fragment mit dieser Sonde. Um nun den LEE-Insertionsort zu bestimmen, erfolgten weitere Hybridisierungen mit DNS-Sonden für die flankierenden Bereiche des *pheU*- und *pheV*-Locus. Bei allen Stämme hybridisierte jeweils ein DNS-Fragment unterschiedlicher Größe mit den Sonden für die linke flankierende Region des *pheU*- und *pheV*-Locus. Nur bei dem Stamm DBS125 hybridisierte das 440 kb große DNS-Fragment mit der Sonde für die linke flankierende Region des *pheU*-Locus, welches zuvor schon mit der *eae*-Sonde reagierte. In der DNS-DNS-Hybridisierung gegen die rechte *pheU/V* flankierende Region blieben jegliche Hybridisierungs-Signale bei allen Stämmen aus.

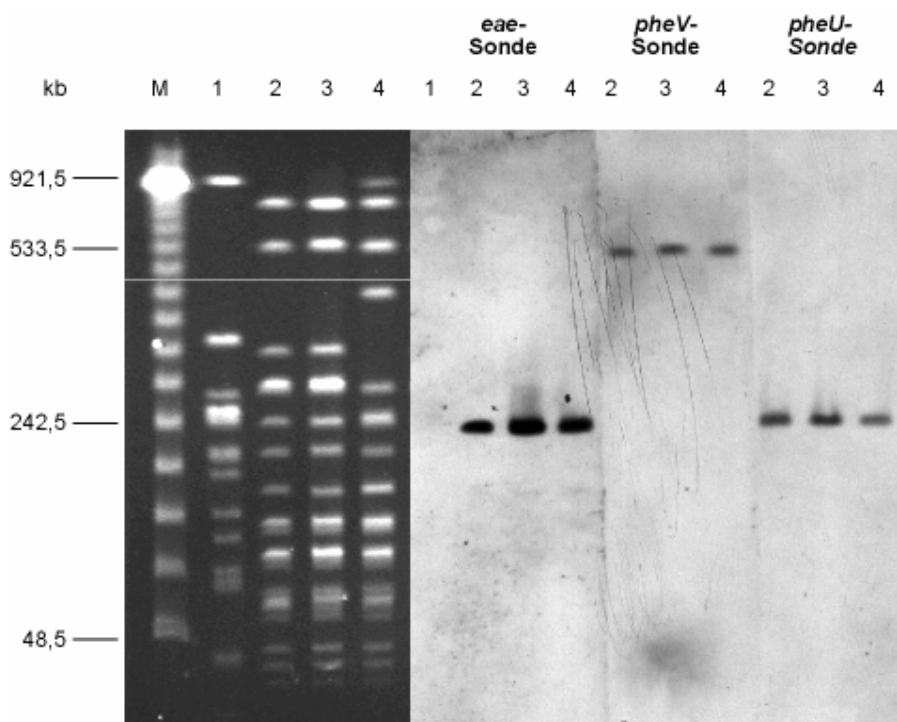


Die DNS-Präparationen der *C. rodentium*-Stämme sind in den Spuren 2 bis 5 aufgetragen. In der Spur 1 ist der *E. coli* K12-Stamm MG1655 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (M), DBS100 (2), DBS125 (3), DBS126 (4), CDC1843-73^T (5); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 11 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS von *Citrobacter rodentium*-Stämmen sowie korrespondierendes Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde und den *pheV*- und *pheU*-spezifischen DNS-Sonden für die linken *pheV/U* flankierenden Regionen

In Abb. 11 ist die CHEF-PFGE und korrespondierende DNS-DNS-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde und den für die linke *pheU/V* flankierende Region spezifischen DNS-Sonden von 4 *C. rodentium*-Stämmen dargestellt.

Bei der Hybridisierung der *E. alvei*-Stämme (Abb. 12) reagierte bei allen Stämmen jeweils ein 250 kb großes DNS-Fragment mit der *eae*-Sonde. Auch nur dieses Fragment hybridisierte bei allen Stämmen mit der DNS-Sonde für die linke flankierende Region des *pheU*-Locus. Ein 550 kb großes DNS-Fragment reagierte jeweils mit den DNS-Sonden sowohl für die linke als auch für die rechte flankierende Region des *pheV*-Locus. Mit der Sonde für die rechte flankierende Region des *pheU*-Locus hybridisierte hingegen bei allen Stämmen ein etwa 70 kb großes DNS-Fragment.



Die DNS-Präparationen der *E. alvei*-Stämme sind in den Spuren 2 bis 4 aufgetragen. In der Spur 1 ist der *E. coli* K12-Stamm MG1655 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (M), 10457 (2), 10790 (3), 12502 (4); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 12 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS von *Escherichia alvei*-Stämmen sowie korrespondierendes Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde und den *pheU*- und *pheV*-spezifischen DNS-Sonden für die linken *pheV/U* flankierenden Regionen

4.2 Markierung und Mutagenisierung der LEE-PAI

4.2.1 Mutagenisierung des Intimin-Gens und Mobilisierung des LEE bei dem bovinen EHEC-Stamm RW1374

Das Prinzip der Mutagenisierung des Intimin-Gens (*eae*) diente dazu, die LEE-PAI des Stammes RW1374 zu markieren und die Mobilität des LEE_{RW1374} in einem Konjugations-Experiment zu untersuchen. Die Konjugation ist infolge eines Zellkontaktes mit einem horizontalem DNS-Transfer verbunden, wobei der LEE_{RW1374} in *E. coli* K12-Stämme übertragen werden sollte. Des weiteren sollte der mutagenisierte Stamm funktionellen Untersuchungen dienen. Laut Literaturdaten sollte die *eae*-Mutante die Fähigkeit verlieren, eine vollständige AE-Läsion auszulösen (133, 35). In einem Zellkulturtest sollte diese Eigenschaft überprüft werden.

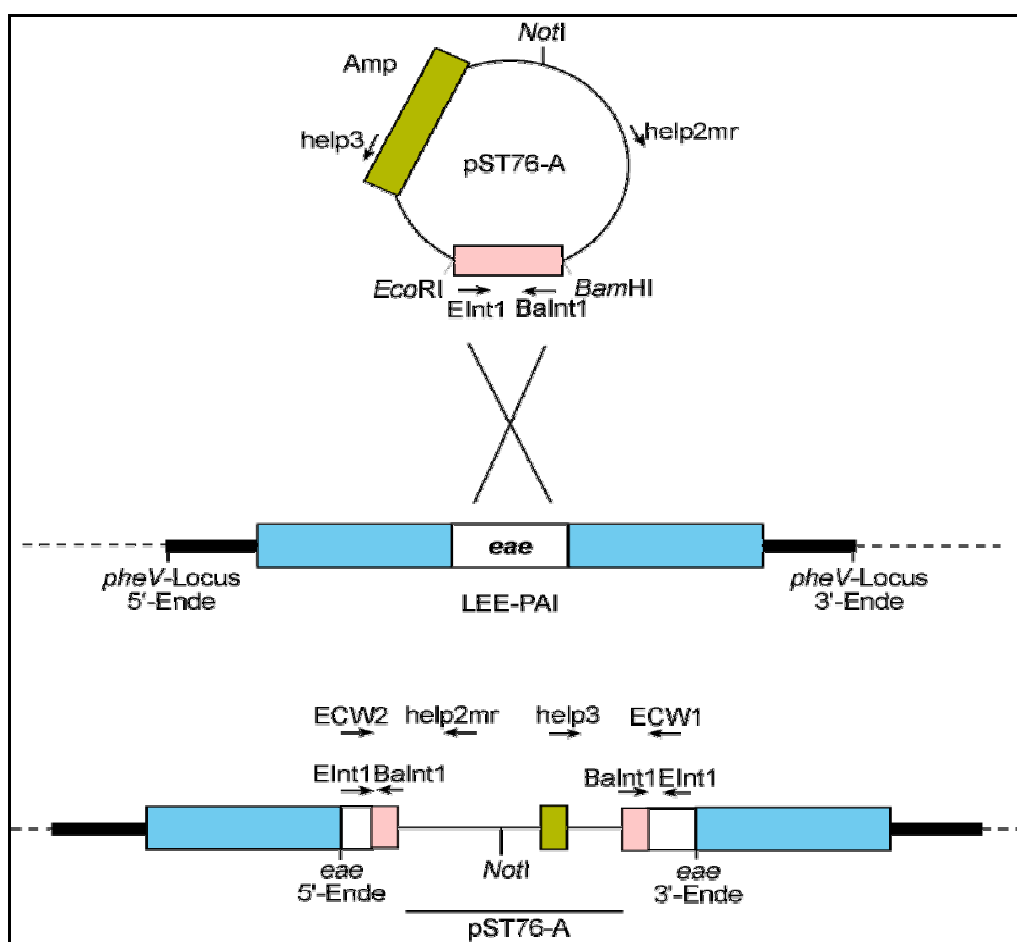
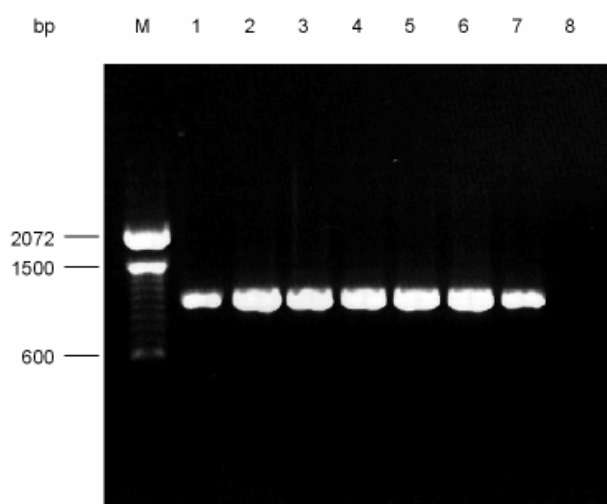


Abb. 13 Schematische Darstellung des Insertionsvektors pST76-A und der Integration in das Intimin-Gen (*eae*) des bovinen EHEC-Stammes RW1374

Die Markierung des Intimin-Gens mit einer Ampizillin-Resistenz erfolgte bei dem Stamm RW1374 nach dem von Pósfai et al. (1997) publizierten experimentellen System und ist schematisch in Abb. 13 dargestellt (114). Es ermöglicht die Insertion von Suizid-Plasmiden ins Genom des ausgewählten Stammes über eine homologe Rekombination. Zum Zwecke der Markierung sollten DNS-Bereiche innerhalb des konservierten Endes des *eae*-Gens (5'-Ende) in den Insertionsvektor pST76-A kloniert werden, damit dieser anschließend durch homologe Rekombination in den *eae*-Bereich innerhalb des LEE_{RW1374} integriert.

Es wurden Primer zur Amplifikation der homologen Sequenz aus der Sequenz des *eae*-Gens abgeleitet (EIntI-BaIntI). Die verwendeten Primer wurden so entwickelt, dass sie bereits eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *Eco*RI (EInt1) und *Bam*HI (BaInt1) enthielten. Die homologe Sequenz des *eae*-Gens wurde durch PCR-Reaktionen mit genomischer DNS des Stammes RW1374 amplifiziert. Das *Bam*HI/*Eco*RI-restringierte PCR-Produkt wurde in den ebenso *Bam*HI/*Eco*RI-geöffneten Insertionsvektor pST76-A ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Das isolierte rekombinante Plasmid pST76-A_{EInt1-BaInt1} wurde anschließend in den Empfängerstamm RW1374 elektroporiert. Die Integration der rekombinanten Plasmid-DNS ins Chromosom von RW1374 wurde durch eine homologe Rekombination erreicht. Die Plasmid-Replikation wurde durch eine Erhöhung der Temperatur auf 42 °C unterdrückt. PCR-Reaktionen bestätigten die Integration des Plasmids pST76-A innerhalb des *eae*-Gens von RW1374 (Abb. 14).



Ergebnisse der **ECW2-help2mr**-PCR (1051 bp)
100-bp-ladder (M), 7 Klone von RW1374::*eaep*SP76-A (1 bis 7), RW1374 (8);
(0,7 %iges Agarosegel, 90 V, 90 min).

Abb. 14 Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis der Markierung des Intimin-Gens (*eae*) von RW1374

Zur Durchführung des Konjugations-Experiments wurde der mutagenisierte Stamm RW1374::*eaep*ST76-A als Spenderstamm (Donor) eingesetzt. Die *E. coli* K12-Stämme MG1655 und DH5 α dienten als Empfängerstämme (Rezipienten). Beide K12-Stämme tragen Resistenzgene für die Antibiotika Rifampizin und Nalidixinsäure. Das Ziel einer erfolgreich verlaufenen Konjugation des LEE_{RW1374} stellt das Erlangen einer Ampizillin-Resistenz zusätzlich zu den bereits vorhandenen Resistenzen bei den jeweiligen Empfängerstämmen dar. Es spricht dafür, dass der mit dem Plasmid pST76-A markierte LEE_{RW1374} in die Empfängerzellen übertragen wurde.

Nach Durchführung des Mobilisierungs-Versuchs konnten trotz einer Rate von 10⁹ Transkonjuganten per Donorzelle keine Transkonjuganten auf Amp-Rif-Nal-haltigen LB-Agarplatten selektioniert werden. Es wurde somit keine Mobilisierung des LEE_{RW1374} per Konjugation erreicht.

4.2.2 Einfügung von Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen in *pheV* flankierende Genbereiche des bovinen EHEC-Stammes RW1374

Die Einfügung der Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz für *NotI* ins Genom ausgewählter Stämme erfolgte ebenfalls mit der von Pósfai beschriebenen Methode und ist in Abb. 15 schematisch dargestellt. Es ermöglicht die Exzision großer DNS-Bereiche durch die Integration von Plasmid-Vektoren, die diese Erkennungssequenzen tragen.

Im Falle von RW1374 sollte die Methode angewendet werden, um die innerhalb *pheV* lokalisierte LEE-PAI *in toto* aus dem Genom mit Hilfe des Restriktionsenzym *NotI* herauszuschneiden und in *E. coli* K12-Stämme zu übertragen. Eine LEE-PAI-freie RW1374-Mutante könnte zukünftig funktionellen Untersuchungen hinsichtlich der Pathogenität dienen.

Um dieses Vorhaben zu verwirklichen, sollten zunächst etwa 1 kb große DNS-Bereiche aus den Flanken von *pheV* in Insertionsvektoren kloniert werden, damit diese anschließend durch homologe Rekombination in die genomische DNS um *pheV* inserieren. Die flankierenden Bereiche der LEE-PAI_{RW1374} sollten mittels Integration der Vektor-Paare pSG76-A/pST76-C bzw. pSG76-C/pST76-A markiert werden. Primer (MLV5018U-MLV5914L und MRV6090U-MRV6951L) zur Amplifikation der homologen Sequenzen wurden aus der Sequenz der *pheV*-Region von *E. coli* K12 MG1655 (GenBank: U00096) abgeleitet. Alle verwendeten Primer enthielten bereits eine *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle. Homologe

Sequenzen der *pheV*-Region wurden durch PCR-Reaktionen mit DNS des Stammes MG1655 amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und in die *Bam*HI/*Eco*RI-geöffneten Insertionsvektoren ligiert. Die rekombinanten Plasmide wurden anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert. Die stromaufwärts von *pheV* (MLV5018U-MLV5914L) lokalisierten PCR-Produkte wurden in pSG76-A und pSG76-C ligiert, die PCR-Produkte stromabwärts von *pheV* (MRV6090U-MRV6951L) in pST76-A und pST76-C.

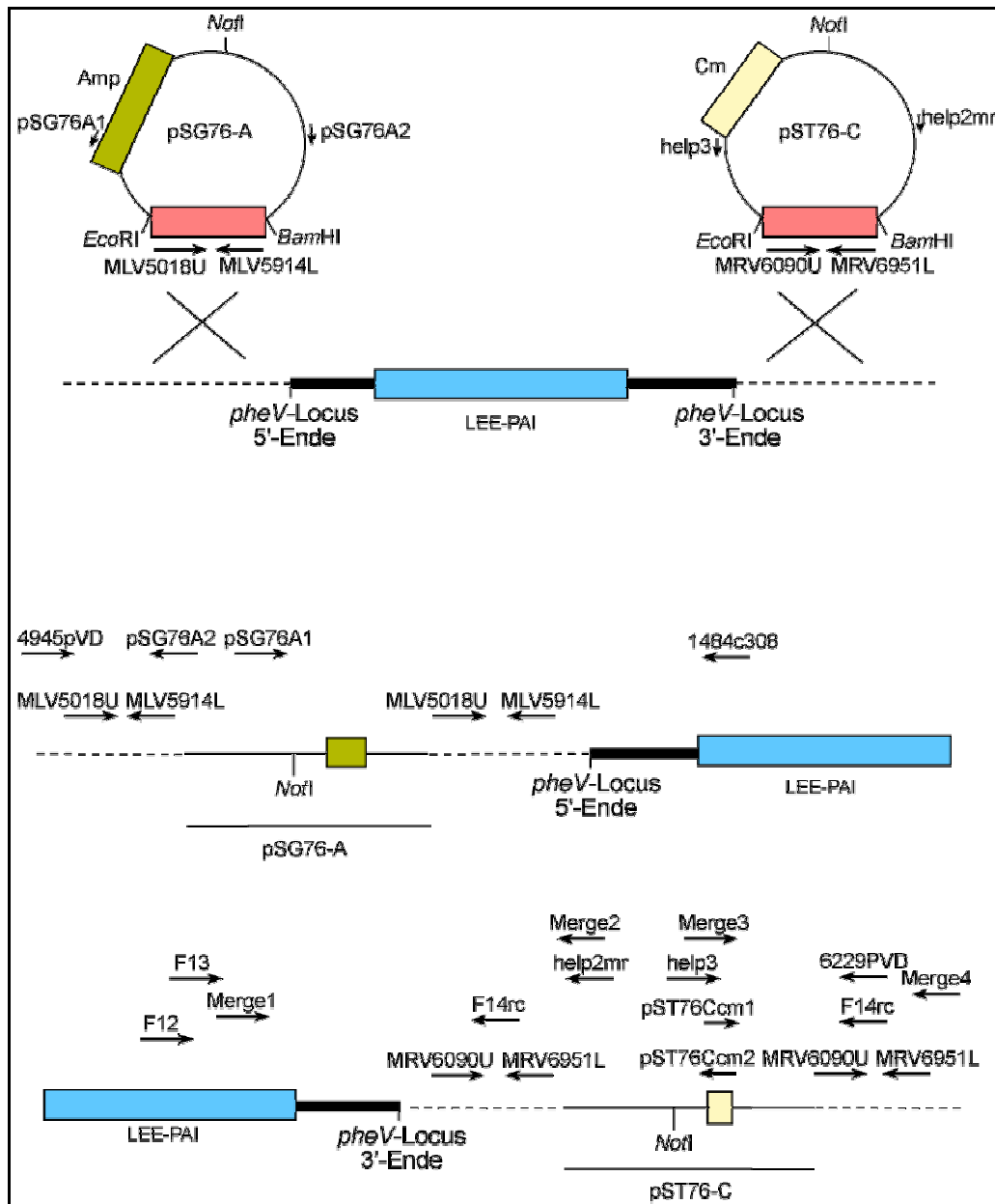
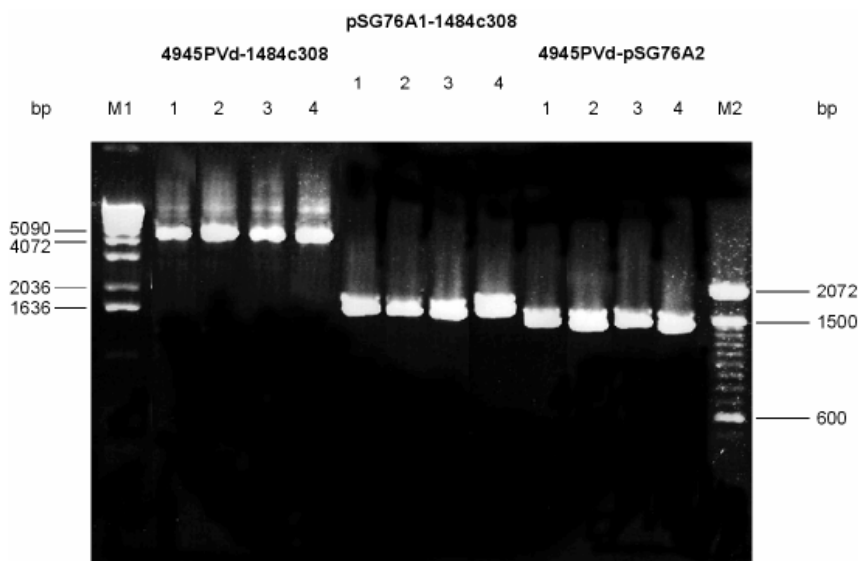


Abb. 15 Schematische Darstellung der Insertionsvektoren und Integration in die genomische DNS

Dank der Amplifikatpaare MLV5018U-MLV5914L und MRV6090U-MRV6951L war es möglich, die Vektoren pSG76-A und pST76-A ins Genom von RW1374 zu integrieren. Es

gelang jedoch nicht, beide *pheV* flankierenden Bereiche der LEE-PAI_{RW1374} mit jeweils einem Vektor aus beiden Plasmid-Gruppen zu markieren.

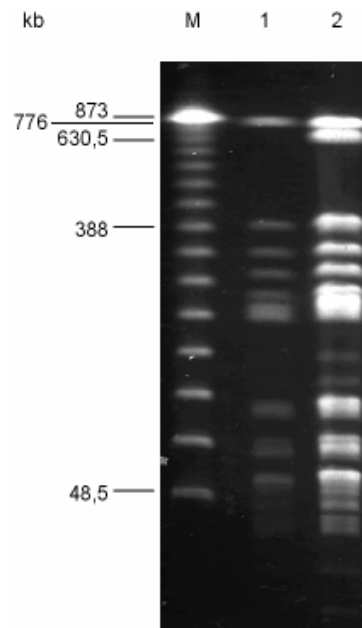
Das rekombinante Plasmid pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} sollte in die linke *pheV* flankierende Region durch homologe Rekombination integriert werden. Zu diesem Zweck wurde Plasmid-DNS isoliert und für die Elektroporation in RW1374 eingesetzt. Die Integration des Plasmids in die genomische DNS stromaufwärts von *pheV* wurde via PCR bestätigt (Abb. 16).



Ergebnisse der **4945PVd-1484c308**-PCR (4500 bp)
 4 Klone von RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} (**1 bis 4**)
 Ergebnisse der **pSG76A1-1484c308**-PCR (1600 bp)
 4 Klone von RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} (**1 bis 4**)
 Ergebnisse der **4945PVd-pSG76A2**-PCR (1400 bp)
 4 Klone von RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} (**1 bis 4**),
 1-kb-ladder (**M1**), 100-bp-ladder (**M2**); (0,7 %iges Agarosegel, 90 V, 90 min).

Abb. 16 Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis der Markierung der linken *pheV* flankierenden Region von RW1374

Weiterhin wurde die Markierung der linken *pheV* flankierenden Region der LEE-PAI_{RW1374} mit Hilfe einer Makrorestriktions-Analyse nachgewiesen. Genomische DNS von RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* restringiert und in der CHEF-PFGE aufgetrennt. Zusätzlich zu einer etwa 800 kb großen Bande wurde bei diesem Stamm eine zweite, ca. 700 kb große Bande beobachtet, wodurch er sich vom unmarkierten Wildtyp-Stamm RW1374 unterschied. Abb. 17 veranschaulicht das Ergebnis der CHEF-PFGE.



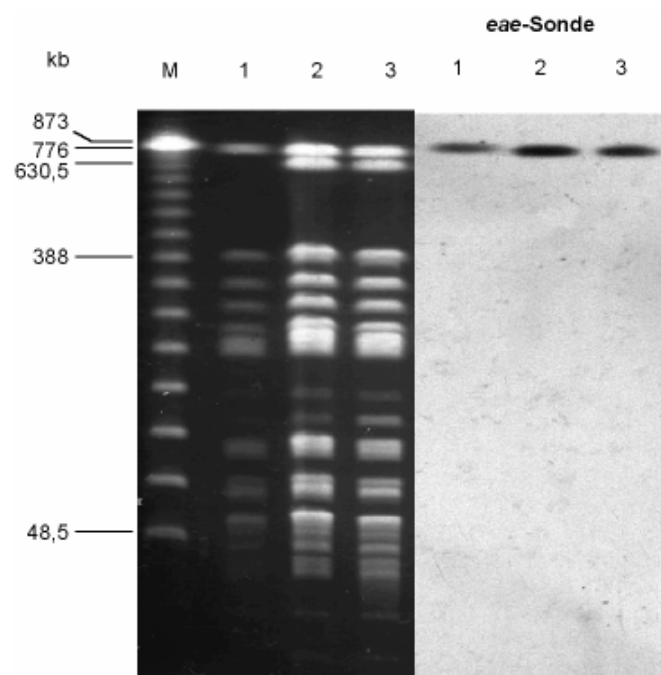
Die DNS-Präparationen des unmarkierten und markierten EHEC-Stammes RW1374 sind in den Spuren 1 und 2 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (M), RW1374 (1), RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$ (2); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 17 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS des unmarkierten RW1374 und des markierten RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$

Um die rechte *pheV* flankierende Region der LEE-PAI_{RW1374::pSG76-A} mit der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NotI* zu markieren, wurde der rekombinante Suizid-Vektor pST76- $C_{MRV6090U-MRV6951L}$ in elektrokompetente Zellen des Stammes RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$ transformiert. Mittels PCR-Reaktionen wurde eine Integration von pST76-C bei vermutlichen Rekombinanten getestet. Bei keinem dieser Klone ließ sich eine Integration von pST76-C in die rechte *pheV* flankierende Region von RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$ nachweisen.

Ein weiteres Mittel zur Identifizierung einer beidseitigen Markierung der LEE-PAI_{RW1374} durch Exzision dieses DNS-Fragmentes sollte die Hybridisierung mit spezifischen DNS-Sonden darstellen. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-DNS vermutlicher Rekombinanten von RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$, pST76- $C_{MRV6090U-MRV6951L}$ zunächst der *NotI*-Makrorestriktions-Analyse unterzogen und in der CHEF-PFGE aufgetrennt. Das Restriktionsmuster unterschied sich rein optisch nicht von dem *NotI*-Restriktionsmuster des Stammes RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$. Eine anschließende DNS-DNS-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde ergab, dass in der Chemilumineszenz-Reaktion bei dem

Wildtyp-Stamm ein ca. 900 kb großes DNS-Fragment und bei den Stämmen RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} und RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L},pST76-C_{MRV6090U-MRV6951L} jeweils das ca. 800 kb große DNS-Fragment hybridisierte (Abb. 18). Es handelte sich aber in allen 3 Fällen um dasselbe große LEE enthaltende DNS-Fragment, wie in zuvor durchgeführten Untersuchungen ermittelt wurde (69). Hätte nach Durchführung der Makrorestriktions-Analyse eine Isolierung der beidseitig markierten LEE-PAI stattgefunden, so hätte mit der *eae*-Sonde nur eine etwa 120 kb große DNS-Bande hybridisieren sollen. Die Hybridisierung mit der *eae*-Sonde bestätigte somit, dass die beidseitige Einfügung von *NotI*-Erkennungssequenzen in die LEE-PAI flankierenden Bereiche nicht erreicht wurde.



Die *NotI*-verdaute, in der CHEF-PFGE aufgetrennte und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragene genomische DNS des unmarkierten und markierten Stammes RW1374 ist in den Spuren 1 bis 3 aufgetragen. RW1374 (1), RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} (2), RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L},pST76-C_{MRV6090U-MRV6951L} (3).

Abb. 18 Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung des unmarkierten Stammes RW1374 und der markierten Stämme von RW1374 mit der *eae*-Sonde

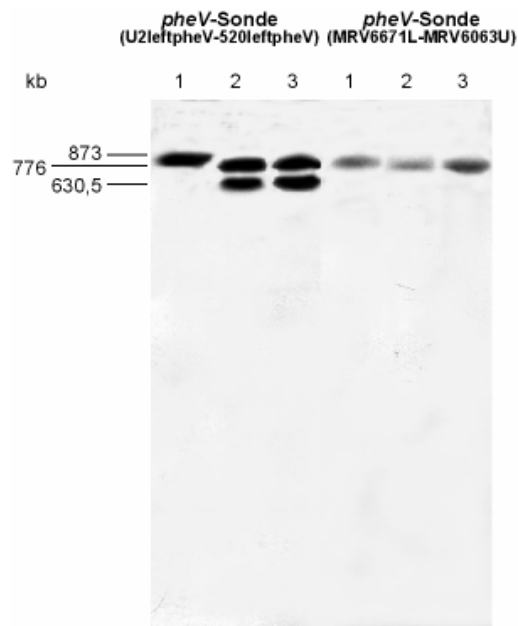
Eine DNS-DNS-Hybridisierung mit der DNS-Sonde (pST76Ccm1-pST76Ccm2) für das Chloramphenicol-Gen sollte dennoch die Integration von pST76-C bestätigen. Die Nylonmembran mit den o.g. Stämmen wurde von der *eae*-Sonde entfernt und mit der Cm-Sonde hybridisiert. Eine ca. 4 kb große Bande erbrachte in der Chemilumineszenz-Reaktion ein positives Hybridisierungssignal und ist in Abb. 19 dargestellt.



Die *NotI*-verdaute, in der CHEF-PFGE aufgetrennte und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragene genomische DNS des unmarkierten und markierten Stammes RW1374 ist in den Spuren 1 bis 3 aufgetragen. RW1374 (1), RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$ (2), RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$,pST76- $C_{MRV6090U-MRV6951L}$ (3).

Abb. 19 Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung des unmarkierten RW1374 und der markierten Stämme von RW1374 mit der Cm-Sonde

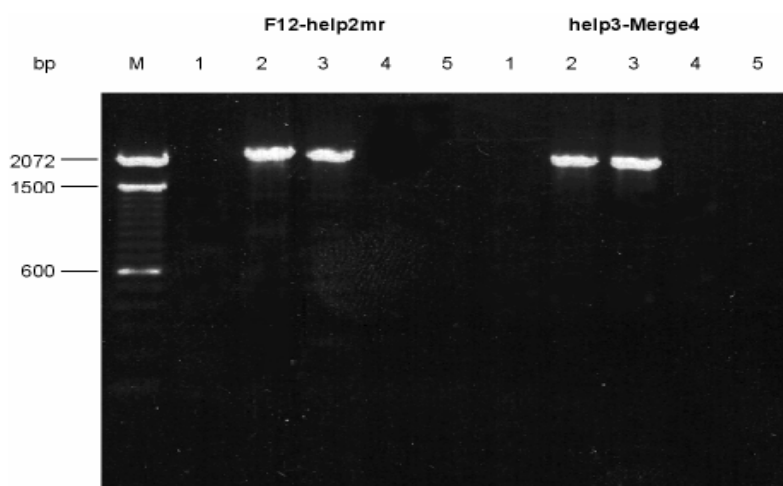
Es wurde erneut eine *NotI*-Makrorestriktions-Analyse des Stammes RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$,pST76- $C_{MRV6090U-MRV6951L}$ durchgeführt, um sie für Hybridisierungen mit den DNS-Sonden für die linke und rechte *pheV* flankierende Region einzusetzen. Mit der linken *pheV* flankierenden DNS-Sonde (U2left*pheV*-520left*pheV*) reagierten die 900 kb große DNS-Bande bei dem Wildtyp-Stamm und die 800 kb und 700 kb große Bande bei den markierten Stämmen. Mit der rechten *pheV* flankierenden DNS-Sonde (MRV6671L-MRV6063U) reagierte jedoch nur das 900 kb bzw. 800 kb große DNS-Fragment. Diese Ergebnisse veranschaulicht Abb. 20 und bestätigten, dass nur die Markierung der linken *pheV* flankierenden Region durchgeführt werden konnte.



Die *NotI*-verdaute, in der CHEF-PFGE aufgetrennte und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragene genomische DNS des unmarkierten und markierten Stammes RW1374 ist in den Spuren 1 bis 3 aufgetragen. RW1374 (1), RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} (2), RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L},pST76-C_{MRV6090U-MRV6951L} (3).

Abb. 20 **Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung des unmarkierten RW1374 und der markierten Stämme von RW1374 mit der spezifischen *pheV*-Sonde für die linke und rechte *pheV* flankierende Region**

Aufgrund der erfolglos verlaufenen Versuche, die LEE-PAI_{RW1374} stromaufwärts von *pheV* durch die Integration von pSG76-A und stromabwärts von *pheV* durch die Integration von pST76-C zu markieren, sollte nun versucht werden, die Plasmide pSG76-C und pST76-A zu inserieren. Dazu wurde zunächst der Suizid-Vektor pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} in elektrokompente Zellen von RW1374 transformiert. Mittels PCR konnte die Integration von pST76-A in die rechte *pheV* flankierende Region bei einem Klon nachgewiesen werden (Abb. 21). Das rekombinante Plasmid pSG76-C_{MLV5018U-MLV5914L} wurde nun in RW1374::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} transformiert. Alle bei 37 °C selektionierten Rekombinanten wiesen mit Hilfe von PCR-Reaktionen keine Integration des Plasmids pSG76-C innerhalb der linken *pheV* flankierenden Region auf.



Ergebnisse der **F12-help2mr**-PCR (2100 bp)
 (linke Bildhälfte): 100-bp-ladder (**M**), 2 Klone von RW1374::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} (**1** und **2**), 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} (**3**), RW1374 (**4**), A. bidest. (**5**)
 Ergebnisse der **help3-Merge4**-PCR (2061 bp)
 (rechte Bildhälfte): 2 Klone von RW1374::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} (**1** und **2**), 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} (**3**), RW1374 (**4**), A. bidest. (**5**); (0,7 %iges Agarosegel, 90 V, 90 min).

Abb. 21 **Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis der Markierung der rechten *pheV* flankierenden Region von RW1374**

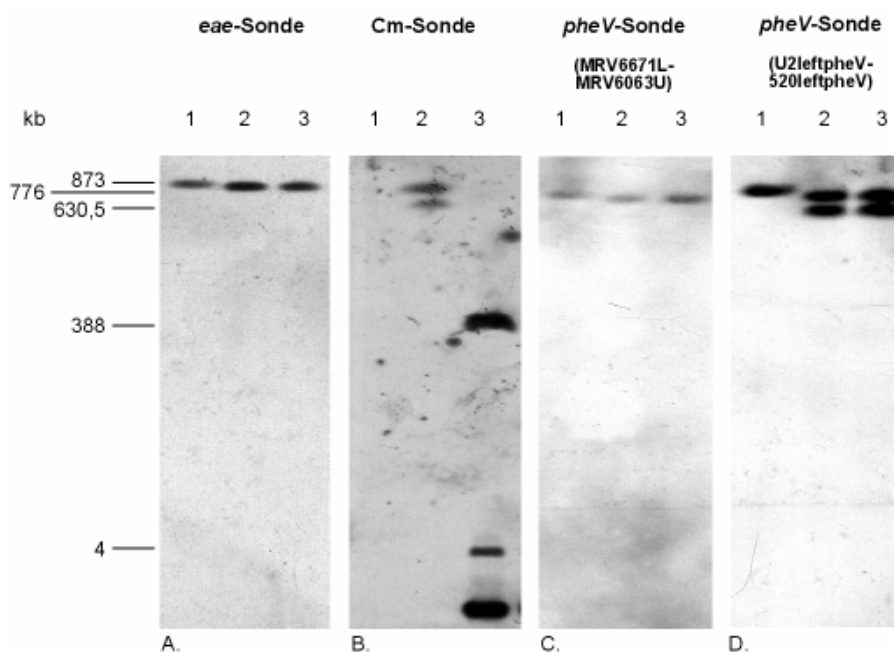
Es sollte nun der zuvor mutagenisierte Stamm RW1374::*eaep*ST76-A durch Integration des Plasmids pSG76-C in die linke *pheV* flankierende Region markiert werden, um einen Teil der LEE-PAI_{RW1374} aus dem Genom mit der Restriktionsendonuklease *NotI* herauszuschneiden. Zu diesem Zweck wurde das rekombinante Plasmid pSG76-C_{MLV5018U-MLV5914L} in RW1374::*eaep*ST76-A elektroporiert. PCR-Reaktionen konnten bei keinem der selektionierten Klone eine Integration von pSG76-C in die linke *pheV* flankierende Region bestätigen.

Weiterhin sollte die Markierung der LEE-PAI_{RW1374} durch eine homologe Rekombination 4 kb großer homologer Sequenzen aus den *pheV* flankierenden Bereichen durchgeführt werden. Die Primer zur Amplifikation dieser homologen Sequenzen wurden aus der Sequenz der *pheV*-Region von *E. coli* K12 MG1655 abgeleitet und enthielten wiederum eine *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle. Homologe Sequenzen der *pheV*-Region wurden durch PCR-Reaktionen mit DNS der Stämme MG1655 und RW1374 amplifiziert. Ein PCR-Produkt des Primerpaares MRV6090U-9900L ließ sich nur mit DNS des Stammes MG1655 amplifizieren. Das PCR-Produkt des Primerpaares 2642U-MLV5914L konnte hingegen mit beiden DNS-Templates gebildet werden. Die *Bam*HI/*Eco*RI-restringierten PCR-Produkte wurden in die *Bam*HI/*Eco*RI-geöffneten Insertionsvektoren pSG76-C und pST76-C ligiert und in *E. coli*

DH5 α transformiert. Das isolierte rekombinante Plasmid pSG76-C_{2642U-MLV914L} wurde in den bereits markierten Stamm RW1374::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} elektroporiert. Der Suizid-Vektor pST76-C_{MRV6090U-9900L} wurde in elektrokompetente Zellen des Stammes RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} transformiert. Bei keinem der selektionierten Klone beider Markierungsexperimente wurde mittels PCR eine Integration des Plasmids pSG76-C in die linke *pheV* flankierende Region oder pST76-C in die rechte *pheV* flankierende Region bestätigt.

Da alle bisher durchgeführten Experimente zur beidseitigen Markierung der LEE-PAI_{RW1374} erfolglos verliefen, sollte nun durch eine mehrtägige Inkubation versucht werden, die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination des klonierten Vektors pST76-C in den bereits markierten Stamm RW1374::pSG76-A zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden nach der Elektroporation der rekombinanten Vektoren pST76-C_{MRV6090U-MRV6951L} und pST76-C_{MRV6090U-9900L} in RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L} die bei 30 °C auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien abgenommen und als Verdünnung (1:1000) in LB-Bouillon überführt. Eine 5tägige Inkubationszeit bei 30 °C - wobei jeden Tag eine neue Verdünnung (1:1000) hergestellt wurde - sollte die Rekombinationswahrscheinlichkeit erhöhen. Abschließend wurden bei 42 °C selektionierte Klone mittels PCR untersucht, um die Markierung der rechten *pheV* flankierenden Region der LEE-PAI zu überprüfen. Bei keinem der isolierten Klone konnte eine Markierung bestätigt werden.

Es wurde anschließend eine *NotI*-Makrorestriktions-Analyse der Stämme RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L}, pST76-C_{MRV6090U-MRV6951L} (1-kb-Insert) und RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L}, pST76-C_{MRV6090U-9900L} (4-kb-Insert) durchgeführt, um sie für Hybridisierungen mit spezifischen DNS-Sonden einzusetzen. Bei der Hybridisierung mit der *eae*-Sonde reagierte in der Chemilumineszenz-Reaktion jeweils das 900 kb bzw. 800 kb große DNS-Fragment (Abb. 22 A.). Mit der Cm-Sonde hybridisierten einige verschieden große Fragmente, was für die Insertion eines Chloramphenicol-Gens spricht (Abb. 22 B.). Mit der DNS-Sonde für die rechte *pheV* flankierende Region (MRV6671L-MRV6063U) reagierte bei den 3 Stämmen jeweils das 900 kb bzw. 800 kb große DNS-Fragment. Mit der linken *pheV* flankierenden DNS-Sonde (U2left*pheV*-L520left*pheV*) hybridisierten jedoch bei den markierten Stämmen jeweils die 800 kb und 700 kb große DNS-Bande und beim Wildtyp-Stamm die 900 kb große Bande (Abb. 22 C.).



Die *NotI*-verdaute, in der CHEF-PFGE aufgetrennte und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragene genomische DNS des unmarkierten und markierten Stammes RW1374 ist in den Spuren 1 bis 3 aufgetragen. RW1374 (1), RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$,pST76- $C_{MRV6090U-6951L}$ (2), RW1374::pSG76- $A_{MLV5018U-MLV5914L}$,pST76- $C_{MRV6090U-9900L}$ (3).

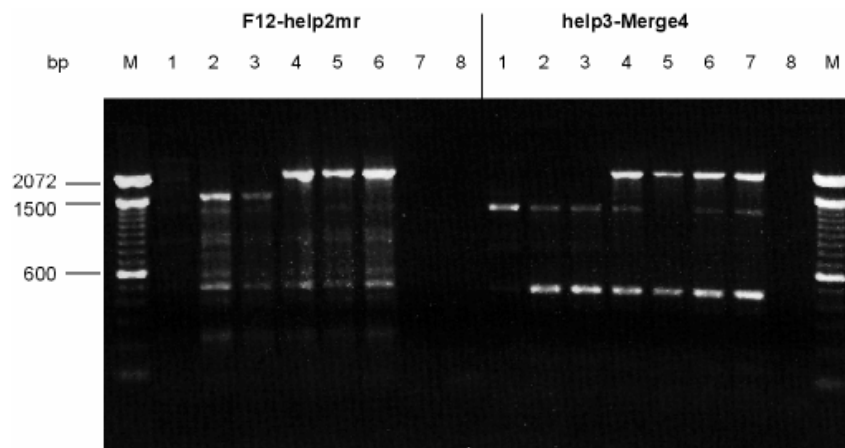
Abb. 22 Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung des unmarkierten und markierten Stammes RW1374 mit der *eae*-Sonde (A.), der Cm-Sonde (B.) und den spezifischen *pheV*-Sonde für die linke (D.) und rechte *pheV* flankierende Region (C.)

Alle diese Ergebnisse zeigten jedoch, dass keine beidseitige Markierung der LEE-PAI_{*pheV*} des Stammes RW1374 stattgefunden hat.

4.2.3 Einfügung von Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen in *pheV* flankierende Genbereiche des humanen EHEC-Stammes 3030A-86

Die Methode der beidseitigen Markierung sollte nun bei einem weiteren Stamm angewendet werden. Es sollte der humane EHEC-Stamm 3030A-86 (O111:H8) markiert werden. Durch zuvor durchgeführte Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die LEE-PAI dieses Stammes ebenfalls im *pheV*-Locus inseriert ist. Die rekombinanten Insertionsvektoren pST76-A und pSG76-C mit den homologen Sequenzen aus MG1655 wurden daraufhin aufgrund der Übereinstimmung des *E. coli* K12-Rückrats zur Markierung der LEE-PAI_{*pheV*} dieses Stammes eingesetzt.

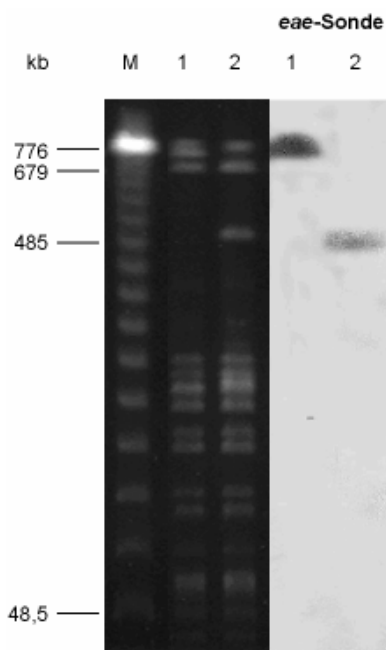
Es wurden elektrokompente Zellen von 3030A-86 hergestellt, um den Suizid-Vektor pST76-A_{MRV6090-MRV6951L} in diese zu elektroporieren. PCR-Reaktionen wiesen bei 42 °C selektionierte Rekombinanten die Integration des Plasmids pST76-A in die rechte *pheV* flankierende Region der LEE-PAI_{3030A-86} nach (Abb. 23).



Ergebnisse der **F12-help2mr**-PCR (2100 bp)
 (linke Bildhälfte): 100-bp-ladder (**M**), 3030A-86 (**1**), 6 Klone von 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} (**2 bis 7**), A. bidest. (**8**)
 Ergebnisse der **help3-Merge4**-PCR (2061 bp)
 (rechte Bildhälfte): 100-bp-ladder (**M**), 3030A-86 (**1**), 6 Klone von 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} (**2 bis 7**), A. bidest. (**8**); (0,7 %iges Agarosegel, 90 V, 90 min).

Abb. 23 **Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis der Markierung der rechten *pheV* flankierenden Region des Stammes 3030A-86**

Es wurde eine *NotI*-Makrorestriktions-Analyse des markierten Stammes 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} sowie des unmarkierten Wildtyp-Stammes 3030A-86 durchgeführt. Ein zusätzliches 500 kb großes Makrorestriktions-Fragment unterschied den markierten Stamm 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} vom Wildtyp-Stamm. Die *NotI*-restringierte DNS der Stämme wurde anschließend auf eine positive Nylonmembran übertragen, um sie mit der *eae*-Sonde zu hybridisieren. Bei dem Wildtyp-Stamm 3030A-86 reagierte ein ca. 800 kb großes DNS-Fragment mit der *eae*-Sonde. Bei dem markierten Stamm 3030A-86::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L} hybridisierte dahingegen das 500 kb große DNS-Fragment. In Abb. 24 ist das Ergebnis der CHEF-PFGE und der korrespondierenden DNS-DNS-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde dargestellt. Das Ergebnis der Makrorestriktions-Analyse bestätigte somit das PCR-Resultat.



Die DNS-Präparationen des unmarkierten und markierten Stammes 3030A-86 sind in den Spuren 1 und 2 aufgetragen. λ -DNS Konkatemere (M), 3030A-86 (1), 3030A-86::pST76- $A_{MRV6090U-MRV6951L}$ (2); (Laufzeit 22 h, Temperatur 14 °C, Winkel 120 °, Spannung 6V/cm, Pulszeit 5-50 sec, Ramping linear).

Abb. 24 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *NotI*-verdauten genomischen DNS des unmarkierten und markierten Stammes 3030A-86 sowie korrespondierendes Autoluminogramm nach Southern Blot-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde

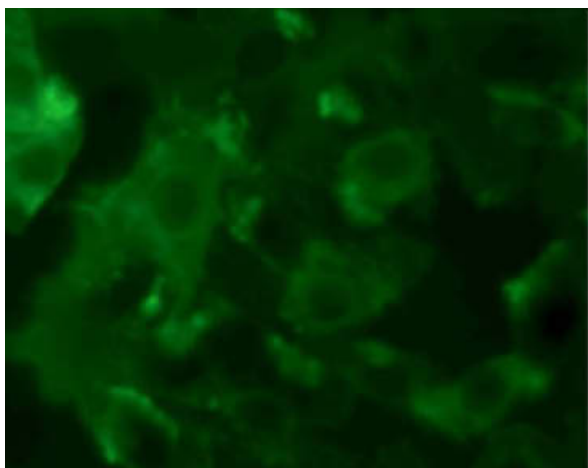
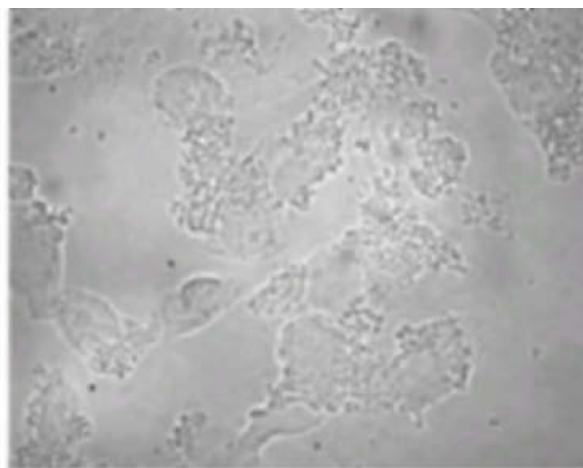
Um nun die linke *pheV* flankierende Region der LEE-PAI_{3030A-86::pST76-A} mit einer *NotI*-Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenz zu markieren, wurde der rekombinante Vektor pSG76- $C_{MLV5018U-MLV5914L}$ in elektrokompente Zellen von 3030A-86::pST76- $A_{MRV6090U-MRV6951L}$ elektroporiert. PCR-Reaktionen konnten bei keinem der bei 37 °C selektionierten Rekombinanten die Insertion von pSG76-C in die linke *pheV* flankierende Region der LEE-PAI_{3030A-86::pST76-A} nachweisen.

4.3 Untersuchungen zu phänotypischen Eigenschaften der Wildtyp-Stämme und ihrer Mutanten

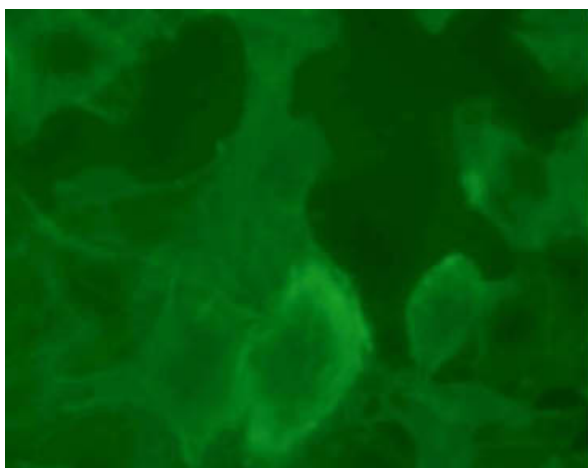
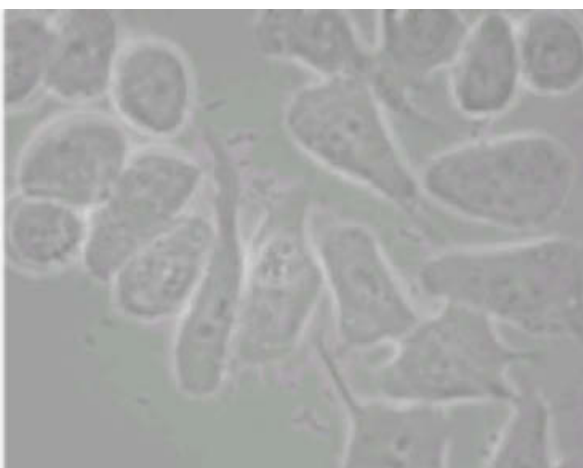
Die Fähigkeit des bovinen EHEC-Stammes RW1374 und seiner Mutanten, „attaching-and-effacing“- (AE-) Läsionen auszulösen, wurde im Fluoreszenz-Aktin-Färbungstest (FAS-Test) in der HEp2-Zellkultur überprüft. In der Fluoreszenz-Mikroskopie stellen sich angereicherte Aktinfilamente der eukaryotischen Zellen unterhalb der haftenden Bakterien als intensiv gelb

gefärbte fluoreszierende Spots dar. Der FAS-Test wurde qualitativ durchgeführt. Die Ergebnisse des Tests sind in Abb. 25 dargestellt.

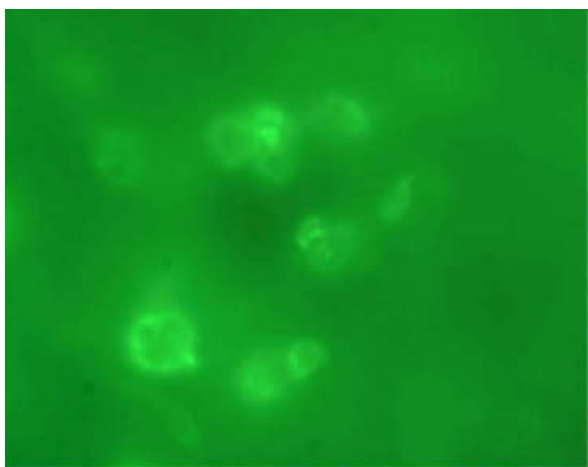
Der Stamm RW1374 sowie seine Mutanten RW1374::*eaep*ST76-A, RW1374::pSG76-*A*_{MLV5018U-MLV5914L} und RW1374::pST76-*A*_{MRV6090U-MRV6951L} wurden untersucht. Als Positivkontrolle des FAS-Tests diente der EPEC-Stamm E2348/69; als Negativkontrolle *E. coli* K12 MG1655. AE-Läsionen konnten als deutlich fluoreszierende Spots bei dem Wildtyp-Stamm RW1374 und den markierten Stämmen RW1374::pSG76-*A*_{MLV5018U-MLV5914L} sowie RW1374::pST76-*A*_{MRV6090U-MRV6951L} nachgewiesen werden. Der mutagenisierte Stamm RW1374::*eaep*ST76-A löste keine AE-Läsionen in der HEP2-Zellkultur aus.

**(a) x 1000****(b) x 1000**

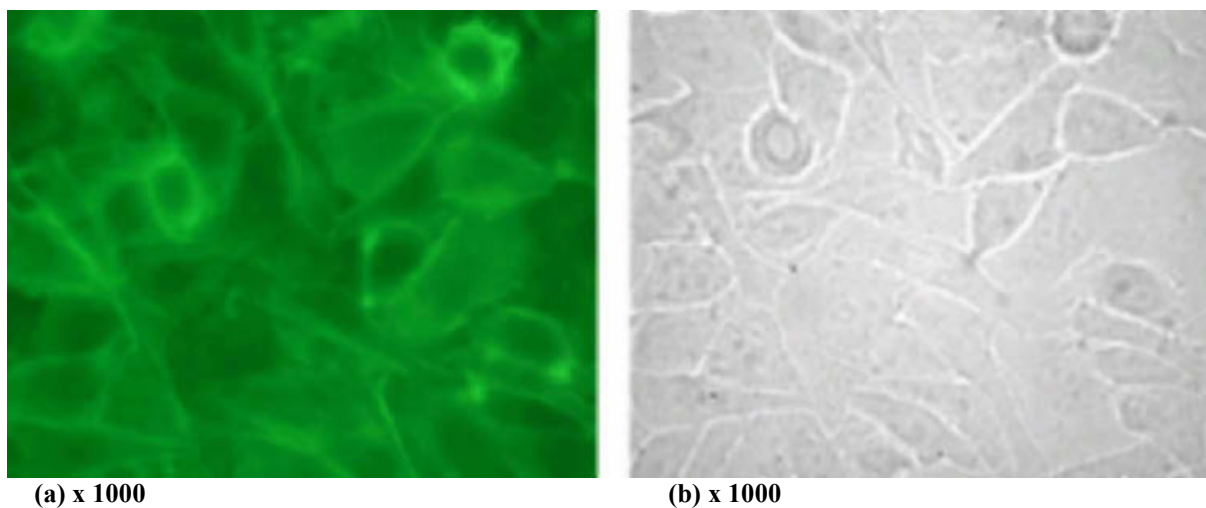
Kolonien des EPEC-Stammes **E2348/69** auf HEp2-Zellen (Positivkontrolle). **(a)** Fluoreszenzmikroskopie. **(b)** Durchlichtmikroskopie

**(a) x 1000****(b) x 1000**

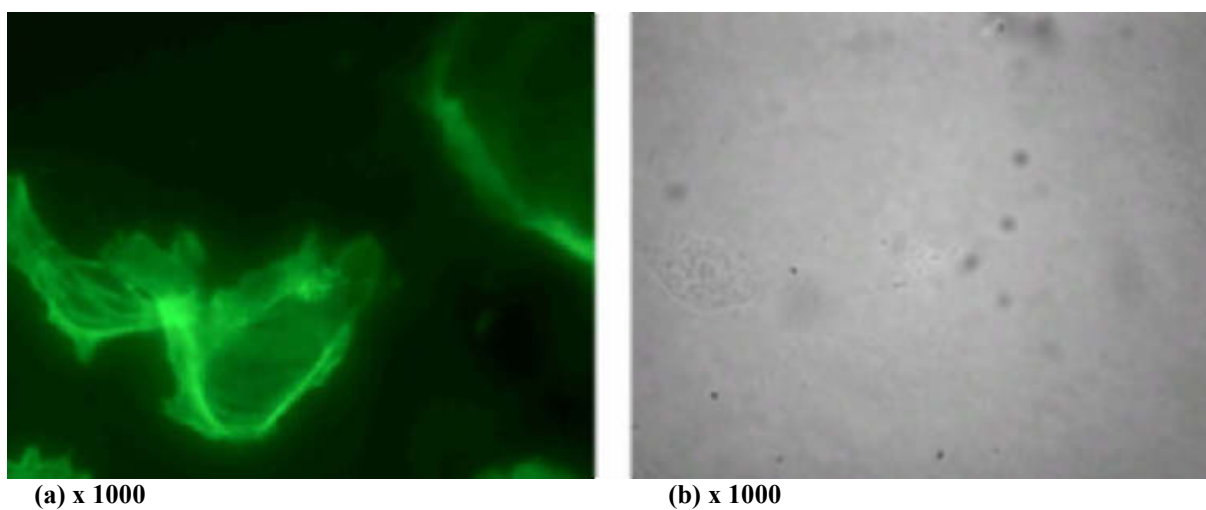
Kolonien des *E. coli* K12-Stammes **MG1655** auf HEp2-Zellen (Negativkontrolle). **(a)** Fluoreszenzmikroskopie. **(b)** Durchlichtmikroskopie

**(a) x 1000****(b) x 1000**

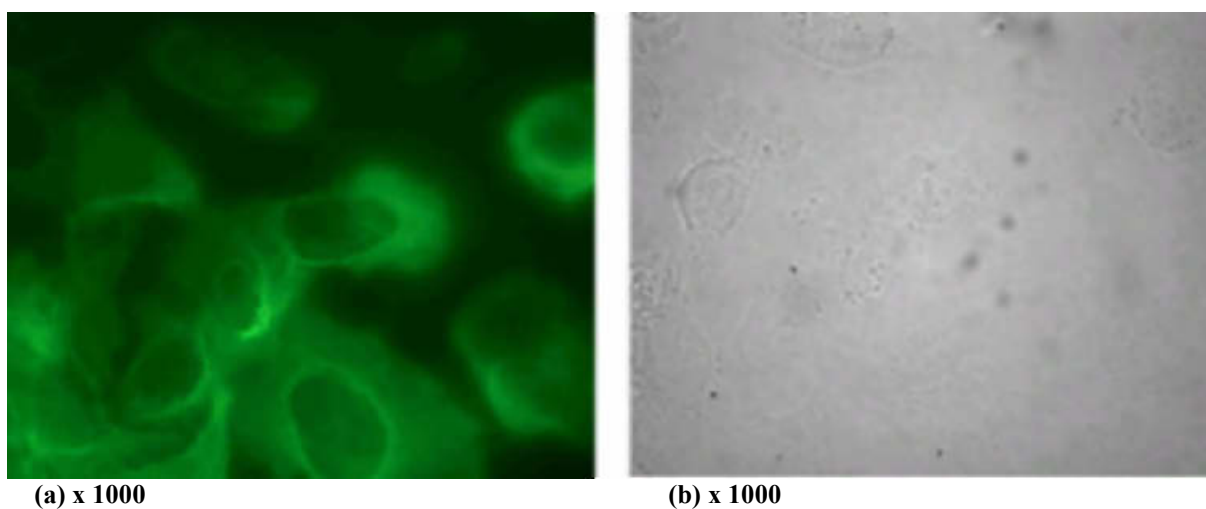
Kolonien des EHEC-Stammes **RW1374** auf HEp2-Zellen. **(a)** Fluoreszenzmikroskopie. **(b)** Durchlichtmikroskopie



Kolonien des markierten Stammes **RW1374::eaepST76-A** auf HEp2-Zellen. (a) Fluoreszenzmikroskopie. (b) Durchlichtmikroskopie



Kolonien des markierten Stammes **RW1374::pSG76-A_{MLV5018U-MLV5914L}** auf HEp2-Zellen. (a) Fluoreszenzmikroskopie. (b) Durchlichtmikroskopie



Kolonien des markierten Stammes **RW1374::pST76-A_{MRV6090U-MRV6951L}** auf HEp2-Zellen. (a) Fluoreszenzmikroskopie. (b) Durchlichtmikroskopie

Abb. 25 Ergebnisse des FAS-Tests

4.4 Klonierung der LEE-Pathogenitätsinsel AE-positiver Bakterien

4.4.1 Klonierung der LEE-PAI_{RW1374} in *Escherichia coli* K12-Stämme

Die LEE-Pathogenitätsinsel von RW1374 sollte unter Zuhilfenahme des Expressionsvektors TrueBlue[®]-BAC2 (Abb. 26) in den *E. coli* K12-Stamm DH5 α kloniert werden. Bei TrueBlue[®]-BAC2 handelt es sich um einen low-copy Vektor, der die Klonierung sehr großer DNS-Fragmente (bis zu 300 kb) und eine Blau/Weiß-Selektion mit 100%iger Genauigkeit erlaubt, da die TrueBlue[®] Lac-Selektions-Klonierungsstelle sich innerhalb *lacZ* α befindet. Somit ist die Bildung falsch negativer Klone unmöglich (142).

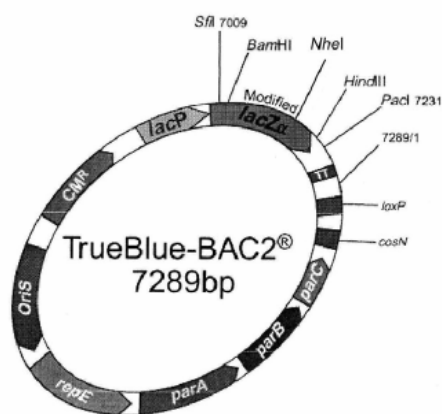


Abb. 26 Schematische Darstellung des Expressionsvektor TrueBlue[®]-BAC2

Zum Zwecke der Klonierung wurde die Gesamt-DNS des Stammes RW1374::pST76-A_{MRV6090-MRV6951L} mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I restringiert und in der CHEF-PFGE aufgetrennt. Das via DNS-DNS-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde ermittelte ca. 70 kb große LEE-Fragment wurde anschließend aus dem Gel isoliert. Das *Xba*I-Fragment konnte aufgrund der Kompatibilität mit der *Nhe*I-Restriktionsstelle von TrueBlue[®]-BAC2 in den *Nhe*I-geöffneten Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert werden. Zuvor wurde die erfolgreich durchgeführte Ligation mittels PCR (ECW1-ECW2) bestätigt. Es wurden 28 Klone auf Cm-IPTG-Xgal-haltigen LB-Agarplatten selektioniert, die mittels Dot-Blot-Hybridisierung mit der *eae*-Sonde überprüft wurden. Bei keinem der Isolate konnte eine Klonierung des LEE-PAI_{RW1374}::pST76-A nachgewiesen werden.

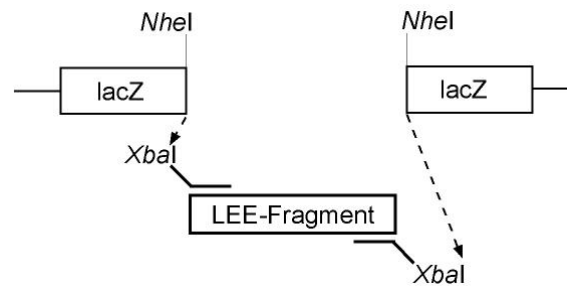


Abb. 27 Schematische Darstellung der Ligation des *XbaI*-verdauten LEE-Fragments von RW1374::pST76-AMRV6090U-MRV6951L in den *NheI*-verdauten Expressionsvektor TrueBlue®-BAC2

4.4.2 Klonierung der LEE-PAI_{DBS100} in *Escherichia coli* K12-Stämme

Um den unbekanntem LEE-Insertionsort des *C. rodentium*-Stammes DBS100 in zukünftigen Untersuchungen zu analysieren, sollte die LEE-Pathogenitätsinsel von DBS100 unter Zuhilfenahme des Expressionsvektors TrueBlue®-BAC2 in *E. coli* DH5 α kloniert werden.

Die Gesamt-DNS von DBS100 wurde mit der selten schneidenden Restriktionsendonuklease *NheI* restringiert und in der CHEF-PFGE aufgetrennt. Das via DNS-DNS-Hybridisierung mit der LEECitr5343U-LEECitr6002L-Sonde ermittelte ca. 30 kb große LEE-PAI-Fragment wurde aus dem Gel isoliert, in den ebenfalls mit *NheI* restringierten Vektor TrueBlue®-BAC2 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Eine erfolgreich durchgeführte Ligation wurde zuvor mittels PCR (LEECitr5343U-LEECitr6002L) bestätigt. Es wurden 27 Klone auf Cm-IPTG-Xgal-haltigen LB-Agarplatten selektioniert, die mittels PCR und Dot-Blot-Hybridisierung mit der LEECitr5343U-LEECitr6002L-Sonde bzw. dem LEECitr5343U-LEECitr6002L-Primerpaar überprüft wurden. Bei keinem der Isolate konnte eine Klonierung der LEE-PAI_{DBS100} nachgewiesen werden.