

## 5 Diskussion

### 5.1 Bestimmung des LEE-Insertionsortes AE-positiver Bakterien

Die Locus of Enterocyte Effacement-Pathogenitätsinsel (LEE-PAI) ist unter enteropathogenen (EPEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) sowie anderen Attaching and Effacing- (AE-) positiven Enterobakterien weit verbreitet (93). Der Erwerb des LEE bei den klonalen Linien der EPEC- und EHEC-Stämme wird als ein bedeutendes Ereignis in der Entstehungsgeschichte pathogener *E. coli* betrachtet (124). Entsprechend dem von McGraw und Whittam (96) aufgestelltem klonalen Modell entwickelten sich von einem Urstamm ausgehend zwei klonale Linien (EPEC1 und EHEC1) darmpathogener *E. coli* (DEC), bei denen der LEE innerhalb des *selC*-tRNS-Locus inseriert ist (168). Von einem anderen Urstamm ausgehend, bei dem der LEE innerhalb des *pheU*-tRNS-Locus inseriert ist, entwickelten sich die EPEC2- und EHEC2-Klone unabhängig von den EPEC1- und EHEC1-Klonen durch eine zweite Serie von Erwerbsereignissen mobiler genetischer Elemente (144, 36). Des Weiteren wurde die Existenz eines dritten, noch unbekanntem LEE-Insertionsortes bei DEC-Stämmen der Serovar O111ab:H25 nachgewiesen (144).

Diese Erkenntnisse über die Vielfältigkeit des LEE-Insertionsortes unterstützen die Hypothese, dass der Erwerb einer LEE-PAI und die Insertion in unterschiedliche tRNS-Loci als ein mehrfach auftretendes Ereignis in der Entstehungsgeschichte pathogener *E. coli* zu verstehen ist (168). Jedoch ist der Ursprung des LEE und die auf ihm kodierten Gene, insbesondere das für die Ausbildung der AE-Läsionen verantwortliche bakterielle Adhäsin Intimin, bisher unbekannt. Der geringe G+C-Gehalt und die außergewöhnliche Codon-Nutzung deuten aber darauf hin, dass sich ein fremdes DNS-Element in der *E. coli*-Population und verwandten Bakterienspezies ausgebreitet hat (168). Die auf einer Mosaikstruktur beruhenden Unterschiede der Intimintypen deuten zudem darauf hin, dass sich der LEE durch Mutations- und Rekombinationsereignisse vielfältig unter den Attaching and Effacing-positiven Pathogenen verbreitet hat (95). Die Daten über den LEE-Insertionsort von *E. coli*-Stämmen verschiedener klonaler Linien, kombiniert mit den Informationen über den Intimintyp, weisen offensichtlich auf den horizontalen Transfer eines LEE-tragenden Elements hin.

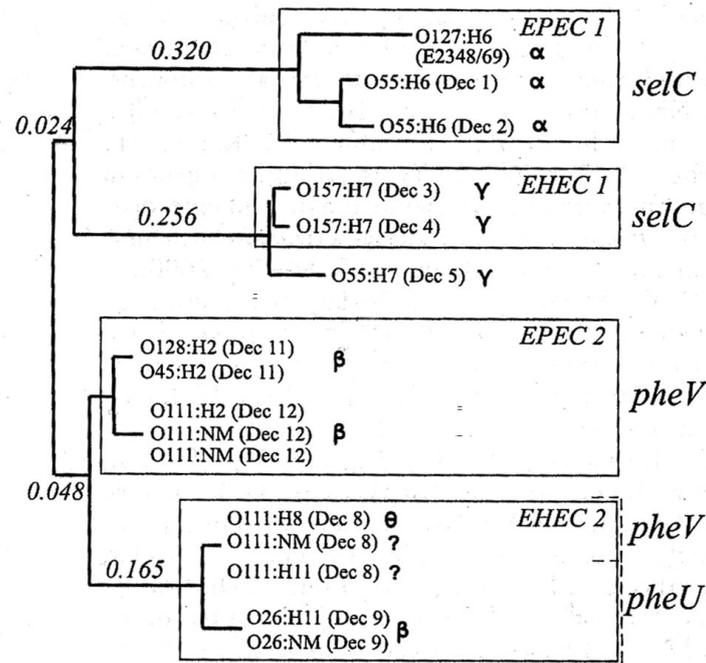
Die Untersuchung der humanen DEC-Klone des EPEC2- und EHEC2-Clusters ergab, dass hingegen der bisher vertretenen Ansicht der LEE der DEC-Klone 8, 11 und 12 innerhalb des

*pheV*-tRNS-Locus inseriert ist (Abb. 28). Ursprünglich wurde diesen Stämmen ein LEE-Insertionsort innerhalb *pheU* zugeordnet. Diese Annahme beruhte auf PCR-Untersuchungen hinsichtlich der Unversehrtheit des *pheU*-Locus, wobei ein fehlendes PCR-Amplifikat für einen infolge einer LEE-Insertion zerstörten *pheU*-Locus sprach (144). Dahingegen besitzen alle  $\beta$ -Intimin-tragenden bovinen und humanen EHEC-Stämme (DEC 9) einen in *pheU* inserierten LEE, während der LEE der  $\beta$ -Intimin-tragenden EPEC-Stämme (DEC 11 und DEC 12) in *pheV* inseriert ist (Abb. 28).

Diese Tatsache, dass *E. coli*-Stämme verschiedener klonaler Cluster, Pathovaren und Ursprungs denselben Intimintyp exprimieren, der LEE aber unterschiedlich inseriert ist, legt die Vermutung nahe, dass das LEE-tragende Element einst zwischen unterschiedlichen klonalen Linien gewandert ist. Das wiederum unterstützt die Hypothese, dass der LEE mehrfach und an verschiedene Orte während der evolutionären Entwicklung enteropathogener und enterohämorrhagischer *E. coli* inseriert ist (168).

Ein weiterer Hinweis für den horizontalen LEE-Transfer erbrachte die Untersuchung der DEC-Klone 8 und 9 des EHEC2-Clusters. Diese beiden Klone sind zwar nah miteinander verwandt, tragen jedoch unterschiedliche Intimintypen. Die DEC 9-Stämme enthalten den Intimintyp  $\beta$  (123), dahingegen der Intimintyp der O111:H8 DEC 8-Stämme von Tarr und Whittam als ein  $\theta$ -Intimintyp identifiziert wurde (156). Die Autoren legen außerdem die Vermutung nahe, dass dieser O111:H8-Klon den Erwerb einer komplett anderen LEE-Insel in das klonale Gerüst des EHEC2-Clusters widerspiegelt (156). Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass der LEE der DEC 8-Stämme der Serovar O111:H8 und O111:NM in *pheV* und nicht wie bei den DEC 9-Stämmen in *pheU* inseriert ist. Zwei verschiedene LEE-tragende Elemente könnten demzufolge entweder gleichzeitig von verschiedenen Zellen eines gemeinsamen Urstammes oder einzeln von Vorläufer-Stämmen aufgenommen worden sein.

Die Ergebnisse der untersuchten humanen *E. coli*-Stämme stimmen insofern mit den bisherigen phylogenetischen Daten der DEC-Klone überein, dass mit Ausnahme des DEC-Stammes C130-53 (O111:H11), dessen Serovar untypisch für einen DEC 8-Klon ist (165), alle Stämme eines DEC-Klons denselben LEE-Insertionsort besitzen, was bereits für Stämme derselben Serovar ermittelt wurde. Aus den neuen Erkenntnissen bezüglich des LEE-Insertionsorts der DEC-Klone 8, 11 und 12 resultierend, sollten einige gegenwärtige Annahmen hinsichtlich des LEE-Insertionsorts verschiedener klonaler Linien von *E. coli* überprüft werden.



**Abb. 28** 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) und Wieler et al., 1997 (168))

Auch die Untersuchung der bovinen EHEC-Stämme unterstützt die Vermutung über den horizontalen LEE-Transfer, der mit der Ausbildung LEE-positiver klonaler *E. coli*-Linien verbunden ist. Ein Hinweis darauf stellt der Zusammenhang zwischen Intimintyp und LEE-Insertionsort dar. Verschiedene Intimintypen repräsentieren offensichtlich unterschiedliche phylogenetische Linien LEE-positiver *E. coli*-Stämme. Die STEC Stämme RW1372 und RW1374, die beide eine O103:H2-Serovar besitzen, belegen zudem einen Zusammenhang zwischen Serovar, Intimintyp ( $\epsilon$ ) und LEE-Insertionsort (*pheV*). Dieser  $\epsilon$ -Intimintyp kommt bei zahlreichen bovinen und humanen EHEC-Stämmen vor, die neben der O103-Serogruppe auch anderen Serogruppen zuzuordnen sind (111). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Stämmen, um eine weitere klonale Gruppe darmpathogener *E. coli* handelt. Einen neuen Hinweis dafür lieferten die Untersuchungen der in *pheV* inserierten LEE-PAI des Stammes RW1374. Es handelt sich dabei um die bisher größte beschriebene LEE-PAI (120 kb), die wie andere Inseln auch von zwei IS-Elementen begrenzt ist, interessanterweise jedoch große DNS-Abschnitte enthält, die eine große Ähnlichkeit mit den in *pheU* inserierten LEE-PAIn des bovinen EHEC-Stammes 413/89-1 (O26:NM) und des lapinen REPEC-Stammes 83/39 (O15:NM) aufweisen (70). Für eine weitere phylogenetische Linie darmpathogener *E. coli*-Stämme spricht die Beschreibung eines  $\zeta$ -Intimintyps, der bei

bovinen EHEC-Stämmen der Serogruppen O84, O92, O119 und O150 vorkommt (71). Diese Vermutung wird von der Tatsache unterstützt, dass alle diese untersuchten Stämme eine LEE-PAI besitzen, die innerhalb des *pheV*-Locus inseriert ist.

Gleichzeitig ergaben die PCR-Analysen der untersuchten tRNS-Loci *selC*, *pheU* und *pheV*, dass die Mehrzahl der LEE-positiven bovinen EHEC- und humanen DEC-Stämme sowohl einen unterbrochenen *pheU*- als auch *pheV*-Locus besaßen, was auf die Existenz eines weiteren genomischen Elements (genomische Insel) innerhalb des nicht LEE-enthaltenden tRNS-Locus schließen lässt. Ausführlichere Untersuchungen dieser *pheU/V*-Elemente sollten jedoch zukünftig durchgeführt werden, um die Bedeutung dieser Elemente in der LEE-Entstehung und Verbreitung unter pathogenen *E. coli* aufzuklären.

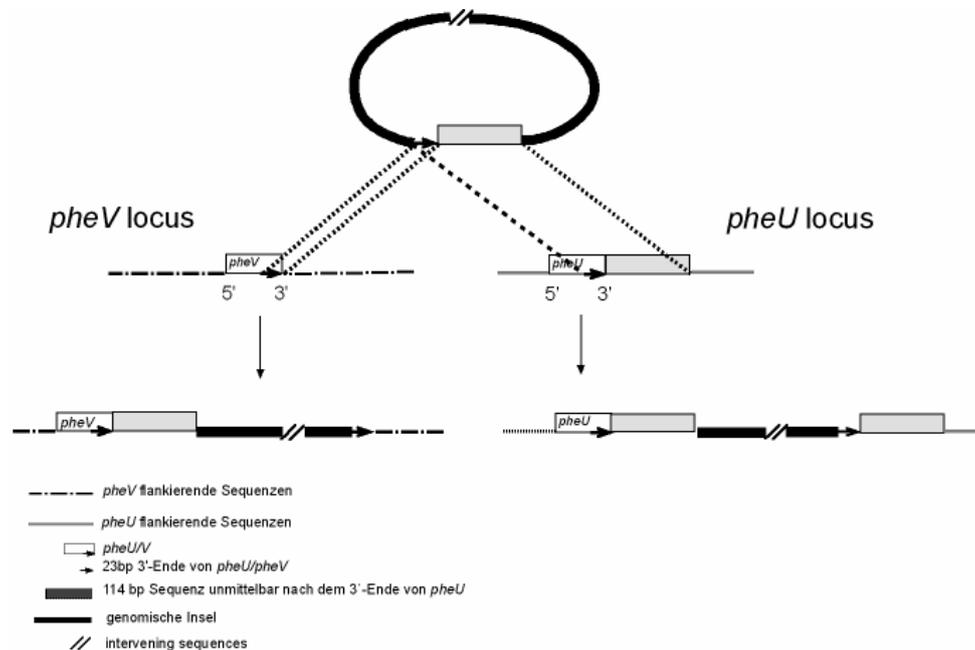
Das Intimin-Gen (*eae*) gilt als charakteristischer Marker einer LEE-PAI. Der Nachweis dieses Gens lieferte uns den Beweis für einen chromosomal inserierten LEE. Durchgeführte Hybridisierungsanalysen mit der für das Intimin-Gen spezifischen DNS-Sonde wiesen bei allen *E. coli*-Stämmen nur eine LEE-PAI innerhalb eines tRNS-Locus nach. Jedoch wurde bei dem als AE-positiv bezeichneten DEC-Stamm 2966-56 (O111:H2) mittels Hybridisierung kein Intimin-Gen nachgewiesen, obwohl das PCR-Ergebnis auf einen zerstörten *pheU*-Locus hinwies. Die Arbeit von Sandner et al. (132) zeigte bei einer Vielzahl von *E. coli*-Stämmen, dass die LEE-PAI nicht immer als komplette Kassette vorliegen muss. Der LEE-Locus und seine Bestandteile sind nach Auffassung der Autoren als dynamische Elemente zu verstehen, die wiederum die Mosaikstruktur des LEE bedingen (132). Das Hybridisierungsergebnis des DEC-Stammes 2966-56 kann als möglicher Hinweis auf die Existenz eines LEE ohne Intimin-Gen bzw. auf eine bestehende Mobilität des Intimin-Gens infolge LEE-interner Rekombinationsereignisse gewertet werden. Diese Rekombinationen bewirken die Instabilität der LEE-PAI und zerstören die Insel (132). Sie sind ebenfalls verantwortlich für die große Vielfalt der Intimintypen (95). Aufgrund dieser Kenntnisse ist es vorstellbar, dass anstelle eines kompletten LEE sich nur einzelne Bestandteile (wie das Intimin-Gen) unter AE-positiven Enterobakterien ausgebreitet haben.

Ein gemeinsames Merkmal dieser in *pheU/pheV* lokalisierten genomischen Inseln scheint ihre ursprüngliche Entwicklung aus einem in *pheU* lokalisierten PAI-Vorläufer zu sein. Die im *pheU*-tRNS-Locus inserierte LEE-negative genomische Insel und die in *pheV* lokalisierte LEE-PAI des bovinen EHEC-Stammes RW1374 (O103:H2) wurden bereits intensiv

untersucht (25). Durch den Vergleich der Ränder der *pheU*- und *pheV*-Inseln in RW1374 wurde ein Modell über die Integration dieser PAIn in die tRNS-Loci entwickelt (Abb. 29). Eine 114 bp große DNS-Sequenz, die in *E. coli* K12 unmittelbar stromabwärts von *pheU* gelegen ist, kommt gemeinsam mit dem 23 bp großen 3'-Ende von *pheU* als Direct Repeat-(DR-) Sequenz (insgesamt als 137 bp große *pheU*-spezifische Sequenz) am linken Ende der *pheU*-Insel vor. Dieselbe 114 bp große *pheU*-spezifische Sequenz kommt auch in der *pheV*-Insel (LEE-PAI) von RW1374 unmittelbar stromabwärts des *pheV*-Gens vor. Offensichtlich integrierte ein zirkularisierter PAI-Vorläufer (oder ein Element, das aus der ursprünglichen Lokalisation im selben Chromosom herausgeschnitten wurde), der eine homologe DNS-Sequenz zum 3'-Ende des *pheU*-Gens inklusive der folgenden 114 bp großen Sequenz trug, über eine ortsspezifische Rekombination ins Wirtsgenom. Das erste Basenpaar des 23 bp großen terminalen *pheU/V*-Fragments stellte dabei den Punkt des Crossovers dar. Die Integration in *pheV* führte zur Duplikation des 23 bp großen terminalen *pheU/V*-Fragments und zur Integration der 114 bp großen Sequenz in die *pheV*-Insel, während die Integration in *pheU* zur Duplikation der 137 bp großen Sequenz am 3'-Ende der *pheU*-Insel führte (25, 127). An diesem Integrationsmechanismus könnte die putative P4-Integrase beteiligt sein, die durch einen ORF kodiert wird, der in der Nähe des linken Endes der *pheU/V*-Insel lokalisiert ist. Ein ähnlicher Integrationsmechanismus wurde für die innerhalb des tRNS-Gens für Asparagin (*asn*) lokalisierte High Pathogenicity Island (HPI) pathogener *Yersinia* spp. und einiger *E. coli*-Stämme beschrieben. Ein P4-Integrase-Gen befindet sich nahe des linken Endes der HPI. Es kodiert eine funktionelle Integrase, die eine ortsspezifische Rekombination katalysiert und zur Integration der HPI führte (21, 119, 118). Jedoch ergaben vergleichende Untersuchungen des linken Endes der HPI mit dem linken Ende der *pheU/pheV*-Inseln keine wesentlichen Ähnlichkeiten, was auf einen anderen Ursprung der HPI hinweist (127).

Der vermutliche PAI-Vorläufer der in *pheU/pheV* lokalisierten PAIn integrierte wahrscheinlich in einen oder mehrere Urstämme der heutigen *E. coli*-Pathovaren und verwandter Bakterien. Offensichtlich entwickelte und verbreitete sich der PAI-Vorläufer parallel mit der Evolution und dem Auseinanderlaufen der Urstämme und diente als Zielort für intensive Rekombinationsereignisse einschließlich der Insertion fremder DNS-Sequenzen und Deletionen. Der Selektionsdruck führte vermutlich zur präzisen Entwicklung dieses PAI-Vorläuferelements in den verschiedenen phylogenetischen Zweigen von *E. coli*. Der LEE wurde offenbar von einem oder mehreren Vorläufer(n) der ursprünglichen genomischen

Insel(n) aufgenommen. Dieses Szenario würde mit dem von Hacker und Kaper (51) aufgestellten PAI-Evolutionsmodell übereinstimmen.



**Abb. 29 Schematische Darstellung über die ortsspezifische Integration genomischer Inseln in die *pheU*- und *pheV*-tRNA-Gene (Rumer et al., 2003 (127))**

Um den Mechanismus der LEE-Verbreitung zwischen EPEC und EHEC zu verstehen, ist es wichtig, die Frage zu klären, warum der in den *pheU/pheV*-tRNA-Loci lokalisierte LEE innerhalb größerer genomischer Inseln inseriert ist, während er im *selC*-Locus als ein autonomes Element auftritt. An den Rändern des *selC*-LEE befinden sich keine DR-Sequenzen oder andere strukturelle Merkmale, die auf eine selbständige Mobilität hinweisen. Auch der Mechanismus des erstmaligen Auftretens des LEE ist unklar. Aufgrund einer in vielen EPEC-Stämmen auftretenden Deletion an der linken Seite des LEE könnten wichtige Sequenzdaten als Anhaltspunkte verloren gegangen sein, die die Art des Integrationsmechanismus hätten erklären können. Die Übertragung des LEE dürfte jedoch mittels eines Trägers (z.B. eines Plasmids) erfolgt sein, der über eine homologe oder ortsspezifische Rekombination integrierte (93). Das Vorhandensein von Resten eines Transposase-Gens am rechten Ende der LEE-PAI könnte auf eine Übertragung des LEE via konjugativer Transposition hindeuten (40). Zur Klärung des unbekanntem Integrationsmechanismus trug v.a. die Arbeitsgruppe um Perna et al. (112) bei. Sie fand heraus, dass stromabwärts des rechten Endes des in *selC* lokalisierten LEE des EHEC-Stammes EDL933 ein 792 bp großes DNS-Fragment fehlt, welches in *E. coli* K12 vorhanden

ist. Dieses fehlende Fragment könnte das Resultat einer Deletion sein, die einen Teil eines größeren Elements umfasste, das ursprünglich den LEE übertrug. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass der in *selC* inserierte LEE ein Rudiment des ursprünglich inserierten LEE-Elements darstellt.

Auf Deletionen des rechten Endes der in *pheU/V*-lokalisierten LEE-PAIn deuten auch die Hybridisierungsergebnisse der untersuchten humanen und bovinen *E. coli*-Stämme hin. Dafür sprechen die fehlenden Hybridisierungssignale mit den DNS-Sonden, die für die rechte *pheV* bzw. *pheU* flankierende Region (3'-Ende) spezifisch sind. Gleichzeitig ergab die Untersuchung der  $\epsilon$ 1-Intimintyp-tragenden bovinen EHEC-Stämme (IHIT 0554, IHIT 2430, IHIT 2115) fehlende Hybridisierungssignale mit der für die rechte *pheU* flankierende Region spezifischen DNS-Sonde sowie fehlende 1484c308-*cycZ1*-PCR-Amplifikate, was nicht auf eine PAI-Insertion innerhalb *pheU* hinwies. Dennoch war der *pheU*-Locus aufgrund des *cadC2-cycZ1*-PCR-Resultats zerstört. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Deletion an der linken Seite der Insel der jeweiligen Stämme hin, wobei an der Deletion ein Fragment beteiligt sein könnte, das von zwei homologen *pheU/V*-terminalen Fragmenten begrenzt ist. Eins dieser Fragmente gehört zum intakten *pheU*-Gen, das andere befindet sich irgendwo innerhalb der Insel. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in der LEE-PAI von RW1374 zwei homologe *pheU/V*-terminale Fragmente gefunden wurden (69). Eine Deletion an der linken Seite der *pheV*-Insel könnte auch das Fehlen des 1484c308-4945-PCR-Produktes bei dem DEC-Stamm 3291-86 (O111:NM) erklären.

Entsprechend dem von Hacker and Kaper (51) entwickeltem Modell sind Deletionen und Mutationen an den Verbindungspunkten zwischen PAI und tRNS-Gen an der Stabilisierung von PAIn beteiligt. Warum jedoch Deletionen bevorzugt an den rechten Verbindungspunkten auftreten, wie dies die Untersuchung der *pheU*- und *pheV*-Inseln ergab, ist unklar und bedarf weiterer Analysen. Ebenso unklar ist, warum die linken Seiten der genomischen Inseln konservierter sind als die rechten Seiten. Jedoch lassen die konservierten Strukturen in den *pheU/pheV* integrierten Inseln vermuten, dass verschiedene PAIn durch einen gemeinsamen Träger horizontal übertragen wurden (127). Diese Eigenschaft des gehäuft Auftretens von Deletionen an der rechten Seite einer PAI, die mit strukturellen Veränderungen verbunden sind, scheint auch für die *she*-PAI verschiedener *Shigella*-Stämme und pathogener *E. coli* typisch zu sein (6). Auch die HPI pathogener *Yersinia* spp. weist genetische und strukturelle Unterschiede im rechten Ende der HPI auf (119).

Im Gegensatz zu den untersuchten *E. coli*-Stämmen ergab die Bestimmung des LEE-Insertionsorts der AE-positiven *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämme, dass die Stämme zwar eine LEE-PAI besaßen, der Insertionsort jedoch nicht von allen Stämmen ermittelt werden konnte. Von den 7 *C. rodentium*-Stämmen ließ sich eine LEE-PAI innerhalb des *pheU*-tRNS-Locus nur bei dem Stamm DBS125 nachweisen. Da mittels DNS-DNS-Hybridisierung nur die flankierenden Bereiche der *pheU*- und *pheV*-tRNS-Loci untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der LEE der übrigen 6 Stämme innerhalb des *selC*-Locus oder einer anderen Stelle inseriert ist. Ein weiterer Hinweis auf einen anderen LEE-Insertionsort als *pheU* lieferte die Ähnlichkeit des *NotI*-Restriktionsmusters dieser 6 *C. rodentium*-Stämme, welches sich vom *NotI*-Restriktionsmuster des Stammes DBS125 unterschied, sowie das Resultat der Hybridisierung mit der DNS-Sonde für Intimin. Mit dieser Sonde reagierte bei den Stämmen mit der unbekanntem LEE-Lokalisation jeweils ein 350 kb großes DNS-Fragment im Gegensatz zum Stamm DBS125, bei dem ein 440 kb großes DNS-Fragment mit der Intimin-Sonde reagierte.

Die Analyse der rechten *pheUV* flankierenden Regionen wies aufgrund fehlender Hybridisierungssignale bei allen 7 *C. rodentium*-Stämmen auf mögliche Deletionen der rechten *pheUV* flankierenden Regionen hin. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei der Bestimmung des LEE-Insertionsortes von den *C. rodentium*-Stämmen mit DNS-Sonden gearbeitet wurde, die mit Hilfe des *E. coli*-Rückrats generiert wurden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass fehlende Hybridisierungssignale auf eine zu geringe Spezifität der eingesetzten DNS-Sonden zurückzuführen sind. Bei dem Stamm DBS125 könnte das fehlende Hybridisierungssignal mit der Sonde für die rechte *pheU* flankierende Region auf eine Deletion der rechten LEE-PAI-Seite hinweisen, wie es zuvor bei der Untersuchung der *E. coli*-Stämme ermittelt wurde. Jedoch wiesen Deng et al. (32) an der rechten Seite der *C. rodentium*-LEE-PAI einen ABC-Transporter nach, der an den rechten Flanken der *E. coli*-LEE-PAI nicht vorkommt. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass das fehlende Hybridisierungssignal für die rechte *pheU* flankierende Region des Stammes DBS125 auf diesen ABC-Transporter hinweist.

Bei den 5 untersuchten *E. alvei*-Stämmen, die alle ein sehr ähnliches *NotI*-Restriktionsmuster aufwiesen, wurde ein LEE-Insertionsort innerhalb des *pheU*-tRNS-Locus nachgewiesen. Für *E. alvei*-Stämme wird ein  $\alpha$ -Intimintyp beschrieben (3). Bisher wurde dieser Intimintyp für EPEC1-Stämme beschrieben, deren LEE innerhalb *selC* inseriert ist (3, 168). Aufgrund des ermittelten LEE-Insertionsortes der *E. alvei*-Stämme und der Korrelation mit dem Intimintyp

ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den LEE-positiven *E. alvei*-Stämmen um einen anderen phylogenetischen Zweig AE-positiver Bakterien handelt.

Fehlende Hybridisierungssignale mit der DNS-Sonde für die rechte *pheU* flankierende Region wiesen auch bei allen *E. alvei*-Stämmen auf Deletionen der rechten PAI-Seiten hin. Das Auftreten von Deletionen an der rechten Seite der LEE-PAI scheint demnach ein typisches Merkmal für eine LEE-Pathogenitätsinsel zu sein.

Mittels PCR-Analysen ließ sich der LEE-Insertionsort weder bei den *C. rodentium*- noch bei den *E. alvei*-Stämmen ermitteln. Ein Grund dafür dürften die eingesetzten Oligonukleotid-Primer sein, die spezifisch für *E. coli* sind, um eine PAI-Insertion innerhalb der tRNS-Loci *pheU*, *pheV* und *selC* zu untersuchen, jedoch aufgrund Basenfehlpaarungen ungeeignet scheinen, den LEE-Insertionsort der *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämme zu bestimmen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die LEE-PAI der *C. rodentium*- und *E. alvei*-Stämme Elemente enthält, die bei der LEE-PAI der *E. coli*-Stämme nicht vorkommen.

Der unbekannte LEE-Insertionsort bei der Mehrzahl der *C. rodentium*-Stämme bestätigte die von Deng et al. (32) aufgestellte Hypothese über den Erwerb und die Evolution des LEE bei *C. rodentium*. Diese Hypothese besagt, dass der mittels eines Plasmids übertragene LEE ins Genom integrierte. Dieser LEE scheint aufgrund der genetischen Anordnung, zahlreicher IS-Elemente und noch vorhandener Plasmidsequenzen jünger zu sein als der LEE der EPEC- und EHEC-Stämme, deren möglicherweise einst vorhandene Plasmidsequenzen infolge von Stabilisierungsprozessen deletiert sind. Der *C. rodentium*-LEE der meisten Stämme könnte sich demnach noch in Umbauprozessen befinden, die noch mit einem eventuellen LEE-Transfer innerhalb des Genoms und der stabilen Integration verbunden sind. Der Nachweis des LEE innerhalb des *pheU*-tRNS-Locus bei dem Stamm DBS125 könnte auf einen bereits vollendeten Integrationsprozess hinweisen. Unterstützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass der LEE von *C. rodentium* einen  $\beta$ -Intimintyp besitzt (3) und dass dieser Intimintyp bei AE-positiven *E. coli*-Stämmen mit einem LEE-Insertionsort in *pheU* korreliert. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den LEE-positiven *C. rodentium*-Stämmen um einen gänzlich anderen phylogenetischen Zweig AE-positiver Bakterien handelt. Um den Ursprung und die weitere Entwicklung LEE-positiver *C. rodentium*-Stämme aufzuklären, sollten zukünftig noch ausführlichere Analysen erfolgen. Schließlich jedoch unterstützen die ermittelten Erkenntnisse über den LEE-Insertionsort der *C. rodentium*- und

*E. alvei*-Stämme die Hypothese über einen horizontalen Transfer und der mehrmaligen Insertion eines LEE-Elements in verschiedene Stellen des bakteriellen Genoms.

Um den unbekanntem LEE-Insertionsort des *C. rodentium*-Stammes DBS100 zu bestimmen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein 30 kb großes LEE-PAI-Fragment in den BAC-Vektor TrueBlue<sup>®</sup>-BAC2 kloniert. Dieses LEE-PAI-Fragment war groß genug, um darin uncharakterisierte Abschnitte LEE-PAI flankierender Sequenzen zu vermuten. Die Klonierung dieses LEE-PAI-Fragments sollte zukünftigen Analysen zum LEE-Insertionsort dienen. Im Verlauf des Klonierungsexperiments gelang es jedoch nicht, die LEE-PAI<sub>DBS100</sub> zu klonieren.

## 5.2 Markierung des Intimin-Gens und Übertragung des LEE

Die Konjugation stellt neben der Transduktion und Transformation eine Möglichkeit des horizontalen Gentransfers unter Bakterien dar, der mit dem Austausch genetischen Materials verbunden ist. Das Vorhandensein von DR-Sequenzen an den Flanken der LEE-PAI von RW1374 deutet auf die Instabilität dieser Insel hin. Theoretisch fördern jene terminalen Sequenzen die Zirkularisierung und Deletion der kompletten LEE-PAI in einem RecA-unabhängigen Rekombinationmechanismus, was in einer Übertragung der Insel resultiert (70). Unterstützt wird diese Hypothese von dem Bericht über die spontane Deletion der in *pheV* inserierten LEE-PAI des lapinen REPEC-Stammes 84/110-1 (O103:H2), der ebenfalls von DR-Sequenzen flankiert ist, sowie ein Integrase-Gen enthält. All das sind Hinweise dafür, dass diese LEE-PAI von einem Bakteriophagen erworben wurde (157).

Um Aufschluss über die Art der LEE-Übertragung zu erhalten, wurde in einem Konjugationsexperiment versucht, den LEE des bovinen EHEC-Stammes RW1374 (O103:H2) zu mobilisieren. Hinweise auf eine mögliche Aufnahme des LEE via konjugativer Transposition lieferte die Tatsache, dass der LEE<sub>RW1374</sub> von zwei IS-Elementen (IS629) flankiert ist, die auf eine putative Transposon-Struktur hindeuten, und dass die Transposasen scheinbar intakt sind (69). Bisher ist CTnscr94 das einzige konjugative Transposon, das bei Enterobakterien nachgewiesen wurde. Die Integration in die *pheU*- bzw. *pheV*-tRNS-Gene von *E. coli* erfolgte durch eine ortsspezifische Rekombination und führte zu einem Direct Repeat des 3'-Endes des betroffenen tRNS-Gens. Eine 50 bp große DNS-Sequenz, die dem Bereich von *pheU/pheV* sehr ähnlich ist, wurde auf diesem mobilen Element nachgewiesen

(61). Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre es deshalb möglich, dass die LEE-PAI von RW1374 ebenfalls durch eine konjugative Transposition übertragen wurde.

Zum Zwecke des Konjugationsexperiments wurde zunächst das innerhalb des LEE<sub>RW1374</sub> lokalisierte Intimin-Gen (*eae*) durch die Insertion eines Plasmids (pST76-A) mit dem Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin markiert, um Transkonjuganten besser selektionieren zu können. Schließlich war es jedoch nicht möglich, den LEE<sub>RW1374</sub> via Konjugation zu mobilisieren und auf apathogene *E. coli*-Laborstämme zu übertragen. Dieses Resultat lässt die Schlussfolgerung zu, dass der LEE<sub>RW1374</sub> offenbar nicht mittels Konjugation übertragen wurde. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass dennoch ein LEE-Transfer via Konjugation in einer extrem geringen Häufigkeitsrate stattfand, der im Verlauf des Experiments nicht wahrgenommen wurde.

Zusätzlich zu den IS-Elementen weist ein am linken Ende der LEE-PAI lokalisiertes P4-Integrase-Gen auf einen Bakteriophagen-vermittelten LEE-Übertragungsmechanismus via Transduktion hin. Dafür im Institut durchgeführte Transduktionsversuche konnten jedoch ebenfalls keine Mobilisierung und Übertragung des LEE erreichen (70).

Auch wenn der LEE<sub>RW1374</sub> mittels durchgeführter Konjugations- und Transduktionsversuche nicht mobilisiert und übertragen werden konnte, kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass er einst über den Weg der konjugativen Transposition oder Transduktion unter AE-positiven Bakterien verbreitet wurde.

### 5.3 Markierung und Klonierung der LEE-PAI

Neben den Untersuchungen zum Insertionsort der LEE-PAI in verschiedenen AE-positiven Enterobakterien und der Mobilisierung des LEE<sub>RW1374</sub> bestand ein weiterer Teil der Arbeit darin, die LEE-PAI<sub>RW1374</sub> zu markieren und aus dem Genom herauszuschneiden. Zu diesem Zweck wurde eine in der Literatur bereits beschriebene Methode angewendet, um mit dessen Hilfe in die flankierenden Bereiche der innerhalb des *pheV*-tRNS-Locus inserierten LEE-PAI des bovinen EHEC-Stammes RW1374 jeweils eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NotI* einzufügen und die LEE-PAI (120 kb) *in toto* aus dem Genom zu isolieren (114). Die Markierung der LEE-PAI<sub>RW1374</sub> geschah durch die Insertion von Plasmid-Vektoren, die die Erkennungssequenz für *NotI* tragen. Die aus dem Genom isolierte LEE-PAI könnte in zukünftigen Arbeiten beispielsweise in *E. coli* K12-Laborstämme übertragen werden, um deren pathogenes Potential in folgenden Experimenten zu überprüfen. Des weiteren könnte die isolierte LEE-PAI<sub>RW1374</sub> der intensiveren Charakterisierung der auf

ihr lokalisierten Virulenzfaktoren sowie des LEE-Regulationsmechanismus von EHEC-Stämmen dienen. Auch die LEE-PAI-freie RW1374-Mutante könnte hinsichtlich ihrer eventuell noch verbliebenen Pathogenität untersucht werden. RW1374 gehört zur Serovar O103:H2. Diese Serovar wurde sowohl von kranken Menschen als auch von kranken Kälbern isoliert (91, 92, 169). Versuche mit EHEC-O103:H2-Mutanten ließen den Rückschluss zu, dass die Enteropathogenität dieser Serovar offenbar unabhängig von der Ausbildung der AE-Läsionen und der Bildung des Shiga-Toxin 1 ist (151). Die Herstellung einer LEE-PAI-freien Mutante könnte diese Aussage insofern verifizieren, dass eine Charakterisierung von Virulenzfaktoren erfolgt, die außerhalb der LEE-PAI lokalisiert sind.

Es war vorgesehen, die linke *pheV* flankierende Region mit dem Plasmid pSG76-A und die rechte *pheV* flankierende Region mit dem Plasmid pST76-C zu markieren. Nach Durchführung der Markierungsexperimente gelang es aber nicht, die LEE-PAI<sub>RW1374</sub> beidseitig zu markieren und somit eine LEE-PAI-freie Mutante herzustellen.

Nachdem zunächst pSG76-A ins Genom inseriert wurde, stellte die Insertion von pST76-C ein Problem dar. Obwohl nach Durchführung der Elektroporation scheinbare Rekombinanten selektioniert werden konnten, wurde bei keinem der überprüften Rekombinanten eine pST76-C-Insertion in die rechte *pheV* flankierende Region von RW1374::pSG76-A mittels verschiedener PCR-Analysen nachgewiesen. Der Anteil falsch-positiver Rekombinanten lässt sich durch das extrachromosomale Auftreten des rekombinanten Insertionsplasmids erklären, das den Zellen eine Resistenz gegen Chloramphenicol verleiht. Es traten einige wenige „falsche Rekombinanten“ bei einer Temperatur von 42 °C auf, die auf eine Insertion des Plasmids hindeuteten. Der Grund für dieses Auftreten ließe sich durch einen Defekt des temperatursensitiven Replikationssystems (pSC101<sup>ts</sup>) von pST76-C erklären, welches dem Plasmid bei einer Temperatur ab >37 °C keine Replikation mehr erlaubt und für uns ein Hinweis auf die Insertion von pST76-C infolge einer homologen Rekombination war. Es wurde sogar mittels PCR mit einem pST76-C-spezifischem Primerpaar (pST76C1-pST76C2) ein nicht integriertes rekombinantes pST76-C-Plasmid in RW1374::pSG76-A-Rekombinanten nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt). Auch eine Hybridisierung mit der Sonde, die für das Chloramphenicol-Gen spezifisch ist, ergab ein Signal einer etwa 4 kb großen DNS-Bande, welches als ein Hinweis auf ein nicht integriertes rekombinantes Plasmid zu werten ist (s. Abb. 19, Punkt 4.2.2). Eine zusätzlich durchgeführte Hybridisierung mit der DNS-Sonde für das LEE-charakterisierende Intimin-Gen (*eae*) bestätigte zudem die erfolglose beidseitige Markierung der LEE-PAI (s. Abb. 18, Punkt 4.2.2). Denn bei einer Exzision der LEE-PAI

hätte ein etwa 120 kb großes DNS-Fragment mit der *eae*-Sonde hybridisieren sollen. Auch die Hybridisierungen mit den DNS-Sonden, die spezifisch für den linken und rechten *pheV* flankierenden Bereich sind, bestätigten, dass nur eine Markierung des linken *pheV* flankierenden Bereichs stattgefunden hatte. Denn infolge der Rekombination und Insertion von pSG76-A in die linke *pheV* flankierende Region fand einerseits eine Verdopplung des flankierenden Bereichs statt, andererseits wurde eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Beides sind somit Gründe für die zwei mit der Sonde für den linken *pheV* flankierenden Bereich hybridisierten DNS-Fragmente (s. Abb. 20, Punkt 4.2.2). Das Hybridisierungssignal einer 800 kb großen Bande mit der für die rechte *pheV* flankierenden Region spezifischen DNS-Sonde spricht für einen unveränderten rechten LEE-PAI flankierenden Bereich.

Die erfolglos verlaufene Integration von pST76-C in die rechte *pheV* flankierende Region von RW1374 ließ vermuten, dass dieser Bereich womöglich eine andere DNS-Sequenz oder Deletionen enthält als der 3'-flankierende Bereich von *pheV* aus MG1655, mit dessen Hilfe das 1 kb große PCR-Amplifikat hergestellt wurden, das mittels homologer Rekombination in RW1374 integrieren sollte. Diese Annahme bestätigte sich dadurch, dass für die Herstellung eines etwa 4 kb großen PCR-Produktes, welches ebenfalls zur homologen Rekombination eingesetzt wurde, nur der *E. coli* K12-Laborstamm MG1655 als DNS-Templete genutzt werden konnte. Mit RW1374 als DNS-Template ließ sich kein entsprechendes PCR-Amplifikat generieren. Jedoch widerspricht diese Vermutung der zuvor durchgeführten Hybridisierungen zur Bestimmung des LEE-Insertionsortes von RW1374, die im 3'-flankierende Bereich von *pheV* keine Deletionen nachwiesen. Auch die erfolgreiche Insertion des Plasmids pST76-A via homologer Rekombination in die rechte *pheV* flankierende Region von RW1374 widerlegte diese Hypothese. Demnach muss es einen anderen Grund für die unmögliche Insertion von pST76-C in die rechte *pheV* flankierende Region geben.

Die Anwesenheit von intakten IS626-Elementen und weiteren Mobilitätsmerkmalen (P4-Integrase) in den LEE-flankierenden Bereichen der *pheV*-PAI<sub>RW1374</sub> könnten z.B. eine RecA-abhängige Rezirkularisierung eines LEE-enthaltenden Abschnitts der *pheV*-PAI bewirken (69). Die spontane Deletion des LEE könnte durch das Wachstum in LB-Medium gefördert werden. Vermutlich sind diese Wachstumsbedingungen geeignet, dass bestimmte Virulenzfaktoren nicht mehr benötigt und infolge dessen deletiert werden. Ein Verlust von Virulenzfaktoren wurde bereits beim Wachstum anderer Bakterien unter Laborbedingungen beobachtet (76, 41). PAIn, die noch nicht durch Homing stabil ins Genom inseriert sind,

werden oft spontan über dieselben Mobilitätselemente deletiert, die ursprünglich zu ihrer Integration beitragen (18, 50). Die im *pheU*-Locus des UPEC-Stammes J96 inserierte PAI II<sub>J96</sub> wird mit einer Frequenz von  $10^{-5}$  spontan deletiert (17, 154). Die *she*-Insel von *S. flexneri* 2a ist ebenfalls instabil und deletiert mit einer Frequenz von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$ . An den Flanken dieser PAI wurden ebenfalls IS-Elemente (IS629, IS600, IS2) gefunden (116). Vor kurzem wurde die spontane Deletion eines LEE nachgewiesen, der im *pheV*-Locus des REPEC-Stammes 84/110-1 (O103:H2) inseriert ist (157). Im Verlauf unserer Untersuchungen zur beidseitigen Markierung der LEE-PAI<sub>RW1374</sub> konnten wir jedoch indirekt durch einen 48 h-PFGE-Lauf zeigen, dass es nicht zu einer Deletion des LEE<sub>RW1374</sub> kam (Ergebnis nicht gezeigt). Dennoch wäre es zur weiteren Untersuchung hinsichtlich einer spontanen Deletion der LEE-PAI<sub>RW1374</sub> interessant, die spontane Deletionsrate des LEE zu ermitteln. Dafür könnte die Methode von Rajakumar et al. (117) angewendet werden. Durch die Insertion einer Tetrazyklin-Resistenzgen-Kassette in die *she*-Insel von *S. flexneri* 2a war es möglich, die Deletionsrate dieser Insel anhand von Tetrazyklin-empfindlichen Mutanten zu bestimmen (117).

Generell stellte der Versuch, ein zweites Plasmid in einen bereits markierten Stamm zu inserieren, ein Problem dar. Dies belegte auch der Markierungsversuch des bereits am rechten *pheV* flankierenden Bereichs markierte Stamm RW1374::pST76-A. Es schien auch diesmal nicht möglich zu sein, die linke *pheV* flankierende Region mit pSG76-C zu markieren – ebenso wie die erfolglose linksseitige pSG76-C-Markierung des Intimin-mutagenisierten Stammes RW1374::*eaep*ST76-A und die linksseitige pSG76-C-Markierung des DEC-Stammes 3030A-86::pST76-A. Eine Möglichkeit der Bewältigung dieses Problems bietet sich in der Verwendung der für pSG76-C empfohlenen Helferplasmide pPIR-A oder pPIR-K (114). Diese Helferplasmide ermöglichen die Replikation von pSG76-C in einem Temperatur-abhängigen Mechanismus. Sie führen somit zu einer Erhöhung der Kopienzahl des rekombinanten pSG76-C-Vektors und steigern die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Insertion.

Ein Versuch, das Problem der nicht-Insertion von pST76-C zu lösen, sollte die mehrtägige Inkubation von RW1374::pSG76-A mit dem rekombinanten Plasmid pST76-C darstellen, welches einmal das 1 kb sowohl das 4 kb große homologe Insert des zu rekombinierenden linken *pheV*-Bereichs beherbergte. Ein größerer homologer Bereich stellt zudem eine höhere Rekombinationrate dar. Jedoch konnte die Hoffnung auf das gewünschte Rekombinationsziel

infolge einer erhöhten Rekombinationswahrscheinlichkeit mittels PCR nicht bestätigt werden. Vielmehr offenbarte die anschließend durchgeführte Hybridisierung mit der spezifischen Chloramphenicol-Gen-Sonde (Cm-Sonde), dass scheinbar die Plasmide pSG76-A und pST76-C aufgrund einer 700 bp großen identischen Sequenz (die etwa der Größe der zu klonierenden homologen *E. coli* K12-Sequenzen entspricht) miteinander rekombinierten, obwohl diese Wahrscheinlichkeit durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Plasmid-Familien minimiert sein soll (114). Den Hinweis auf die Insertion von pST76-C in das bereits vorhandene Insertionsplasmid pSG76-A lieferte der Vergleich mit den gleichzeitig durchgeführten Hybridisierungen mit der *eae*-Sonde und der Sonde für den linken *pheV* flankierenden Bereich. Denn es reagierte jeweils dasselbe 800 kb große DNS-Fragment mit der Cm- und der *eae*-Sonde sowie die beiden 800 kb und 700 kb großen DNS-Fragmente mit der Cm- und der linken *pheV*-Sonde (s. Abb. 22, Punkt 4.2.2). Dieses 800 kb große DNS-Fragment beherbergt die innerhalb des *pheV*-Locus inserierte LEE-PAI, die linksseitig mit pSG76-A markiert ist. Auch spricht das Hybridisierungssignal der kleinen 4 kb großen DNS-Bande mit der Cm-Sonde für das Auftreten eines extrachromosomalen Insertionsvektors, wie es schon zuvor einmal ermittelt wurde. Das weitere Hybridisierungssignal einer 400 kb großen DNS-Bande deutet zwar auf eine Insertion von pST76-C ins Genom hin, aber aufgrund des 4 kb großen homologen Inserts inserierte das Plasmid beliebig ins Genom, als es auf einen ausreichend homologen Bereich traf. Auch das Hybridisierungssignal des 800 kb großen DNS-Fragments mit der *eae*-Sonde bestätigte eher diese Vermutung (s. Abb. 22, Punkt 4.2.2).

Ob auch bei den anderen zu markierenden Stämmen eine Rekombination zwischen den beiden Plasmiden stattgefunden hat, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Es wurde aber auch nicht bestätigt, da dazu keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt wurden. Eine eventuell durchgeführte Markierung wurde nur mit Hilfe von PCR-Analysen überprüft.

Um dennoch die LEE-PAI aus RW1374 zu isolieren, wurde versucht, sie in einen BAC-Vektor (TrueBlue<sup>®</sup>-BAC2) zu klonieren. Zu diesem Zweck sollte ein 70 kb großes DNS-Fragment, welches den größten Teil der LEE-PAI<sub>RW1374</sub> enthielt, kloniert werden, was schließlich nicht gelang. Ein Grund dafür, sowie für die ebenso erfolglose Klonierung der LEE-PAI des *C. rodentium*-Stammes DBS100, könnte die Verwendung von DH5 $\alpha$  als kompetente Zelle sein anstatt der für den BAC-Vektor empfohlenen DH10B-Zellen (Genomics One Corporation). In Vorversuchen stellten wir jedoch fest, dass die von uns

hergestellten elektrokompenten DH10B-Zellen eine geringere Transformationseffizienz aufwies als DH5 $\alpha$  (Ergebnis nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die Verwendung von DH5 $\alpha$  für die Klonierung bevorzugt. In zukünftigen Klonierungsexperimenten sollten jedoch die empfohlenen DH10B-Zellen verwendet werden, da diese Zellen zur Aufbewahrung großer DNS-Fragmente besser geeignet sind (155). Auch könnte eine noch strengere Einhaltung der Herstellungsbedingungen für elektrokompente Zellen oder gar der kommerzielle Erwerb der DH10B-Zellen zu einer verbesserten Transformationseffizienz führen. Da die Bildung falsch-negativer Klone bei der Verwendung dieses neuartigen Klonierungsvektors ausgeschlossen wird (142), muss davon ausgegangen werden, dass es zur Bildung falsch-positiver Klone kam, die eine erfolgreiche Klonierung der LEE-PAI vortäuschten.

Weitere Gründe für eine misslungene Klonierung und Isolierung der klonierten LEE-PAI könnten auf eine mögliche Instabilität oder Toxizität dieser PAI für die Empfängerorganismen (DH5 $\alpha$ ) zurückzuführen sein, die die Effizienz der Klonierung und Transformation dieser Insel unmöglich machten. Die Pathogenitätsinsel, die den LEE trägt, beherbergt neben dem LEE auch das *efal/lifA*-Gen (für: EHEC factor for adherence/lymphocyte inhibitory factor) sowie das *ent*-Gen, welches ein putatives Enterotoxin kodiert, das Ähnlichkeiten zum *Shigella* ShET-2-Enterotoxin aufweist (106, 70). Das *lifA*-Gen kodiert ein Clostridien-ähnliches Zytotoxin (Lymphostatin) und ist für das Widerstehen der Bakterien gegenüber einer zellulären Immunantwort verantwortlich (79). Diese Wirkung wurde jedoch nur bei EPEC beobachtet (152). EHEC besitzen dahingegen das identische *efal*-Gen, dessen Genprodukt (Efa1) an der *in vitro* Adhäsion und *in vivo* Kolonisation der Bakterienzellen beteiligt ist (108, 152). Es gibt jedoch einen ersten Hinweis darauf, dass *efal* auch an der Adhäsion von EPEC an Epithelzellen beteiligt ist (12). Versuche, das *efal*-Gen von EHEC zu klonieren, wiesen auf eine mögliche Toxizität und Instabilität des Gens hin (108, 152), weshalb auch das ein Grund für den Misserfolg unserer LEE-PAI-Klonierung sein könnte.

Die direkte Kombination dieser drei Virulenzfaktoren innerhalb der LEE-PAI ist für AE-positive Bakterien eher untypisch, wurde aber bereits für den lapinen *E. coli*-Stamm 83/39 beschrieben (157). Dennoch sind diese einzelnen Virulenzfaktoren unter zahlreichen AE-Pathogenen verbreitet (79, 108, 157, 174). Auch wenn *efal* an der bakteriellen Adhäsion von EHEC und EPEC beteiligt ist, hat das *efal/lifA*-Genprodukt keinen nennenswerten Einfluss auf die Ausbildung von Attaching and Effacing-Läsionen (79, 108). In neueren Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass Efa1 die Expression und Sekretion LEE-kodierter Proteine (EspA, Tir) beeinflusst (152). Dennoch kommt den innerhalb des LEE

kodierten Genen die primäre Bedeutung in der Ausbildung von AE-Läsionen zu, allem voran das für das bakterielle Adhäsin Intimin kodierende *eae*. Erst die Interaktion einzelner LEE-kodierter Proteine (EspA, -B, -D, Tir, Intimin) kennzeichnet die Virulenz AE-positiver Bakterien (44, 56). Mutationen des *eae*-Gens von EPEC und *C. rodentium* resultierten in einer verminderten Virulenz dieser Stämme (133, 35). Aus diesem Grund war es interessant, den in dieser Arbeit am *eae*-Gen mutagenisierten EHEC-Stamm RW1374 hinsichtlich seiner Fähigkeit, in einem funktionellen Testsystem (FAS-Test) AE-Läsionen auszubilden, zu untersuchen. Die Auswertung des infolge einer fehlenden Aktin-Akkumulation unterhalb anhaftender Bakterien als negativ zu bewertenden FAS-Tests lies die Schlussfolgerung zu, dass es nicht zu einer Ausbildung von AE-Läsionen in der HEp2-Zellkultur kam (80). Somit konnte die Bedeutung von Intimin an der initialen Adhäsion von EHEC an Epithelzellen, die der Ausbildung der AE-Läsion vorausgeht, bestätigt werden (44). Gleichzeitig wurden auch die einseitig an der LEE-PAI markierten Stämme RW1374::pSG76-A und RW1374::pST76-A im FAS-Test untersucht. Beide LEE-PAI-Mutanten lösten in der HEp2-Zellkultur AE-Läsionen aus. Dieses Ergebnis lieferte einerseits den Beweis dafür, dass eine Mutation an den Flanken der LEE-PAI keinen Einfluss auf die Ausbildung von AE-Läsionen hat. Andererseits bewirkt eine Mutagenisierung der LEE-PAI durch Insertion eines Suizid-Vektors keine Deletion dieser genomischen Insel.

Für zukünftige Untersuchungen der LEE-PAI des bovinen EHEC-Stammes RW1374 (O103:H2) wäre es dennoch interessant, die 120 kb große LEE-PAI *in toto* zu isolieren, um sie in apathogene *E. coli*-Laborstämme zu transformieren. Jene Untersuchungen würden umfassendere Aussagen über die pathogenen Eigenschaften dieser Insel ermöglichen, die einerseits auf dem LEE, andererseits auf zusätzlichen Virulenzfaktoren (*ent*, *efa1/lifA*) beruhen.