Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Vergleichende molekulare und funktionelle Analyse des "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE) im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Sylke Behrend, geb. Wagner Tierärztin aus Fürth

Berlin 2008

Journal Nr.: 3181

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. Ortwin Simon
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Gerd Schlenker

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cattle, cattle diseases, gastroenteritis, Escherichia coli, enterotoxins, reservoir hosts, virulence, genetics, pathogenicity, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 28. Februar 2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek* Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN-10: 3-86664-391-8 ISBN-13: 978-3-86664-391-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008 D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Meinen Kindern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Verwendete Bakterienstämme	17
3.1.2	Verwendete Plasmidvektoren	18
3.1.3	Eukaryotische Zellkultur	18
3.1.4	Chemikalien, Nährmedien und Lösungen	18
3.1.5	Oligonukleotid-Primer und DNS-Sonden	26
3.1.6	Geräte und Labormaterial	29
3.2	Methoden	31
3.2.1	Stammhaltung und Bakterienanzucht	31
3.2.2	Bestimmung der hämolytischen Aktivität	31
3.2.3	Bestimmung der Lysin-Decarboxylase Aktivität	31
3.2.4	DNS-Analytik	32
3.2.4.1	Isolierung genomischer DNS	32
3.2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNS	32
3.2.4.3	DNS-Konzentrationsbestimmung	32
3.2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.2.4.5	DNS-DNS-Hybridisierung	34
3.2.4.6	DNS-Klonierung	35
3.2.4.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNS	36
3.2.4.8	Eluierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.2.4.9	DNS-Sequenzanalyse	37
3.2.5	RNS-Analytik	37
3.2.5.1	RNS-Isolierung	37
3.2.5.2	RNS-Konzentrationsbestimmung	37
3.2.5.3	Reverse Transkription	37

3.2.6	Protein-Analytik	38
3.2.6.1	Protein-Sequenzanalyse	38
3.2.6.2	Klonierung von DNS-Fragmenten in Expressionsvektoren	38
3.2.6.3	Induktion und Expression der rekombinanten Proteine	39
3.2.6.4	Zellaufschluss und Gewinnung von Protein-Rohextrakt	40
3.2.6.5	Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	40
3.2.6.6	Protein-Konzentrationsbestimmung	41
3.2.6.7	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.2.7	Immunologische Methoden	41
3.2.7.1	Gewinnung polyklonaler Antikörper	41
3.2.7.2	Immunoblot	42
3.2.7.3	Adsorption der Immunseren mit E. coli-K12-Proteinen	42
3.2.8	Methoden der Zellkultur	43
3.2.8.1	Kultivierung der HEp2-Zelllinie	43
3.2.8.2	Zellkulturtest zum Nachweis von Efa1/LifA	44
3.2.9	Computerprogramme	45
4	Ergebnisse	46
4 4.1	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)	46 46
4 4.1 4.1.1	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) Sequenzanalyse der LEE-PAI	46 46 46
4 4.1 4.1.1 4.1.2	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) Sequenzanalyse der LEE-PAI Analyse der offenen Leserahmen	46 46 46 49
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) Sequenzanalyse der LEE-PAI Analyse der offenen Leserahmen Charakterisierung der Gene <i>efa1/lifA</i> und <i>ent</i> sowie deren Produkte	46 46 46 49 49
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) Sequenzanalyse der LEE-PAI Analyse der offenen Leserahmen Charakterisierung der Gene <i>efa1/lifA</i> und <i>ent</i> sowie deren Produkte Vergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 Regionen	46 46 49 49 53
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) Sequenzanalyse der LEE-PAI Analyse der offenen Leserahmen Charakterisierung der Gene <i>efa1/lifA</i> und <i>ent</i> sowie deren Produkte Vergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 Regionen Nachweis der OI-122 in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	46 46 49 49 53 57
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 4.4.1	Ergebnisse Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) Sequenzanalyse der LEE-PAI Analyse der offenen Leserahmen Charakterisierung der Gene <i>efa1/lifA</i> und <i>ent</i> sowie deren Produkte Vergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 Regionen Nachweis der OI-122 in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen Vorkommen der virulenzassoziierten Gene <i>efa1/lifA</i> , <i>ent</i> und <i>pagC</i>	46 46 49 49 53 57 57
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 4.4.1 4.4.2	ErgebnisseCharakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)Sequenzanalyse der LEE-PAIAnalyse der offenen LeserahmenCharakterisierung der Gene efa1/lifA und ent sowie deren ProdukteVergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 RegionenNachweis der OI-122 in verschiedenen E. coli-StämmenVorkommen der virulenzassoziierten Gene efa1/lifA, ent und pagCKombination und Lokalisation der virulenzassoziierten Gene efa1/lifA, ent und pagC	46 46 49 49 53 57 57 57
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 4.4.1 4.4.2 4.4.3	ErgebnisseCharakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)Sequenzanalyse der LEE-PAIAnalyse der offenen LeserahmenCharakterisierung der Gene efa1/lifA und ent sowie deren ProdukteVergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 RegionenNachweis der OI-122 in verschiedenen E. coli-StämmenVorkommen der virulenzassoziierten Gene efa1/lifA, ent und pagCKombination und Lokalisation der virulenzassoziierten Gene efa1/lifA, ent und pagCAssoziation zwischen dem Auftreten der OI-122 und der LEE- PAI	46 46 49 49 53 57 57 59 60
4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.3 4.5	ErgebnisseCharakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)Sequenzanalyse der LEE-PAIAnalyse der offenen LeserahmenCharakterisierung der Gene efa1/lifA und ent sowie deren ProdukteVergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 RegionenNachweis der OI-122 in verschiedenen E. coli-StämmenVorkommen der virulenzassoziierten Gene efa1/lifA, ent und pagCKombination und Lokalisation der virulenzassoziierten Gene efa1/lifA, ent und pagCAssoziation zwischen dem Auftreten der OI-122 und der LEE- PAIUntersuchungen zur Lokalisation der OI-122 im bakteriellen Chromosom	46 46 49 49 53 57 57 59 60 61

4.5.2	Bestimmung des Insertionsorts der OI-122 mittels PCR	62
4.5.3	Überprüfung des <i>cad</i> -Locus bei Lysin-Decarboxylase negativen <i>E. coli</i> -Stämmen	63
4.6	Funktionelle Analyse der virulenzassoziierten Faktoren Efa1/LifA und Ent	64
4.6.1	Nachweis der Genexpression von <i>efa1/lifA</i> und <i>ent</i> im EHEC- Stamm RW1374 (O103:H2)	64
4.6.2	Gewinnung von Efa1/LifA-Antigenen	65
4.6.3	Nachweis des Proteins Efa1/LifA mittels polyklonaler Antikörper im Immunoblot und im Zellkulturverfahren	69
4.6.4	Expressionsversuche der rekombinanten Ent-Proteine	76
5	Diskussion	78
6	Zusammenfassung	92
7	Summary	94
8	Anhang	96
Q	Literaturverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
A. bidest	bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AE	attaching-and-effacing
AEEC	attaching-and-effacing-E. coli
Ag	Antigen
Ail	attachment invasion locus protein
Ak	Antikörper
APEC	aviäre pathogene <i>E. coli</i>
AS	Aminosäure
АТСС	American Type Culture Collection
ΑΤΡ	Adenosintriphosphat
bfpA	Strukturgen des bundle forming pili (BFP)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
С.	Citrobacter
С.	Chlamydia
С.	Clostridium
cDNS	copy-Desoxyribonukleinsäure
СНО	Chinesische Hamster Ovarzellen
C	Grad Celsius
D.	Dictyostelium
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEC	diarrhoeagenic <i>E. coli</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
Е.	Escherichia
eae	Strukturgen des Intimins (E. coli attaching-and-effacing-Gen)
EAF	EPEC adherence factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

efa1	Strukturgen des EHEC-Adhäsionsfaktors (EHEC factor for adherence 1)
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
ent	Shigella-ähnliches Strukturgen des Enterotoxins in EHEC
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ERIC	enteric repetitive intergenic consensus
espA	E. coli sezerniertes Protein A
espF	E. coli sezerniertes Protein F
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HC	hämorrhagische Colitis
HeLa	humanes Zervixkarzinom-Epithel
HEp2	humanes Larynxkarzinom-Epithel
HIS	Histidin
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
hyl _{ehec}	Operon des EHEC-Hämolysins
int	Strukturgen der Integrase
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactosidase
IS	Insertionssequenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
I	Liter
LB	Luria Bertani
LCT	large clostridial toxine
LDC	Lysin-Decarboxylase
LEE	locus of enterocyte effacement
Ler	LEE encoded regulator
lifA	Strukturgen des Lymphostatin (lymphocyte inhibitory factor A)
LIM	Lysin-Indol-Motilität
LMW	Low Molecular Weight
Lom	Lambda outer membrane protein
М	Molar
Mb	Megabasenpaar

mcs	multiple cloning site
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ΜΟΙ	Multiplicity of infection
mRNS	messanger-Ribonukleinsäure
MWG	Molecular Weight Marker
Ng	Nanogramm
nleB	Strukturgen des non-LEE-encoded effectorprotein B
nleE	Strukturgen des non-LEE-encoded effectorprotein E
nm	Nanometer
NM	nicht motil
NP	nicht pathogen
NT	nicht typisierbar
OD	Optische Dichte
OI	O-Insel
ОМР	outer membrane protein
ORF	open reading frame
Р.	Plasmodium
pagC	PhoP- (Phosphatase) aktiviertes Gen C
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
phe	tRNS-Gen für Phenylalanin
PI	Propidiumjodid
RDEC	rabbit diarrhoeagenic <i>E. coli</i>
REPEC	rabbit enteropathogenic E. coli
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
<i>S</i> .	Salmonella
<i>S</i> .	Shigella
SDS	Sodiumdodecylsulfat

sec	Sekunde
ShET-2	Shigella Enterotoxin 2
sel	tRNS-Gen für Selenocystein
spp.	Spezies
STEC	Shiga Toxin-bildende <i>E. coli</i>
Stx	Strukturgen des Shiga Toxins
Tab.	Tabelle
Tir	translozierter Intimin Rezeptor
toxB	Strukturgen des Toxin B
TRITC	Tetrametylrhodamin Isothiocyanat
tRNS	transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
v	Volt
ҮорТ	Yersinia outer membrane protein T

1 Einleitung

Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) sind häufige Krankheitserreger bei Mensch und Tier. Eine Untergruppe der STEC, enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), verursachen beim Menschen schwerwiegende lokale und systemische Erkrankungen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), die hämorrhagische Kolitis (HC) und die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) (KARCH et al., 2005; SMITH et al., 2002). Die STEC-Infektion bei Wiederkäuern verläuft dagegen meist klinisch inapparent. Lediglich bei Kälbern bis zur dritten Lebenswoche können Durchfallerkrankungen auftreten (PEARSON et al., 1999; HALL et al., 1985). Große und kleine Wiederkäuer werden als Hauptreservoir der Zoonoseerreger angesehen und menschliche Infektionen sind überwiegend mit direktem oder indirektem Kontakt zu Wiederkäuerfäzes assoziiert (GEUE et al., 2002; WIELER, 1997 a).

Um Strategien zur Minimierung der Ansteckungsgefahr für den Menschen zu entwickeln, müssen präzise Erkenntnisse über die bakteriellen Wirkungsmechanismen der Kolonisierung und Persistenz im Gastrointestinaltrakt der Wiederkäuer erlangt werden. Es gilt unter anderem, die Verbreitung und die Struktur der so genannten Pathogenitätsinseln (PAI) zu untersuchen, in welchen häufig wichtige Virulenzfaktoren lokalisiert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine PAI des bovinen O103:H2 EHEC-Stamms RW1374 bezüglich ihrer Struktur, der Lage im Genom und der Besonderheiten im Vergleich zu homologen PAIs anderer pathogener *E. coli* charakterisiert werden. Auf diese Weise sollten Einblicke in die Evolution LEE-positiver *E. coli* sowie eine mögliche Bedeutung virulenzassoziierter Gene aufgezeigt werden. Die PAI beinhaltet den "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE) sowie eine Variante der genetischen O-Insel (OI-) 122. Die im LEE-kodierten Gene vermitteln das typische Bild der Attaching-and-Effacing- (A/E-) Läsionen des Darmepithels (KAPER et al., 2004). Über die ursprünglich im EHEC der Serovar O157:H7 identifizierte OI-122 liegen bislang kaum Erkenntnisse vor, weshalb ihre Verbreitung und Struktur in pathogenen und nicht-pathogenen *E. coli* ermittelt werden sollte.

Funktionelle Studien sollten den Einfluss der innerhalb der OI-122 lokalisierten Faktoren Efa1, LifA und Ent in der Pathogenese der *E. coli* weiterführend erarbeiten. Das in nicht-O157 EHEC-Stämmen identifizierte *efa1* (*E. coli* factor for adherence) Gen ist in die bakterielle Anheftung an eukaryotische Zellen involviert (NICHOLLS et al., 2000). Das nahezu identische Gen *lifA* (lymphocyte inhibitory factor) der enteropathogenen *E. coli*

(EPEC) greift modulierend in die Immunantwort des Wirts ein (KLAPPROTH et al., 2000). So wird den Proteinen Efa1 und LifA eine entscheidende Rolle in der Kolonisierung und Persistenz von EHEC in Wiederkäuern zugeschrieben. Das in EHEC- und EPEC-Stämmen identifizierte Gen *ent* hat große Ähnlichkeit zu dem Enterotoxin-kodierenden *senA* der enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) und *Shigella* spp. Daten zur Wirkung des Ent liegen bislang nicht vor.

Um die Bedeutung der virulenzassoziierten Gene *efa1*, *lifA* und *ent* im EHEC RW1374 zu ermitteln, wurde ihre Expression mittels der Reversen Transkriptase PCR nachgewiesen. Des Weiteren wurden polyklonale Antikörper gegen Efa1/LifA und Ent generiert, indem Bereiche der Proteine Efa1/LifA und Ent kloniert, fremdexprimiert, aufgereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Mittels der spezifischen Antikörper sollten die Proteine des EHEC-Stamms RW1374 sowohl im Immunoblot als auch in direkter Wechselwirkung mit eukaryotischen Zellen im Zellkulturverfahren detektiert werden.

2 Schrifttum

Darmpathogene Escherichia coli

Escherichia (*E.*) *coli* sind im Intestinaltrakt von Mensch und warmblütigen Tieren vorkommende Gram-negative fakultative Anaerobier. Während einige Stämme apathogen sind und als Kommensale des Darmtrakts fungieren, weisen manche besondere Pathogenitätsmerkmale auf. Diese hoch adaptierten Stämme sind in der Lage z.T. letal verlaufende Erkrankungen beim Menschen auszulösen (KARCH et al., 2005; GRIFFIN et al., 1991; RILEY et al., 1983). Durch pathogene *E. coli* verursachte Infektionen beschränken sich entweder auf Schleimhautoberflächen oder führen zu einer Erregerstreuung durch den Organismus. Klinisch sind im wesentlichen Erkrankung des Harntrakts, Sepsis/Meningitis und Darmerkrankung/Durchfall festzustellen.

Wie bei anderen Schleimhautpathogenen besteht auch die Infektionsstrategie von E. coli zunächst in einer Kolonisation der Schleimhaut, dem Unterlaufen der Wirtsabwehr und der Vermehrung, resultierend in der Wirtsschädigung. Darmpathogenen E. coli (DEC) gemeinsam ist die Fähigkeit, die Darmschleimhaut trotz Peristaltik und Konkurrenz mit der autochthonen Darmflora zu besiedeln. Diese Eigenschaft ist auf spezifische Oberflächen-Adhäsionsfaktoren (Fimbrien) zurückzuführen, welche es darmpathogenen E. coli erlauben, die normalerweise unbesiedelte Dünndarm-Mukosa zu kolonisieren (VIAL et al., 1988; LEVINE 1987). Hat eine Kolonisierung stattgefunden, sind die darauf folgenden Infektionsschritte sehr vielfältig: Produktion von Enterotoxinen durch enterotoxische E. coli (ETEC) und enteroaggregative E. coli (EAEC), Invasion durch enteroinvasive E. coli (EIEC) in Enterozyten und/oder das enge anheften an Darmepithelzellen durch enteropathogene E. coli (EPEC) und enterohämorrhagische E. coli (EHEC) (NATARO und KAPER, 1998). Die dafür verantwortlichen Virulenzfaktoren werden auf z.T. mobilen DNS-Elementen wie kodiert Pathogenitätsinseln, Virulenzplasmiden, Transposons oder Bakteriophagen (HACKER et al., 1997; O'BRIEN et al., 1992).

In Tabelle 1 sind die Pathovare durchfallerregender *E. coli* mit ihren Virulenzfaktoren und Daten zu ihrer Epidemiologie aufgelistet.

Pathovar	Krankheitsbild	Inzidenz, Prävalenz	Hauptvirulenzfaktoren
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	Wässriger Durchfall (Cholera-ähnlich), Reisediarrhoe, Jungtierdurchfall	Kinder und Touristen in Entwicklungs- ländern, Nahrungsmittel- Infektion; Pathogen für Jungtiere	Enterotoxine (LT, ST), Wirtsspezifische fimbrielle Adhäsine
Enteropathogene <i>E.</i> <i>coli</i> (EPEC)	Wässriger Durchfall, Erbrechen, Jungtierdurchfall	Kinder in Entwicklungsländern, sporadisch in westlichen Ländern; Reservoir: symptomatische und asymptomatische Kinder und Erwachsene; Pathogen für Jungtiere	Bundle forming pilus (BFP), Locus of enterocyte effacement (LEE)
Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	Hämorrhagische Colitis (HC), Hämolytisch- urämisches Syndrom (HUS), thrombotisch- thrombozytopenische Purpura (TTP); Tier: blutiger Durchfall, Ödemkrankheit	Nahrungsmittel- Infektion der westlichen Länder; Reservoir: symptomatische Jungtiere und asymptomatische Adulte	Locus of enterocyte effacement (LEE), Adhäsine, Zytotoxine (Shiga Toxine, Enterohämolysin), pO157-Plasmid
Enteroaggregative <i>E.</i> coli (EAEC)	Chronisch persistierender Durchfall	Kinderdurchfall	Zytotoxine (EAST-1), Fimbrielle Adhäsine (AAF/I, AAF/II)
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Wässriger Durchfall (Ruhr-ähnliche Dysenterie)	Nahrungsmittel- Infektionen	Enterotoxine (ShET-1, ShET-2), OMP, 220 kb Plasmid (plnv)
Diffus adhärente <i>E. coli</i> (DAEC)	Assoziiert mit Durchfall	Möglicher Durchfallerreger der westlichen Länder	Fimbrie (F1845), 100 kDa OMP (AIDA-I)
Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)	Durchfall, Extraintestinale Infektionen	Pathogen für Mensch und Tier	Zytonekrosefaktor (CNF1, CNF2), CDT (cytolethal distending toxin)

Tab. 1: Pathovare darmpathogener Escherichia coli (NATARO und KAPER, 1998)

Shiga Toxin-bildende E. coli (STEC) und enterohämorrhagische E. coli (EHEC)

Shiga Toxin-bildende *E. coli* (STEC) besitzen grundsätzlich die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Zytotoxine, die die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen hemmen. Sie zeigen Ähnlichkeit zu den Toxinen von *Shigella dysenteriae* (Shiga Toxine, Stx) und Aktivität gegenüber Verozellen (KARMALI et al., 1983; O'BRIEN et al., 1983). Bestimmte STEC-Stämme die beim Menschen Krankheitserscheinungen, wie die hämorrhagische Kolitis (HC) das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) oder die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TPP) auslösen sowie neben den Shiga Toxinen Attaching-and-Effacing- (A/E-) Läsionen und Enterohämolysin bilden können, werden als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet (SMITH et al., 2002; LEVIN, 1987). Da STEC und EHEC gegenwärtig nicht eindeutig differenzierbar sind, werden in dieser Arbeit alle vom Menschen isolierten sowie alle potentiell humanpathogenen STEC (*stx-*, *eae-*, *hly*_{EHEC}-positiv) als EHEC bezeichnet (It. Falldefinition im Infektionsschutzgesetz).

EHEC können beim Menschen ein breites Spektrum klinischer Symptome hervorrufen. Diese erstrecken sich von leichtem Durchfall und akuten lokal entzündlichen Prozessen des Dickdarms über eine hämorrhagische Kolitis (HC) bis zu den postinfektiösen Syndromen. Als solche gelten das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) sowie die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), die insbesondere bei Kleinkindern und älteren Personen zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen können (ANDREOLI et al., 2002; GRIFFIN und TAUXE, 1991).

EHEC-Infektionen treten weltweit auf, stellen aber aufgrund von wachsender Massentierhaltung besonders in Ländern mit hochentwickelter Landwirtschaft und Industrie ein zunehmendes Problem für die Gesundheitsprävention dar (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2004, 2005; NATARO und KAPER, 1998). In vielen Ländern nimmt die Häufigkeit humaner EHEC-Infektionen in den letzten Jahren zu (KARCH et al., 2005; FRUTH et al., 2002; PATON und PATON, 1998; SLUTSKER et al., 1997). So stiegen die ermittelten Fallzahlen in Deutschland 2005 im Vergleich zum Vorjahr bei den Durchfall-Erkrankungen von 925 auf 1.162 (26 %) und bei HUS von 55 auf 79 (44 %) (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2006).

Die weltweit am häufigsten identifizierte EHEC-Serovar im Zusammenhang mit HUS ist E. coli O157:H7 (TOZZI et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2002; GERBER et al., 2002; BANATVALA et al., 2001; MEAD et al., 1999; MICHINO et al., 1998). Die Bedeutung von nicht-O157 EHEC bei humanen Erkrankungen wurde lange Zeit unterschätzt, da viele Proben von den diagnostischen Laboren routinemäßig nicht auf diese untersucht wurden. Aufgrund neuer diagnostischer Ansatzpunkte werden zunehmend die nicht-O157:H7 EHEC, insbesondere die Serovare O26, O103, 0111, und O145, ursächlich für

Durchfallerkrankungen und HUS in Europa identifiziert (BEUTIN et al., 2004; SONNTAG et al., 2004; WAGNER et al., 2004; TOZZI et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2002; FRUTH et al., 2002; GERBER et al., 2002; MORABITO et al., 2002; EKLUND et al., 2001; CAPRIOLI et al., 1997). Entsprechende Entwicklungen sind in Nordamerika (BROOKS et al., 2005; JELACIC et al., 2003; KLEIN et al., 2002; FEY et al., 2000; MEAD et al., 1999; BOKETE et al., 1997), Südamerika (VAZ et al., 2004) und Australien (ELLIOTT et al., 2001) zu beobachten. In einigen Ländern werden nicht-O157:H7 EHEC sogar häufiger im Zusammenhang mit humanen Erkrankungen identifiziert als EHEC O157:H7 (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2006; TOZZI et al., 2003; BETTELHEIM, 2003; ELLIOTT et al., 2001). In Deutschland ist der Sorbitol-fermentierende (SF) O157:NM, nach dem O157:H7, der zweit häufigste Verursacher von sporadischem HUS (FRIEDRICH et al., 2002; GERBER et al., 2002) sowie verantwortlich für zwei bedeutende Ausbrüche gewesen. (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2002; AMMON et al., 1999). Besonders die EHEC Serovare O26 und O103 gelten als sehr virulent und werden vermehrt aus intestinalen und extraintestinalen Infektionsgeschehen beim Menschen isoliert (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2006; ETHELBERG et al., 2004; FURTH et al., 2002; PRAGER et al., 2002; SCHMIDT et al., 1999; CAPRIOLI et al., 1997; MARIANI-KURKDJIAN et al., 1993).

Eine wichtige Quelle für humane EHEC-Infektionen sind Rinder, da sie den Erreger als transienten Vektor ihrer normalen gastrointestinalen Mikroflora asymptomatisch ausscheiden (MOXLEY, 2004; BEUTIN et al., 2000; HANCOCK et al., 1998; WELLS et al., 1991). Auch andere Wiederkäuer, wie Schafe, Ziegen und Rehe beherbergen den Erreger im Kot, weshalb sie als natürliche transiente Reservoire betrachtet werden (URDAHL et al., 2003; BIELASZEWSKA et al., 1997; KEENE et al., 1997). So sind EHEC-Infektionen häufig mit direkter oder indirekter Nahrungsmittelkontamination durch Wiederkäuerfäzes assoziiert (GEUE et al., 2002; LOCKING et al., 2001; O'BRIEN et al., 2001; WIELER et al., 2000). Auch Haus- und Wildkaninchen sowie Haus- und Wildvögel (GARCIA und FOX, 2003; LECLERCQ und MAHILLON, 2003; PRITCHARD et al., 2001; DELL'OMO et al., 1998; HEUVELINK et al., 1997; WALLANCE et al., 1997) sind Träger von EHEC und somit potentielle Infektionsverursacher. Weiterhin können STEC verschiedener Serovare aus Schweinen (HEUVELINK et al., 1999), Pferden (CHALMERS et al., 1997), Hunden (TREVENA et al., 1996) und einer wachsenden Zahl von Wildtieren (MAINIL, 1999) isoliert werden. Diese könnten möglicherweise als Vektoren bei der Übertragung auf landwirtschaftliche Nutztiere fungieren.

EHEC-bedingte Erkrankungen des Menschen sind in aller Regel auf den Konsum von kontaminiertem rohem oder nicht durcherhitztem Fleisch sowie nicht erhitzter Milch und

Schrifttum

Milchprodukte zurückzuführen (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2005; MERMIN und GRIFFIN 1999; MENG und DOYLE, 1998; ARMSTRONG et al., 1996). Weitere Infektionsquellen sind die Aufnahme bzw. der Verzehr von mit Wiederkäuerfäzes kontaminiertem Trink- oder Badewasser (HOLME, 2003; OLSON et al., 2002; McCARTHY et al., 2001), nicht pasteurisiertem Obstsaft (CODY et al., 1999; BESSER et al., 1993) oder diversem Gemüse (HILBORN et al., 1999; ITOH et al., 1998). Auch direkter Tier-Mensch-Kontakt ist als Übertragungsweg möglich, nachgewiesen in Streichelzoos und bei Besuchern landwirtschaftlicher Betriebe (PAYNE et al., 2003; CRUMP et al., 2002; O'BRIEN et al., 2001). Eine Infektkette von Mensch zu Mensch wurde in Familien, Kindertagesstätten, Altenheimen und Krankenhäusern identifiziert (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2004, 2005; KARCH et al., 1999).

Bislang ist unklar, ob alle in Tieren nachzuweisenden EHEC ein ernsthaftes Risiko für den Menschen darstellen. Aufgrund der hohen Verbreitungsdichte ist fraglich, ob landwirtschaftliche Nutztiere weiterhin als das Hauptreservoir angesehen werden können. Weltweit scheiden bis zu 82 % der Rinder STEC mit dem Kot aus (MOXLEY, 2004; GEUE et al., 2002) und in einigen Ländern sind bis zu 60 % der Rinderherden STEC-positiv (BURNENS et al., 1995). In Japan wurden die Shiga Toxin-Gene in Kotproben von 40-79 % der Rinder und Kälber nachgewiesen (SHINAGAWA et al., 2000). In den USA und Europa können bei durchschnittlich 15 % der gesunden Rinder fäkale EHEC-Stämme isoliert werden (BLANCO et al., 1997; BEUTIN et al., 1993; WELLS et al., 1991). Die EHEC-Prävalenz in europäischen Rinderherden variiert stark: in Spanien 14-37 % (BLANCO et al., 1996, 1997), in Nordirland 31 % (BALL et al., 1994); in Dänemark 0-61 % (HEUVELINK et al., 1998); in Deutschland liegt die EHEC-Prävalenz im Durchschnitt bei 55 % mit Angaben von 0-86 % bei verschiedenen Betrieben (WIELER et al., 2007; GEUE et al., 2002; WEBER et al., 1997; RICHTER et al., 1997). Die breiten Schwankungen erklären sich unter anderem durch unterschiedliche Nachweismethoden, das Alter der beprobten Tiere, die alternierende fäkale Ausscheidung sowie dem Zirkulieren des Erregers innerhalb der Rinderherden mit häufigen Infektionen und Reinfektionen einzelner Tiere (WIELER et al., 2007; GEUE et al., 2002).

Verbesserte und gezieltere Labordiagnostik ermöglicht in zunehmendem Maße die regelmäßige Isolierung von nicht-O157:H7 Serovaren aus Wiederkäuerfäzes und zeigt, dass gesunde Rinder die gleichen Serovare beherbergen, wie sie bei humanen EHEC-Infektionen und HUS isoliert werden, oftmals mit gleichen Kombinationen möglicher Virulenzgene (BEUTIN et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2001; WIELER et al., 1996). Mehrere Untersuchungen identifizieren für die häufig bei HC und HUS nachgewiesenen Serovare O26, O145 und O157 Rinder als transientes Reservoir (JENKINS et al., 2003; GEUE et al.,

2002; COBBOLD und DESMARCHELIER, 2001; WELLS et al., 1991) und die Übertragung von Tier zu Mensch kann belegt werden (WHO, 1998).

Der bei humanen Infektionen zunehmend an Bedeutung gewinnende SF EHEC O157:NM kann bislang weder in Haus- noch Wildtierfäzes nachgewiesen werden (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001), weshalb für diesen Stamm der Mensch als mögliches Reservoir in Betracht gezogen wird (KARCH et al., 2005).

Während der adulte Wiederkäuer weitgehend asymptomatischer Träger von EHEC ist, können bei neugeborenen Kälbern dem Menschen vergleichbare Enteritiden entstehen. Es lassen sich eine Atrophie der Mikrovilli, Zerstörung der Epithelzellen und eine diffuse Infiltration der Darmwand und des Darmlumen mit neutrophilen Granulozyten nachweisen. Pseudomembranöse Beläge aus Blut, Fibrin, Zelldebris und Neutrophilen führen zu einer wässrigen, zuweilen auch blutigen Diarrhoe (PEARSON et al., 1999; HALL et al., 1985). Allerdings reagieren die Kälber sehr unterschiedlich auf die EHEC. Es lässt sich eine starke Altersabhängigkeit, aber auch Abhängigkeit vom jeweiligen EHEC-Stamm beobachten. So zeigen Stämme der bei humanen Infektionen isolierten O157:H7 Serovar bei der Infektion konventioneller, aber auch fünf Tage alter gnotobiotischer Kälber einen asymptomatischen Verlauf (WOODWARD et al., 1999; CRAY und MOON, 1995) während neugeborene, kolostrumfrei aufgezogene Kälber an einer Enterokolitis erkranken (DEAN-NYSTROM et al., 1997). Untersuchungen zu Folge sind besonders Stämme der Serovare O5, O26, O103, O111 und O118 am Durchfallgeschehen von Kälbern beteiligt (GUNNING et al., 2001; DEAN-NYSTROM et al., 1997; WIELER et al., 1996; MOXLEY und FRANCIS, 1986). Für die EHEC-Serovar O118, das in Deutschland häufig aus Kälberdurchfällen isoliert werden kann, gelang sogar der Nachweis einer Übertragung auf den Menschen mittels molekularer Typisierung (BEUTIN et al., 2000; WIELER et al., 1998, 2000). Stämme der Serovar O103:H2 gelten bei Kälbern als regelmäßig krankmachend (MAINIL et al., 1999; WIELER et al., 1996) und konnten auch von einer Ziege mit enteralen Krankheitssymptomatik isoliert werden (DUHAMEL et al., 1992).

Tests an isolierten mittleren Ileumabschnitten ("ileal-loop-test") junger Kälber zeigen, dass ein O157:H7 EHEC-Stamm keine enteropathogenen Eigenschaften im Sinne eines Flüssigkeitseinstroms und der Einwanderung neutrophiler Granulozyten hatte, wohingegen die Inokulation mit einem EHEC der Serovar O103:H2 eine starke Wirtsabwehrreaktion hervor rief (STEVENS et al., 2002 a). Für die beobachtete Entzündungsreaktion war weder das Shiga Toxin noch die Kolonisierung der Schleimhaut durch die Bakterien Voraussetzung, wie dies durch Deletionsmutanten des O103:H2-Stamms gezeigt werden konnte. Das für die Darmkolonisation bedeutende *eae-* (*E. coli* attaching and effacing) Gen scheint ohnehin

keine zwingende Voraussetzung für einen enteropathogenen Verlauf der Infektion zu sein, da bereits *eae*-negative EHEC aus Kotproben gesunder sowie an Durchfall erkrankter Kälber isoliert wurden (JENKINS et al., 2002; WIELER et al., 1996; SANDHU et al., 1996) und auch *eae*-Nullmutanten zur Kolonisation weiter Teile des Darms bei Rindern und Schafen fähig sind (CORNICK et al., 2002; DEAN-NYSTROM et al., 1998). Es drängt sich der Verdacht auf, dass andere wesentliche Virulenzfaktoren für die Kolonisation und Persistenz der EHEC im Wiederkäuer verantwortlich sind.

Hauptvirulenzfaktoren der EHEC

Hauptvirulenzfaktoren der EHEC sind u.a. Zytotoxine, wie die Phagen-kodierten Shiga Toxine (Stx1, Stx2) sowie Adhäsionsfaktoren, wie der "Locus of enterocyte effacement" (LEE) und der EHEC factor for adherence (Efa1).

In dieser Arbeit werden nur ausgesuchte Faktoren näher beschrieben und auf die weiterführende Literatur verwiesen. So geben TORRES et al. (2005) einen weitreichenden Überblick zu den fimbriellen und nicht-fimbriellen Adhäsionsfaktoren der EHEC.

Shiga Toxine (Stx)

Das Hauptmerkmal der STEC ist ihre Fähigkeit zur Bildung der Shiga Toxine (Stx), die durch Inhibition verschiedener Proteinbiosynthesen Defekte oder den Tod der Globotetraosylceramid (Gb) Rezeptor-tragenden Zielzellen verursachen. Zu den sehr komplexen molekularen Wirkungsmechanismen gehören die direkte Zytotoxizität für Endothelzellen, Interaktion mit Zytokinen und Zellen der Immunabwehr, Beeinflussung der Hämostase mit folgenschweren Mikrozirkulationsstörungen (TARR et al., 2005).

Die Toxingene liegen auf temperenten Bakteriophagen (HEROLD et al., 2004), die an verschiedenen Stellen im Chromosom der STEC inseriert sind (SHAIKH und TARR, 2003). Biochemisch handelt es sich um rRNA-N-Glykosidasen, die die eukaryotische Proteinbiosynthese inhibieren. Serologisch werden zwei Familien, Stx1 und Stx2, unterschieden (O`BRIEN et al., 1992). Die Stx1-Familie besteht aus Stx1, Stx1c (FRIEDRICH et al., 2003; ZHANG et al., 2002) und Stx1d (KUCZIUS et al., 2004; BÜRK et al., 2003). Die Stx2-Gruppe ist weitaus heterogener, dazu gehören: Stx2c (SCHMITT et al., 1991), Stx2c2 (JELACIC et al., 2003), Stx2d (PIERARD et al., 1998), Stx2e (WEINSTEIN et al., 1998), Stx2f (MORABITO et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000) und Stx2g (LEUNG et al., 2003). Die Struktur und Wirkungsweise der Stx wird eingehend von MENGE (2006) dargestellt.

Die meisten aus HUS Patienten isolierten EHEC in Deutschland besitzen die Gene für Stx1, Stx2 oder Stx2c, einzeln oder in Kombinationen und sind *eae*-positiv (SONNTAG et al.,

2004; FRIEDRICH et al., 2002; FÜRST et al., 2000; ZHANG et al., 2000).

Locus of enterocyte effacement (LEE)

Der Locus of enterocyte effacement (LEE) ist eine 43,4 kb große, chromosomal gelegene Pathogenitätsinsel (PAI), die in EHEC- und EPEC-Stämmen sowie im mauspathogenen *Citrobacter rodentium* vorkommt. Sie kodiert unter anderem Intimin, ein Protein, das eine besondere Interaktion zwischen Bakterium und Zielzelle ermöglicht. Diese Interaktion wird als "attaching and effacing"- (A/E-) Läsion (KAPER et al., 2004; NATARO und KAPER, 1998), das verantwortliche Gen als "*E. coli* attaching and effacing-Gen" (*eae*) (DONNENBERG et al., 1993) bezeichnet. Der LEE liegt im Bereich des Selenocystein-tRNS (*sel*C) oder Phenylalanin-tRNS- (*pheU/pheV*) Abschnitts und zeigt 41 offene Leserahmen, bestehend aus folgenden Operons (SPERANDIO et al., 1999):

1. LEE1, LEE2 und LEE3 kodieren den Typ III-Sekretionsapparat (JARVIS und KAPER, 1996)

2. LEE4 exprimiert EspA, EspB und EspD (*E. coli* secreted protein) (FRANKEL et al., 1998; KENNY et al., 1996)

3. der translocated intimin receptor (Tir), auch LEE5 genannt, kodiert den Intimin-Rezeptor, das *eae*-Gen, ein Protein CesT und Map (mitochondrial associated protein) (KENNY, 2002; KENNY und JEPSON, 2000; JERSE und KAPER, 1991)

4. der LEE-regulator (Ler) (ELLIOTT et al., 2000).

Bei dem A/E-Phänomen adhärieren die Bakterien innig an die apikale Oberfläche der Enterozyten, wobei sie die Auflösung der Mikrovillistruktur und die Ausbildung von aktinreichen podestähnlichen Strukturen in den Enterozyten induzieren. Der LEE-kodierte Typ III-Sekretionsapparat schleust bakterielle Proteine in das Zytoplasma oder die apikale Membran der Wirtszelle (FRANKEL et al., 1998). Das Tir wird in die luminale Membran der Enterozyten eingebaut, wo es als Rezeptor für das äußere Membran-Protein Intimin (*eae*) fungiert. (DEVINNEY et al., 1999; JERSE et al., 1990). Der *ler* gilt als zentrales Regulationselement, der die für die Transkription benötigten LEE-Operons aktiviert und die Expression der LEE-kodierten Proteine steuert (ELLIOTT et al., 2000; FRIEDBERG et al., 1999).

Dem Intimin kann sowohl bei der Darm-Kolonisation von adulten Rindern und Schafen (CORNICK et al., 2002) sowie Kolostrum-entwöhnten Kälbern und Schweinen durch *E. coli* O157:H7 als auch bei der Induktion von Kolonödemen und Durchfällen eine Schlüsselrolle zugewiesen werden (DEAN-NYSTROM et al., 1998; MCKEE et al., 1995; DONNEBERG et al., 1993). Der Nachweis des *eae* gilt als zuverlässiger Marker für das Vorhandensein von LEE-positiven *E. coli* (GANNON et al., 1993), die Pathovar unabhängig als "attaching-and-

effacing *E. coli*⁺ (AEEC) bezeichnet werden (WIELER et al., 1996).

Sequenzanalysen offenbaren deutliche Unterschiede der LEE-PAIs in Größe, Komposition und Integrationsort im Bakterienchromosom, was ihre komplexe Phylogenie wiederspiegelt, während die funktionelle LEE-Kernregion hoch konserviert erscheint (JORES et al., 2004; TAUSCHEK et al., 2002; ZHU et al., 2001; ELLIOTT et al., 1998; PERNA et al., 1998; KARAOLIS et al., 1997; WIELER et al., 1997 b; MCDANIEL et al., 1995).

EHEC factor for adherence (Efa1) / Lymphocyte inhibitory factor (LifA)

NICHOLLS et al. (2000) identifizieren in einem O111:H- EHEC ein Gen, das die Adhäsion an kultivierte Ovarzellen von chinesischen Hamstern (CHO-K1) vermittelt. Das mit *efa1* (EHEC factor for adherence) bezeichnete Gen ist mit 9.672 bp das bislang größte in *E. coli*. EHEC *efa1*-Mutanten (O111:H-; O5:H-) induzieren in Infektionsversuchen mit jungen Kälbern, im Gegensatz zu den Wildstämmen, weder blutigen Durchfall noch sonstige klinische Krankheitsanzeichen und zeigen signifikant reduzierte fäkale Ausscheidung sowie eine deutlich geringere Adhäsion an das Kolonepithel (STEVENS et al., 2002 b). Des Weiteren weisen EHEC-Stämme mit mutagenisiertem *efa1* eine geringfügig erniedrigte Expression und Sekretion der LEE-kodierten Effektorproteine Tir und EspA auf, die jedoch ohne Auswirkung auf die Ausbildung des A/E-Phänotyps bleibt (STEVENS et al., 2002 b; NICHOLLS et al., 2000).

Im EPEC O127:H6 wurde ein efa1 Homolog identifiziert, das als lifA (lymphocyte inhibitory factor) und dessen Produkt als Lymphostatin bezeichnet wird und auf Aminosäureebene zu 97,4 % identisch mit dem Efa1 der nicht-O157:H7 EHEC ist. Das Lymphostatin (syn. LifA) inhibiert die mitogen-aktivierte Proliferation von humanen, murinen und bovinen peripheren Blut Lymphozyten und intestinalen intraepithelialen Lymphozyten sowie die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (ABU-MEDIAN et al., 2006; KLAPPROTH et al., 1995, 2000; MALSTROM und JAMES, 1998). Die inhibitorische Wirkung erstreckt sich auf die Expression des Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5 und gamma Interferons. Interleukine und Interferone wirken regulierend und modulierend auf die natürlichen Abwehrmechanismen des Organismus, indem sie die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems ermöglichen. Unter anderem induziert IL-2 die proliferative Reaktion von aktivierten T-Lymphozyten, IL-4 die Aktivierung und Proliferation von B-Lymphozyten sowie die gesteigerte Lebensfähigkeit und Vermehrung von T-Lymphozyten und Mastzellen. Gamma-Interferon aktiviert Makrophagen, natürliche Killerzellen und besitzt antivirale und antitumorale Wirkung. Eine Unterdrückung der Synthese dieser Kommunikationssubstanzen bedeutet somit eine Suppression der primären Immunantwort des Wirts (MENGE et al., 2001; KLAPPROTH et al., 2000).

Starke Adhäsionsfaktoren bei EPEC, wie die Plasmid-kodierten Typ IV Fimbrien ("bundle-

forming-pili", BFP), maskieren bzw. verhindern den Nachweis anderer Adhäsionsfaktoren (KLAPPROTH et al., 2000). Bei der Verwendung eines BFP-defizienten EPEC-Stamms (O127:H6) adheriert eine entsprechende *lifA*-Mutante in geringerer Anzahl, gegenüber dem Wildtypstamm, sowohl an CHO-K1 als auch an humanen Larynxkarzinomzellen (HeLA), ohne Beeinflussung der sezernierten Menge an EspA, Tir oder des A/E-Phänotyps (BADEA et al., 2003; STEVENS et al., 2002 b). Eine partielle Hemmung der Adhäsion an kultivierte Epithelzellen des plasmidfreien EPEC (O127:H6) mittels polyklonaler Antikörper gegen Lymphostatin ist möglich (BADEA et al., 2003).

Die für Lymphostatin beschriebene Fähigkeit zur Hemmung der mitogen-aktivierten Proliferation peripherer Blut Lymphozyten wurde unter Verwendung eines *stx*-negativen EHEC-Stamms (O103:H2) auch für Efa1 nachgewiesen (ABU-MEDIAN et al., 2006; STEVENS et al., 2002 a). Da Stx unter anderem die Aktivierung und Proliferation boviner Lymphozyten inhibiert (FERENS und HOVDE, 2000; MENGE et al., 1999), ermöglicht nur ein Stx-negativer EHEC die Identifizierung anderer immunmodulierender Faktoren. Obwohl der Δ stx EHEC O103:H2 *in vitro* eine Lymphostatin Aktivität besitzt, sind bovine intraepitheliale Darm Lymphozyten, die in einem Infektionsmodel *in situ* 12 h diesem Stamm ausgesetzt sind, phänotypisch hinsichtlich proliferativer Aktivität und Zytokin Profil nicht unterscheidbar zu jenen, die apathogenen *E. coli* oder sterilem Medium ausgesetzt sind (MENGE et al., 2004).

Aufgrund der hohen Übereinstimmung in der DNS- und AS-Sequenz von Efa1 und LifA sowie der jeweils nachgewiesenen inhibitorischen als auch adhäsiven Wirkung wird der Virulenzfaktor im Folgenden mit Efa1/LifA (*efa1/lifA*) bezeichnet.

Efa1/LifA stellt sich in den bislang sequenzanalysierten nicht-O157 EHEC, EPEC (KLAPPROTH et al., 2000; NICHOLLS et al., 2000), Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:NM (JANKA et al., 2002), Kaninchen enteropathogenen *E. coli* (TAUSCHEK et al., 2002; ZUH et al., 2001) sowie *C. rodentium* (KLAPPROTH et al., 2005) hoch konserviert dar. Nachzuweisen ist *efa1/lifA* in fast allen nicht-O157 EHEC-Serovaren, in EPEC, REPEC sowie in *C. rodentium* und *Escherichia alvei* (KLAPPROTH et al., 2000; NICHOLLS et al., 2000), wobei eine starke Assoziation zwischen *efa1/lifA* und dem A/E-Phänotyp vorliegt (TOMA et al., 2004; BADEA et al., 2003; SZALO et al., 2002). Efa1/LifA sowie dessen Homologe werden nicht für die Ausbildung der A/E-Läsionen benötigt und scheinen doch Virulenz-assoziierte Determinanten der A/E-Pathogene zu sein (NICHOLLS et al., 2000). BADEA et al. (2003) wiesen bei vier von fünf Kindern, die nach einer EHEC O1111:NM Infektion ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) entwickelt hatten, im Serum Antikörper gegen die mittlere sowie C-terminale Efa1/LifA-Region nach. In der gleichen Studie wurden

experimentell mit einem *efa1/lifA*-positiven REPEC (O15:H-) infizierte Kaninchen positiv auf Efa1/LifA-Antikörper getestet, was auf eine Expression des Virulenzfaktors während der Infektion hinweist. Spaltimpfstoffe basierend auf Efa1/LifA-Polypeptiden induzieren nach parenteraler Immunisierung von Rindern eine Immunantwort in Form von Serum IgG und Speichel IgA, die jedoch keinen signifikanten Effekt auf die intestinale Kolonisation durch Efa1/LifA-positive EHEC (O157:H7, O26:NM) hervorbringt (van DIEMEN et al., 2007).

Der Sequenzanalyse des *E. coli* O157:H7 Chromosoms der Stämme EDL933 (PERNA et al., 2001) und Sakai (HAYASHI et al., 2001) zufolge besitzen diese kein vollständiges *efa1/lifA* Gen, sondern eine trunkierte Version *efa1*' (2.130 bp). Diese kodiert für die ORFs *z4332* und *z4333*, deren Produkte Efa1a resp. Efa1b mit den Aminosäuren 1-433 resp. 435-710 des Efa1/LifA Proteins identisch sind. Ein Ausschalten des trunkierten *efa1*' mittels Transposon Insertion stromaufwärts oder Deletion des Gens führt zu reduzierter Adhäsion an humane Epithelzellen (Caco-2 und HeLa), hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die intestinale Kolonisation von Kälbern und Lämmern (STEVENS et al., 2004; TATSUNO et al., 2000). Das innerhalb der genetischen O-Insel 122 gelegene trunkierte *efa1*' ist bisher ausschließlich in den Serovaren O157:H7 sowie O145:NM nachgewiesen (TOMA et al., 2004) und laut Untersuchungen zur Prävalenz häufig mit EHEC-Isolaten aus ernsthaften und/oder epidemischen Krankheitsgeschehen assoziiert (KARMALI et al., 2003; MORABITO et al., 2003).

Des Weiteren liegt ein efa1/lifA-Homolog (toxB/17095) auf dem EHEC Virulenzplasmid pO157 vor (BURLAND et al., 1998; MAKINO et al., 1998). Das ToxB hat 28 %ige Übereinstimmung und 47 %ige Ähnlichkeit mit Efa1/LifA und wird neben den O157:H7 auch in nicht-O157:H7 EHEC sowie EPEC-Stämmen nachgewiesen (TOZZOLI et al., 2005; BADEA et al., 2003). EHEC-Stämme (O157:H7), die entweder kein pO157 oder eine toxB-Deletion beherbergen, zeigen (i) reduzierte Adhärenz an kultivierte humane Epithelzellen (STEVENS et al., 2004; TATSUNO et al., 2001) und (ii) einen Verlust der inhibitorischen Wirkung auf die IL-2 und IL-4 Synthese in mitogen-stimulierten humanen peripheren Blut Lymphozyten (KLAPPROTH et al., 2000; MALSTROM und JAMES, 1998). Die adhäsive Wirkung ist möglicherweise auf eine verminderte Produktion und Sekretion von LEEkodierten Typ III-Sekretionsproteinen (EspA, EspB, EspD und Tir) zurückzuführen, wobei die Ausbildung der A/E-Läsionen und die intestinale Kolonisation bei Kälbern und Schafen unbeeinflusst bleibt (STEVENS et al., 2004). Der Lymphostatin-ähnliche Effekt auf die ConAstimulierte Proliferation boviner periphere Blut Lymphozyten kann unter Verwendung eines stx-negativen O157:H7 EHEC mit einzelner oder kombinierter Deletion des trunkierten efa1 bzw. toxB nicht verifiziert werden (ABU-MEDIAN et al. 2006).

Organisation der virulenzassoziierten Faktoren Efa1/LifA und Ent in der genetischen O-Insel 122

Die Sequenzanalyse des gesamten *E. coli* O157:H7 Chromosoms der Stämme EDL933 (PERNA et al., 2001) und Sakai (HAYASHI et al., 2001) offenbart mehr als 170 chromosomale Inseln, die nicht in der *E. coli*-K12 Sequenz vorkommen. Einige der exogenen genetischen Inseln werden als potentielle PAIs betrachtet, da sie putative Virulenzfaktoren kodieren, einen geringeren G+C-Gehalt als das *E. coli*-Chromosom haben und in tRNS-Loci inseriert sind (HACKER und KAPER, 2001). Eine der genomischen O-Inseln, die OI-122, kommt bei allen O157:H7 EHEC, vielen nicht-O157 EHEC und EPEC vor. Von den nicht-O157 sind besonders die häufig aus epidemischen Infektionsausbrüchen und/oder HUS-Patienten isolierten Serovare Träger der O-Insel (KARMALI et al., 2003). Eine starke Assoziation zwischen der OI-122 und LEE-positiven Organismen wird beschrieben (MORABITO et al., 2003; KARMALI et al., 2003).

Die OI-122 der EHEC-Serovar O157:H7 ist 23 kb lang, im Phenylalanin (*phe*) *V*-tRNS-Locus inseriert und hat einen G+C-Gehalt von 45 %. Sie beinhaltet 26 offene Leserahmen (ORF für open reading frame) (Abbildung 1) mit zwei nicht-LEE kodierten Effektorproteinen NIeB (Z4328) und NIeE (Z4329), drei putativen Virulenzfaktoren: PagC (Z4321: Phosphatase P aktiviertes Gen), Ent (Z4326: Enterotoxin) und das aus zwei ORFs bestehende trunkierte Efa1' (Z4332, Z4333: EHEC factor for adherence), sieben hypothetischen Proteinen, einer Integrase, drei putativen Transposasen sowie neun Insertionssequenz-assoziierten ORFs (PERNA et al., 2001; HAYASHI et al., 2001).



Abb. 1: Schematische Darstellung der OI-122 des EHEC-Stamms EDL933 (O157:H7)

In Folgendem wird nur auf ausgesuchte Gene der OI-122 kurz eingegangen, wobei das Gen *efa1* und dessen Produkt bereits oben erläutert wurden.

Die Homologe der O157:H7 OI-122 ORFs Z4328 (*nleB*) und Z4329 (*nleE*) (non-LEEencoded effectors) sind im mauspathogenen *C. rodentium* außerhalb der LEE-Kernregion lokalisierte Effektorproteine des Typ III-Sekretionsapparats (DENG et al., 2004). Die translozierten Proteine NIeB und NIeE beeinflussen das *C. rodentium* verursachte Krankheitsbild der transmissiblen Kolonhyperplasie bei Mäusen hinsichtlich intestinaler Kolonisation, Hyperplasie des Kolonepithels, Mortalität sowie Infektionsdosis (WICKHAM et al., 2006, 2007; KELLY et al., 2006). Untersuchungen zur Wirkungsweise der beiden Virulenzfaktoren bei *E. coli*-Infektionen stehen noch aus.

Das putative Protein Ent ist ein Homolog des Enterotoxin ShET-2 enteroinvasiver E. coli (EIEC) und pathogener Shigellen spp. (BUCHRIESER et al., 2000; NATARO et al., 1995). Untersuchungen zur Wirkung des Ent liegen bislang nur von C. rodentium vor. In diesen zeigt eine Deletions-Mutante in experimentell infizierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion der intestinalen Kolonisation, verminderte Hyperplasie des Kolonepithels und führt zu einer verlängerten Überlebenszeit erkrankter Mäuse (WICKHAM et al., 2006). Der putative Virulenzfaktor PagC hat Sequenzähnlichkeit zu dem Phosphatase P-aktivierten Membranprotein von Salmonella enterica Serovar Typhimurium, das dem Erreger eine Serumresistenz vermittelt (PULKKINEN und MILLER, 1991). Die Versuche mit C. rodentium von WICKHAM et al. (2006) zeigen, dass PagC nicht für die krankheitstypischen histopathologischen Veränderungen der transmissiblen Kolonhyperplasie bei Mäusen nötig ist. Über die Wirkung der putativen Virulenzfaktoren Ent und PagC bei E. coli ist bisher nichts bekannt.

Homologe der OI-122, mit einem variierenden Repertoire an Virulenzgenen, werden in nicht-O157 EHEC sowie EPEC beschrieben. Während die ursprüngliche OI-122 für das trunkierte *efa1*' (2.130 bp) kodiert, beherbergen nicht-O157 EHEC und EPEC die große (9.672 bp) *efa1/lifA*-Genvariante (KLAPPROTH et al., 2000) und weisen zum Teil eine unvollständige OI-122 auf, der einige der putativen Virulenzgene fehlen. WICKHAM et al. (2006) beschreiben eine deutliche Korrelation zwischen dem kombinierten Vorkommen der Gene *pagC, ent, nleB* und *efa1/lifA* in nicht-O157 EHEC, die aus Krankheits- und/oder HUS-Geschehen isoliert werden.

Während die O157:H7 OI-122 entfernt von der LEE-PAI lokalisiert ist, zeigen Sequenzanalysen von den nicht-O157 EHEC-Stämmen 413/89-1 (O26:NM) und RW1374 (O103:H2) sowie dem REPEC-Stamm 83/39 (O15:H-) eine direkte Nachbarschaft der genetischen Elemente mit Insertion im gleichen tRNS-Locus (JORES et al., 2005;

TAUSCHEK et al., 2002), weshalb in diesen Fällen auch von einer Mosaik PAI gesprochen wird. Für den partiell sequenzierten REPEC-Stamm RDEC-1 (O15:H-) wird eine solche angenommen, da das *efa1/lifA* Gen unmittelbar stromaufwärts der LEE-Kernregion identifiziert wurde (ZHU et al., 2001). MORABITO et al. (2003) führen den Nachweis einer derartigen Mosaik PAI in einigen nicht-O157:H7 EHEC und EPEC.

CadBA-Operon

Enteroinvasive E. coli (EIEC) und einige Shigella spp. besitzen Veränderungen im Lysin-Decarboxylase (LDC) kodierendem cadBA-Operon, die zu einer Inaktivierung des Enzyms und folglich zu einer so genannten "pathoadaptiven Mutation" führen (MAURELLI et al., 1998). Der cad-Locus besteht aus den Genen cadA (Lysin-Decarboxylase), cadB (Lysin-Cadaverin-Antiporter) und cadC (Transkriptionsaktivator). Bei der Lysin-Decarboxylierung entsteht neben CO₂ Cadaverin, dessen Sekretion den Umgebungs-pH ansteigen lässt und so dem Bakterium ein Überleben in weniger saurem Milieu ermöglicht. Zusätzlich besitzt das Cadaverin eine antagonistische Wirkung auf die Enterotoxine (ShET-1 und ShET-2) bei Shigella flexneri (MAURELLI et al., 1998) und inhibiert die Induktion der transepithelialen Migration von Neutrophilen bei Shigella flexneri und EPEC (MICHAIL et al., 2003; McCORMICK et al., 1999; SAVKOVIC at al., 1996). Des Weiteren hat die Inaktivierung bzw. Mutation der cadBA Gene bei EHEC der Serovare O26, O111 und O157:H7 einen Adhäsions verstärkenden Effekt an humanen Epithelzellen (HeLa) zur Folge (TORRES et al., 2005; TORRES und KAPER, 2003). Während bei den Shigella spp. überwiegend Deletionen und Neuanordnungen des cadBA-Operons für das Ausschalten der LDC verantwortlich sind (DAY et al., 2001), sind es bei EIEC Insertionen von IS-Elementen innerhalb des cadC Gens sowie Punktmutationen im Promotor (CASALINO et al., 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Es wurden insgesamt 268 *E. coli* Stämme untersucht. Darunter die 72 Stämme der *Escherichia coli* Reference Collection (ECOR), welche nicht mit Erkrankungen assoziiert sind und die Vielfalt der Spezies *E. coli* widerspiegeln (OCHMAN und SELANDER, 1984). 35 Stämme gehören zu den von WHITTAM et al. (1993) in 15 klonale Gruppen eingeteilten, beim Menschen durchfallverursachenden *E. coli* (DEC). Die weiteren Stämme gehören unterschiedlichsten Serovaren an und wurden aus gesunden oder erkrankten Tieren und Menschen weltweit isoliert. Dazu zählen neben EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) und EPEC (enteropathogene *E. coli*), welche den Hauptteil stellen, auch APEC (aviäre pathogene *E. coli*), EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) sowie Stämme die keinem bekannten Pathovar zu zuordnen waren.

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Kontrollstämme und in Tabelle 3 die Laborstämme aufgeführt.

Stamm	Pathovar	Serovar	Virulenzfaktor/-gene	Herkunft	Referenz
EDL933	EHEC	O157:H7	<i>stx1, stx2</i> , LEE,	Mensch	O'BRIEN et al.,
			hly _{EHEC} , efa1', ent,		1983
			pagC		
E2348/69	EPEC	O127:H6	LEE, bfpA, efa1/lifA,	Mensch	McDANIEL et al.,
			ent, pagC		1995
413/89-1	EHEC	O26:NM	<i>stx1,</i> LEE, <i>hly_{EHEC}</i> ,	Rind	WIELER et al., 1992
			efa1/lifA, ent		
RDEC-1	REPEC	O15:H-	LEE, efa1/lifA, ent,	Kaninchen	CANTEY und
					BLAKE, 1977

Tab. 2: Liste der verwendeten Escherichia coli-Kontrollstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
MG1655	F λ-	BLATTNER et al., 1997
TOP10	F^{-} mcrA Δ (mrr -hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 Δ lacZM15 Δ lacX74	Invitrogen, Groningen (NL)
	<i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>end</i> A1	
	nupG	
DH5a	$F, \Phi 80\Delta lacZ\Delta M15, \Delta(lacZYA-argF)U169, recA1, endA1,$	RALEIGH et al., 1988
	$hsdR17 (r_{K}^{-}m_{K}^{+})$, supE44, λ^{-} , thi-1, gyrA96, relA1	
BL21	pLys3, F ⁻ dcm, ompT, hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻), galλ, DE3	STUDIER und MOFFATT,
		1986

Tab. 3: Liste der verwendeten Escherichia coli-Laborstämme

3.1.2 Verwendete Plasmidvektoren

Für die Expression der rekombinanten Proteine wurden die Plasmide pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Freiburg) und pBAD/HIS A (Invitrogen, Groningen (NL)) verwendet.

3.1.3 Eukaryotische Zellkultur

Zum Nachweis des Efa1/LifA-Proteins wurden eukaryotische HEp2-Zellkulturen verwendet. HEp2 ist eine adhärente Zelllinie, die aus einem humanen Larynxkarzinom stammt (ATCC-Nr.: CCL23; CRAVIOTO et al., 1979).

3.1.4 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen

<u>Chemikalien</u>

Folgende Kits wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen:

- MasterPure [™] Genomic DNA Purification Kit	Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf
- High Pure [™] PCR Product Purification Kit	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
- SV Total RNA Isolation System	Promega GmbH, Mannheim
- DC Protein Assay	BioRad, München
- Roti [®] -Elutions-Kit	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Die Enzyme und Oligonukleotid-Primer stammen von folgenden Firmen: Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostik mbH, Berlin , New England Biolabs[®] GmbH, Schwalbach/Taunus, Invitrogen, Groningen (NL), MWG Biotech, Ebersberg, Eurogentech, Seraing (B), Promega GmbH, Mannheim, Stratagene, Amsterdam (NL). Bezugsfirmen für weitere in dieser Arbeit verwendete organische und anorganische Reagenzien waren Acila GMNmbH, Walldorf, BioRad, München, Invitrogen, Groningen (NL), Life Technologies[™], Karlsruhe, Merck AG, Darmstadt, Oxoid Unipath GmbH, Wesel, Promega GmbH, Mannheim, Roth[®] GmbH & Co., Karlsruhe, Serva, Heidelberg, Sigma[®], Deisenhofen.

<u>Nährmedien</u>

LB-Medium (Luria Broth)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
		pH 7,0± 0,2
	autoklaviere	n bei 121 °C, 15 min
LB-Agar (Luria Bertani)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	1 <i>N</i> NaOH	1,00 ml
	Agar	15,00 g/l
		pH 7,0±0,2
	autoklaviere	n bei 121 °C, 15 min
LIM-Medium (Lysin-Indol-	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
Motilität)	Trypton	10,00 g/l
	Hefeextrakt	3,00 g/l
	L-Lysin Hydrochlorid	10,00 g/l
	Glucose	1,00 g/l
	Ammonium Eisen(III) Citrat	0,50 g/l
	Bromcresolpurpur	0,02 g/l
	Agar	2,00 g/l
		pH 7,0±0,2
	autoklaviere	n bei 121 ℃, 15 min

M9 Salze (5 x konz.)	Na ₂ HPO ₄	64,00 g/l
	KH ₂ PO ₄	15,00 g/l
	NaCl	2,50 g/l
	NH ₄ Cl	5,00 g/l
		pH 7,0±0,2
		autoklavieren bei 121 ℃, 15 min
M9 Minimal-Medium	5x M9 Salze	200,00 ml
	1M MgSO ₄	2,00 ml
	20 % Glucose	20,00 ml
	1M CaCl ₂	0,10 ml
	A. bidest	ad 1000 ml
		pH 7,0±0,2
Penassay-Medium	Rinderextrakt	1,50 g/l
	Hefeextrakt	1,50 g/l
	Pankreatisches Per	oton (Casein) 5,00 g/l
	Dextrose	1,00 g/l
	NaCl	3,50 g/l
	K ₂ PO ₄	3,68 g/l
	KPO ₄	1,32 g/l
		pH 7,0±0,2
		autoklavieren bei 121 °C, 15 min
SOC-Medium	Trypton	20,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	NaCl	0,50 g/l
	250 mM KCl	10,00 ml
	5 <i>N</i> NaOH	0,20 ml
		pH 7,0±0,2
		autoklavieren bei 121 ℃, 15 min
		abkühlen auf 60 °C
	Zugabe von autokl	aviertem 2 M MgCl ₂ (5,00 ml) und steril
		filtrierter 1 M Glucose (20,00 ml)

Schafblut-Agar	Pankreatisches Pepto	n (Fleisch)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepto	n (Gelantine)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepto	n (Casein)	5,00 g/l
	Eiweißhydrolysat		3,50 g/l
	Hefeextrakt		3,50 g/l
	NaCl		5,00 g/l
	Agar		10,00 g/l
			pH 7,0±0,2
		autoklavieren be	ei 121 ℃, 15 min
		abküł	nlen auf 45-50 ℃
	Zuga	abe von 5 % defibrir	niertem Schafblut
Waschblut- Agar	Tryptose-Blut-Agar		16,00 g/l
	Schaferythrozyten		100,00 ml
	1 M CaCl ₂		1,00 ml
	defibrinie	ertes Schafblut 3 x r	nit PBS waschen
			(240 x g, 30 min)
YT-Medium	Trypton		16,00 g/l
	Hefeextrakt		10,00 g/l
	NaCl		5,00 g/l
			pH 7,0±0,2
		autoklavieren be	ei 121 ℃, 15 min
Lösungen für die Agaros	e-Gelelektrophorese (DNS)		
TDE Duffer Clamm	Tria		

TBE-Puffer Stamm-	Tris	890 mM	107,82 g
Lösung (10 x konz.)	Borsäure	890 mM	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
	eingestellt mit NaOH		auf 100 ml
			davon 40 ml
	A. bidest		ad 1000 ml
Stop-Lösung	Formamid		9,50 ml
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	0,40 ml
	Bromphenolblau		5,00 mg
	Xylencyanol FF		5, 00 mg
	A. bidest		0,10 ml

Agarose	Agarose	0,80 – 1,20 g
	1 x TBE	ad 100 ml
Ethidiumbromidlösung	1 %	
Lösungen für die Polymerase-Ko	ettenreaktion (PCR)	
10 x PCR Puffer ¹	Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
	KCI	500 mM
<i>Taq</i> DNA Polymerase ¹		5 U/µl
Magnesium Chlorid Solution ¹		50 mM
dNTP ¹	PCR Nucleotid Mix:	each dNTP 10 mM
	dATP, dCTP, dGTP,	
	dTTP	
<i>EXL[®]</i> DNA Polymerase ²		5 U/μl

¹: Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostik mbH, Berlin

²: Stratagene, Amsterdam (NL)

Lösungen für die DNS-DNS-Hybridisierung

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

Maleinsäure	100 mM	11,60 g
NaCl	150m m	8,80 g
pH 7,5, eingestellt mit NaOH		-
A. bidest		ad 1000 ml
Blocking Reagenz	10 %	10,00 g
Maleinsäure-Puffer		ad 100 ml
er	hitzen bis 65	°C, autoklavieren
	[Lagerung bei 4 °C
SDS	10 %	20,00 g
A. bidest		ad 200 ml
	Maleinsäure NaCl pH 7,5, eingestellt mit NaOH A. bidest Blocking Reagenz Maleinsäure-Puffer er SDS A. bidest	Maleinsäure100 mMNaCl150m mpH 7,5, eingestellt mit NaOHA. bidestBlocking Reagenz10 %Maleinsäure-Puffererhitzen bis 65SDS10 %A. bidest

SSC (20 x)	Na-Citrat	300 mM	88,23 g
	NaCl	3 M	175,32 g
	pH 7, eingestellt mit HCl		
	A. bidest		ad 1000 ml
Hybridisierungspuffer	SSC (5 x)	20 x	12,50 ml
	BRSS (1 %)	10 x	5,00 ml
	N-Laurylsarcosine (0,1 %)	10 %	1,00 ml
	SDS (0,02 %)	10 %	0,10 ml
	A. bidest		ad 50 ml
Stringenz I	SSC (2 x)	20 x	40,00 ml
	SDS (0,1 %)	10 %	4,00 ml
	A. bidest		ad 400 ml
Stringenz II	SSC (0,1 x)	20 x	2,00 ml
	SDS (0,1 %)	10 %	4,00 ml
	A. bidest		ad 400 ml
Waschpuffer 1	Maleinsäure-Puffer		100 ml
	Tween [®] 20	0,3 %	0,30 ml
Blocking Solution (1 x)	BRSS	10 x	10,00 ml
	Maleinsäure-Puffer		ad 100 ml
Detektionspuffer	Tris	100 mM	12,11 g
	NaCl	100 mM	5,84 g
	pH 9,5, eingestellt mit HCl		
	A. bidest		ad 1000 ml
Strippingpuffer	NaOH	200 mM	4,00 g
	SDS (0,1 %)	10 %	5,00 ml
	A. bidest		ad 500 ml

Das Anti-Dig-AP Konjugat sowie die CSPD[®] Lösung wurden entsprechend den Angaben des DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) verdünnt und eingesetzt.

	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %
Acrylamidlösung (30 %)	1,35 ml	3,30 ml	4,20 ml
H ₂ O	6,00 ml	4,00 ml	3,20 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,50 ml	-	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,50 ml	2,50 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100 μl
TEMED	10 µl	5 µl	5 µl
APS 10 %	100 µl	100 μl	100 µl
2 x SDS-Probenpuffer	Tris-HCl, pH 6,8	125 mM	
	Glyzerol	20 %	
	SDS	4 %	
	B-Merkaptoethanol	10 %	
	Bromphenolblau	2 %	
SDS-Elektrophorese-	Tris		3,00 g/l
Laufpuffer	Glycin		14,40 g/l
	SDS	10 %	10,00 ml
	A. bidest		ad 1000 ml
Coomassie-Brilliantblau-	Methanol		400,00 ml
Färbelösung	Essigsäure		70,00 ml
	Coomassie Blau R-25	0	2,50 g/l
	A. bidest		ad 1000 ml
Coomassie-Brilliantblau-	Methanol		400,00 ml
Entfärbelösung	Essigsäure		70,00 ml
	A. bidest		ad 1000 ml
Lösungen und Puffer für die	Protein-Aufreinigung		

Lösungen für die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

IPTG	lsopropyl-ß-D- thiogalactosidase	100 mM	500 mg
	A. bidest		ad 20 ml

steril filtrieren, Lagerung bei −20 °C

Saline-Tris-EDTA-Buffer	Tris	10 mM	1,21 g/l
(pH 8,0)	NaCl	150 mM	8,77 g/l
	EDTA	1 mM	0,37 g/l
	A. bidest		ad 1000 ml
Phosphate-Buffered-	NaCl	135 mM	8,00 g/l
Saline (pH 7,2)	KCI	3 mM	0,20 g/l
	KH ₂ PO ₄	15 mM	2,00 g/l
	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	55 mM	9,70 g/l
	A. bidest		ad 1000 ml
Elutionspuffer (pH 8,5)	Tris	50 mM	
	reduziertes		
	Gluthation	25 mM	
	NaCl	150 mM	
Lösungen und Puffer für der	<u>ı İmmunoblot</u>		
Towbin-Transferpuffer	Tris	25 mM	3,03 g/l
	Glycin	192 mM	14,40 g/l
	Methanol	20 %	200,00 ml
	A. bidest		ad 1000 ml
Ponceau-Rot	Ponceau S	0,50 %	
	Methanol	40 %	
	Eisessig	15 %	
Tris-Buffered-Saline	NaCl	500 mM	146,10 g/l
5 x konz. (pH 7,5)	Tris	20 mM	12,12 g/l
	A. bidest		ad 1000 ml
Blockpuffer	Magermilchpulver	5 %	5,00 g
	1 x Tris-Buffered-Sa	line	ad 500 ml
Bovines-Serum-Albumin		0,1 %	
(BSA)			
Sekundärer Antikörper	Peroxidase-konjugie	rter 1:5.000	1 µl
	Ziege anti-Kaninche	n-Ak	
	BSA 0,1 %		
			ad 5 ml

Lösungen und Puffer für die Ze	<u>llkultur</u>		
Dulbecco`s Modified Eagle M	ledium (DMEM)		
Phosphate-Buffered-Saline	NaCl	135 mM	8,00 g/l
(pH 7,2)	KCI	3 mM	0,20 g/l
	KH ₂ PO ₄	15 mM	2,00 g/l
	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	55 mM	9,70 g/l
	A. bidest		ad 1000 ml
Trypanblaulösung	NaCl		4,38 g
	Trypanblau		0,10 g
	A. bidest		ad 500 ml
Bovines-Serum-Albumin		0,1 %	
(BSA)			

3.1.5 Oligonukleotid-Primer und DNS-Sonden

Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden wahlweise von der Firma MWG Biotech, Ebersberg oder der Firma Eurogentech, Seraing (B) synthetisiert und sind in Tabelle 4 aufgelistet.

•	Jigonukieollu-Fiiniei		
Primer	Primersequenz (5'- 3')	T _m (C°)	Zielregion ¹
Lifa1	AGCCATTCCATCAATCCGAT	55,3	<i>efa1/lifA</i> ² (9.483–8.923 bp)
Lifa2	TCCCTGCCAAACTACCGACAC	61,8	
Lifa3	CAGCTACAGGAGACCGTTTTT	57,9	<i>efa1/lifA</i> ² (643–111 bp)
Lifa4	CAATATCAGGCCAATCAA	59,1	
LifAvF1	CTGTCAGACGATGACATTGGT	57,9	<i>efa1/lifA</i> ² (1.411–2.070 bp)
LifAvF2	CGCAGGCCAGAATCAGGCT	61,0	
LifAvF3	CCTCACTTCCAGATACAGAC	57,3	<i>efa1/lifA</i> ² (2.141–2.670 bp)
LifAvF4	AGTCGACGAGTCAATTAGCTC	57,9	
LIFA 1F	CTGGATCCTTGTTACACAACGCGCTCCT	57,0	<i>efa1/lifA</i> ² (292–1.221 bp)
LIFA 1R	CTGTCGACGGTACTCTTGTTGTCCCGATG	58,5	
LIFA 2F	CTGGATCCAAAGGGCAAACACTGGATCGT	58,0	<i>efa1/lifA</i> ² (3.466–4.320 bp)
LIFA 2R	CTGTCGACGCAACAAAGTATATTTCGCATGT	57,7	

Tab. 4:	Überblick	über	Sequenz	und	Spezifität	sämtlicher	in	der	Arbeit	verwendeter
	Oligonukleotid-Primer									
Primer	Primersequenz (5'- 3')		Zielregion ¹							
----------------------	-----------------------------------	------	---							
LIFA 3F	CTGGATCCCGGAAAGAAGAACGGCATAC	58,2	<i>efa1/lifA</i> ² (6.112–7.176 bp)							
LIFA 3R	CTGTCGACGCAGACTCAGCTCAAAGGCGAC	59,0								
LIFA 4F	CTGGATCCCCAGGTATCGGCAGTTTACGTC	56,9	<i>efa1/lifA</i> ² (8.422–9.504 bp)							
LIFA 4R	CTGTCGACGATTATCCGCTATATCCGCACCA	58,4								
Pstl-enF	AACTGCAGAATGCCAATAATAAACAAATCGGC	55,3	<i>ent</i> ² (1-23 bp)							
Pstl-en2F	AACTGCAGAAGGGCTAAAAGAAGACACAC	54,5	<i>ent</i> ² (571-589 bp)							
<i>Pstl</i> -en3F	AACTGCAGAACGGCATATTGTGGCGTAC	52,8	<i>ent</i> ² (1.137-1.153 bp)							
<i>HindIII</i> -enR	CCCAAGCTTCTCAATTGGAATAATAATTATATA	49,1	<i>ent</i> ² (1.633-1.656 bp)							
<i>HindIII</i> -en1R	CCCAAGCTTCGGTCATGCAGACGCAAT	53,3	<i>ent</i> ² (460-474 bp)							
<i>HindIII</i> -en2R	CCCAAGCTTCCCCAATCAGACCGCG	52,8	<i>ent</i> ² (1.117-1.133 bp)							
BamHI-enF	CGCGGATCCATGCCAATAATAAACAAATCGG	53,2	<i>ent</i> ² (1-1.656 bp)							
<i>Notl</i> -enR	ATAAGAATGCGGCCGCTCAATTGGAATAATAA	52,5								
	ТТАТАТАС									
PagC fw	ATGAGTGGTTCAAGACTGG	54,5	<i>pagC</i> ³ (14-534 bp)							
PagC rev	CCAACTCCAACAGTAAATCC	55,5								
EnLi fw	ATGCCCAGAAAAGGTAGCAG	53,0	<i>ent</i> ² (1.568-1.588 bp)							
LiEn rev	TAAACATTTGCCAGACCAAGG	50,2	<i>efa1/lifA</i> ² (309-329 bp)							
			Verbindung ent-efa1/lifA ²							
PaEn fw	TCAGCTTCATCGCGATGACTG	58,1	<i>pagC</i> ³ (344-364 bp)							
PaEn rev	GCCATTGCATGTCCGGGAGA	61,4	<i>ent</i> ² (382-401 bp)							
			Verbindung <i>pagC</i> ³ -ent ²							
Efa1 3'fwd	TGCGCACAATTGACTACAGAGGAA	58,0	<i>efa1/lifA</i> ² (9.044-9.067 bp)							
EspF fwd	CTTCATTTACTCCCTCTCGTCCGGC	59,7	<i>espF</i> ² (206-230 bp); Ver-							
			bindung <i>efa1/lifA</i> -es <i>pF</i> ²							
pGEX-F	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	67,8	Expressionsvektor pGEX-							
pGEX-R	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	67,8	6P-1 spezifisch							
pBAD30-F	CTGTTTCTCCATACCCGTT	63,4	Expressionsvektor							
pBAD30-R	GGCTGAAAATCTTCTCT	61,9	pBAD/HIS-A spezifisch							
cycZ1	TTCACCCACGAACTGTTAACC	57,9	<i>pheU</i> -tRNS ⁺ (267 bp							
CadC1	CAATCCAGTAAAGGGTGTT	56,7	stromabwärts - 287 bp							
			stromaufwärts)							
yqgAfw	ACTTCACCGCATGAGCAGTAA	57,9	<i>pheV</i> -tRNS⁴ (158 bp							
6229PVr	GTGCAGCGGCTGGAGTTTGGA	56,1	stromabwärts – 1.031 bp							
			stromaufwärts)							
CadA1	CTTCCCTTGTACGAGCTAATT	55,0	<i>cadA</i> ^₄ (541-1.167 bp)							
CadA2	CCTGGAGATATGACTATGAAC	53,3								

Primer	Primersequenz (5'- 3')		Zielregion ¹
CadB1	TTATTCCTGTGGTGATGACTGC	64,0	<i>cadB</i> ⁴ (464-976 bp)
CadB2	CCAGCAGCAGACCTTTTTTC	62,9	
CadC1	CAATCCAGTAAAGGGTGTT	58,4	<i>cadC</i> ⁴ (72-608 bp)
CadC2	AAATCTCATCAGTCGCCGTTC	57,0	

¹: Die Positionen wurden entsprechend der Lage im jeweiligen offenen Leserahmen angegeben

²: Als Templatesequenz diente der EHEC RW1374 (O103:H2) (Acc. Nr. AJ303141).

³: Als Templatesequenz diente der EHEC EDL933 (O157:H7) (Acc. Nr. AE005174).

⁴: Als Templatesequenz diente der *E. coli*-K12 Kontrollstamm MG1655 (Acc. Nr. U00096).

Oligonukleotid-Sonden für die DNS-DNS-Hybridisierung

Zum Nachweis der Gene *efa1/lifA*, *ent, pagC* und *cadB* in *E. coli* -Stämmen wurden DNS-Sonden mit Hilfe des "PCR DIG Probe Synthesis Kit" hergestellt. Die Lage der Sonden innerhalb der Gene ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Polymerase-Kettenraktionen (PCR) wurden entsprechend den Herstellerangaben des o. g. Kits durchgeführt. Als Template wurde die mittels "Master Pure Genomic DNA Purification Kit" isolierte DNS der jeweiligen, in der Tabelle 2 aufgeführten Referenz- und Kontrollstämme verwendet, als Negativkontrolle diente der *E. coli*-K12 Laborstamm MG1655. Nach durchgeführter PCR wurden die markierten DNS-Sonden mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kit" aus dem Agarosegel aufgereinigt.



Abb. 2: Schematische Darstellung der Lokalisation der DNS-Sonden zum Nachweis der Gene *pagC*, *ent*, *efa1/lifA* und des trunkierten *efa1'* innerhalb der genetischen O-Insel 122.

Sonde	Primer	Zielregion ¹	Produktgröße
A	lifa3-lifa4	5'-Region von <i>efa1/lifA</i> ² (111-643 bp)	532 bp
В	lifa1-lifa2	3'-Region von <i>efa1/lifA</i> ² (8.923-9.483 bp)	560 bp
С	LifAvF1-	5'-Region von <i>efa1/lifA</i> ² , innerhalb der trunkierten	659 bp
	LifAvF2	Form (1.411-2.070 bp)	•
П	LifAvF3-	3'-Region von <i>efa1/lifA</i> ² , außerhalb der trunkierten	529 bp
D	LifAvF4	Form (2.141-2.670 bp)	
F	PstlenF-	ent^2 (1-1 133 hp)	1 133 hn
	HindIllen2R		1.100 00
F	PagC fw-PagC	$nagC^{3}$ (14-534 hp)	520 bp
'	rev		520 bp
G	CadB fw-cadB	$cadB^{4}$ (464-976 bp)	512 bn
	rev		biz up

Tab. 5: Überblick über die Spezifität der verwendeten DNS-Sonden

¹: Die Positionen wurden entsprechend der Lage im jeweiligen offenen Leserahmen angegeben

²: Als Templatesequenz diente der EHEC RW1374 (O103:H2) (Acc. Nr. AJ303141)

³: Als Templatesequenz diente der EHEC EDL933 (O157:H7) (Acc. Nr. AE005174)

⁴: Als Templatesequenz diente der *E. coli*-K12 MG1655 (Acc. Nr. U00096)

3.1.6 Geräte und Labormaterial

12-Loch-Platte	NUNC [™] Brand Products, Dänemark
200 mm- Elektroporations-Küvetten	peQlab, Erlangen
Brutschränke	Heraeus, Typ B6060, Hanau
Cryo-Röhrchen	Cryovial [®] , Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Deckgläser (Ø 15 mm)	SupeRior, Marienfelde
Elektrophoresekammern DNS	AGS; MWG Biotech, Ebersberg
Elektrophoresekammern Proteine	Keutz, Hüttenberg; BioRad, München
Elektroporator	peQlab, Erlangen
Epi-Fluoreszenz-Mikroskop	Leica DMLB, Heerbrugg (CH)
Filmkasetten	Kodak BioMax Cassette
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant [™] 200
Gel-Trockner	Gel drying Kit, Promega GmbH, Mannheim
Hybrisisierungsofen	MWG Biotech, Ebersberg
Kanüle	Sterican 20G, 0,9 mm, B. Braun, Melsungen
Konfokales Laserscan Mikroskop	LC Lite 2611537

Kühlzentrifuge Magnetrührer Objektträger (76 x 26 mm) pH-Meter Photo-Kamera Photospektrometer Pipetten Reaktionsgefäße (0,2–2 ml) Reaktionsgefäße (10-50 ml) Rotationsschüttler Rossettenglas Röntgenfilme Schüttler Schüttelinkubator Spannungsgerät Spritze Sterilwerkbank Thermocycler Thermodrucker Tischzentrifuge Transferkammer Transilluminator Ultraschall UV-Tisch Vortexer Waage Wärmeschrank Wasserbäder Zählkammer Zellkulturflaschen Zentrifuge

Sigma 3K30, Deisenhofen Omnilab RCT S26, IKA Labortechnik, Staufen Roth Gmbh & Co., Karlsruhe Knick 766 Calimatic Polaroid MP4+ Instant Camera System Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec[®] 3000 pro Gilson Eppendorf, Hamburg Greiner Bio-One GmbH Roto-Shake, Scientific Industries, New York (USA) Rosett Cooling Cell Branson, Carouge-Geneve Kodak X-OMAT AR IKA Labortechnik KS 250 basic New Brunswick Scientific, C24 Incubator Shaker Hybaid PS 250, MWG Biotech, Ebersberg Injekt 20 ml, B. Braun, Melsungen Steag Laminarflow-Prozeßtechnik Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400 Herolab; Video Graphik Printer UP 890 CE Eppendorf Centrifuge 5415D BioRad, Trans-Blot[®] SD Herolab, E.A.S.Y. 429K; ICU-1 Sonifier 250 Branson, Carouge-Geneve, Biometra TI 1 **IKA MS2 Minishaker** Sartorius LA 230S und BP 2100 WTC Binder Julabo; Th. Karow GmbH Neubauer Greiner Bio-One GmbH Hettich Universal K2S

3.2 Methoden

3.2.1 Stammhaltung und Bakterienanzucht

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte auf Blutagarplatten bei 37 ℃. Jeweils eine Kolonie einer über Nacht (ü.N.) bebrüteten Blutagarplatte wurde in ein mit 5 ml LB-Medium gefüllten Reagenzröhrchen geimpft und bei 37 ℃ ü.N. unter Schütteln inkubiert. Von dieser Bakterienkultur wurden jeweils 1,3 ml entnommen, mit 0,5 ml Glycerin (Rotipuran[®], Glycerol, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) vermischt und in 2 ml Cryo-Röhrchen bei –20 ℃ sowie –70 ℃ gelagert.

Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen mit rekombinanten Plasmiden wurde das Medium je nach verwendetem Plasmid mit folgenden Antibiotikakonzentrationen supplementiert:

pGEX-6P-1 100 µg Ampicillin je ml

pBAD/HIS-A 50 µg Ampicillin je ml

3.2.2 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Die Hämolysin-Bildung der *E. coli*-Stämme wurde durch Anzucht auf zwei verschiedenen Agarplatten getestet. Während die Bildung des *E. coli*-α-Hämolysins durch 18-stündige Inkubation (37 °C) auf Blut-Agarplatten bestimmt wurde, die eine 10 %ige Schaferythrozytensuspension enthielten, erfolgte der Nachweis des EHEC-Hämolysins auf Waschblut-Agarplatten. Diese enthielten neben 10 % gewaschenen Schaferythrozyten zusätzlich 10 mM CaCl₂.

3.2.3 Bestimmung der Lysin-Decarboxylase Aktivität

Die Bildung der, durch niedrigen Umgebungs-pH induzierbaren Lysin-Decarboxylase (LDC) wurde phänotypisch getestet. Eine Einzelkolonie des zu untersuchenden *E. coli*-Stamms wurde in den LIM-(Lysin-Indol-Motiltät) Hochschichtagar eingestochen. Dieser Agar bietet den Bakterien Lysin als einzige Aminosäure, deren Verstoffwechselung zu einer Farbänderung des Mediums führt. Nach 24- oder 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Ergebnis abgelesen. Ein Farbumschlag nach lila-grau bedeutete, dass LDC Aktivität vorhanden war, ein gelb bleibendes Medium, dass keine LDC Aktivität vorlag. Als positiv Kontrolle (LDC +) diente der *E. coli*-K12 Laborstamm MG1655, als negativ Kontrolle (LDC -) der *Shigella flexneri* 2457^T Stamm. Der Test erfolgte im Doppelansatz.

3.2.4 DNS-Analytik

3.2.4.1 Isolierung genomischer DNS

Die Isolierung reiner genomischer DNS erfolgte unter Verwendung des "MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit" (Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers.

3.2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde der "QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit" eingesetzt. Die Plasmid-Präparation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.2.4.3 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die DNS-Konzentrationsbestimmung erfolgte fluorometrisch. Der DNS wurde eine Lösung, die den Farbstoff "Hoechst 33258" enthielt, der in die kleine Furche der DNS Doppelhelix interkalierte, zugegeben. Durch UV Bestrahlung der Lösung und der anschließenden Messung der Absorption konnte eine Eichkurve erstellt werden und die DNS Konzentration gemessen werden. Zur Erstellung der Eichkurve wurden eine Standard-DNS mit bekannter DNS-Konzentration und ein Lehrwert benötigt. Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem Fluorometer DyNA Quant[™] 200 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco CA, USA) entsprechend der vorgeschlagenen Protokolle durchgeführt.

3.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein bestimmter DNS-Bereich mit Hilfe von zwei Primern und einer DNS-Polymerase in vitro amplifiziert. Primer sind kurze DNS-Oligonukleotide (18-25 mer), welche an die komplementäre Sequenz eines DNS-Einzelstranges binden. Die beiden Oligonukleotide sind so gewählt, dass diese antiparallel zueinander an die beiden DNS-Stränge hybridisieren. Ihre Sequenz sollte auf der Template-DNS nur einmalig vorhanden sein, um ein einziges Amplifikat zu erhalten.

Die DNS wird thermisch denaturiert, so dass die Primer bei einer bestimmten Annealingtemperatur an die komplementären DNS-Stränge binden können. Mittels einer DNS-Polymerase findet eine Primer-Verlängerungsreaktion statt (DNS-Strangsynthese, Elongation). Dabei werden die DNS-Stränge zunächst über die jeweilige Position des Primers auf dem Gegenstrang in 3'-Richtung verlängert. Bei vielfacher Wiederholung dieser Teilschritte erhält man eine Vielzahl von Kopien beider ursprünglichen DNS-Einzelstränge, wobei die Kopienzahl exponentiell anwächst, da jeder Reaktionsschritt wieder neue Matrizen-DNS ("Template-DNS") erzeugt. Bei jedem Amplifikationsschritt entspricht die Länge des Produktes exakt dem Abstand der beiden Primer. In der vorliegenden Arbeit

32

wurde die "*Taq* DNS-Polymerase" (Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostik mbH, Berlin) sowie die "*EXL*[®] DNA-Polymerase" (Stratagene, Amsterdam, NL) entsprechend der Herstellerprotokolle verwendet.

Der auf Eis pipettierte 50 µl Reaktionsansatz für die *Taq* DNS-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 μl	10 x PCR Puffer
1,5 µl	MgCl ₂ (50 mM)
1,0 µl	dNTPs (je 10 mM)
2,0 µl	Sense-Primer (10 pmol)
2,0 µl	Antisense-Primer (10 pmol)
0,5 µl	<i>Taq</i> DNS-Polymerase (5 U/μl)
ad 50 µl	A. bidest

Der auf Eis pipettierte 50 µl Reaktionsansatz für die *EXL*[®] DNA-Polymerase setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 µl	10 x <i>EXL</i> Puffer
1,0 µl	dNTPs (je 25 mM)
2,0 µl	Sense-Primer (10 pmol)
2,0 µl	Antisense-Primer (10 pmol)
0,5 µl	DMSO 1 %
1,0 µl	Stabilisierungslösung
0,8 µl	<i>EXL[®]</i> DNA Polymerase (5 U/μl)
ad 50 µl	A. bidest

Der Ansatz wurde nach Schütteln kurz hochtourig zentrifugiert, mit 15 µl Mineralöl überschichtet und in den Thermocycler gestellt. Die Bedingungen der PCR waren eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 min, gefolgt von 25 Zyklen des Temperaturprofils 94 °C für 30 sec, eine variierende Annealingtemperatur (50–62 °C) für 45 sec, eine variierende Elongationszeit (1–8 min) bei 72 °C sowie einer einmaligen finalen Amplifizierung von 72 °C für 7 min.

Die *EXL*[®] DNA-Polymerase wurde zur Amplifizierung großer DNS-Fragmente eingesetzt. Die initiale Denaturierungstemperatur wurde auf 92 °C für 2 min reduziert, gefolgt von 30 Zyklen des Temperaturprofils 92 °C für 10 sec, eine variierende Annealingtemperatur (50–62 °C) sowie Elongationszeit (10-15 min) bei 68 °C. Die finale Amplifikation betrug 10 min bei 72 °C. Als Template-DNS dienten isolierte Plasmid- oder gesamt-DNS.

Bei jeder PCR wurde eine Negativ- und eine Positivkontrolle, sowie ein Leerwert (A. bidest)

zur Überprüfung der PCR-Bedingungen mitgeführt.

3.2.4.5 DNS-DNS-Hybridisierung

Mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung lassen sich gleiche oder sehr ähnliche Sequenzen der zu untersuchenden Nukleinsäure und der markierten Sonde nachweisen. Durch den Hybridisierungsvorgang kommt es zu einem Kontakt zwischen der DNS-Sonde und der auf einer Membran gebundenen denaturierten DNS, so dass die Sonde während der Inkubation an die entsprechenden homologen Bereiche bindet. Es bilden sich so genannte "Hybrid-Moleküle", die nach Entfernung der nicht gebundenen Sonde sichtbar gemacht werden können.

Dot-Blot

Für die Herstellung eines Dot-Blot wurde mittels "MasterPure[™] Genomic DNA Purification Kit" isolierte DNS verwendet. Um die DNS zu denaturieren, wurde sie in 4 *N* NaOH-Lösung für 10 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Von dieser bakteriellen DNS (100 ng/µl) wurden 2 µl auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) punktförmig aufgetropft. Nach kurzer Trocknung der Membran wurde die DNS durch 30 minütige Inkubation bei 120 °C fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

DNS-Sondenherstellung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNS-Sonden wurden durch den Einbau von Digoxygenin-gelabelten dUTPs im Rahmen einer PCR markiert. Die Markierung wurde unter Verwendung eines "PCR DIG Probe Synthesis Kit" entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Als Tempalte wurde reine genomische DNS der Stämme MG1655, RW1374 und EDL933 verwendet. Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wurde festgestellt, ob die Markierung der Sonden erfolgreich durchgeführt wurde, da das Laufverhalten des markierten Amplifikats gegenüber dem nicht markierten verändert ist. Um die gewonnene DNS-Sonde zu reinigen, wurde das DNS-Fragment anschließend in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und mit dem "Agarose Gel DNA Extraction Kit" nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

Hybridisierungsvorgang und Visualisierung

Der Hybridisierungsvorgang und die Visualisierung wurden entsprechend den Vorschriften des "DIG Application Manual for Filter Hybridisation" (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien und Puffer sind unter Punkt 3.1.4 aufgeführt.

Der Nachweis von DNS-DNS-Hybriden erfolgte durch die Chemilumineszenz-Reaktion anhand der Schwärzung von Röntgenfilmen. Dafür wurden die hybridisierten DNS-Blots in Zellophanfolie verpackt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Anschließend wurden sie in einer lichtdichten Filmkassette je nach verwendeter Sonde zwischen 30 min und 1 h exponiert. Zur Visualisierung der Signale mussten die Filme 3 min entwickelt, 1 min gewässert, 3 min fixiert und abschließend gewässert werden. Anhand der Schwärzung der Röntgenfilme konnte die Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden.

3.2.4.6 DNS-Klonierung

Ligation

Bei der Ligation werden DNS-Fragmente in natürlicher 5'–3'-Richtung kovalent verknüpft. Diese Reaktion wird von der T4-DNS-Ligase katalysiert, die unter Verbrauch von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphatende und dem 3'-Hydroxyende doppelsträngiger DNS ausbildet.

Ligationsreaktionen wurden nach Vorschrift von Standardprotokollen durchgeführt (SAMBROOK und RUSSELL, 2001). Ligationen von Insert-DNS in einen linearisierten Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 10–20 µl unter Zusatz von 0,5–1 µl T4-DNS-Ligase sowie 1–2 µl 10 x Ligase-Puffer durchgeführt. Mit A. bidest wurde auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurden zuvor restringierte und mittels "Agarose Gel Extraction Kit" aufgereinigte Plasmid-DNS und PCR-Amplifikate verwendet. Insert-DNS wurde in einer Menge von 10–100 ng eingesetzt. Die Anzahl der freien Enden des Inserts entsprach der Anzahl der freien Enden des Vektors. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert. Um eine durchgeführte Ligation zu überprüfen, wurde eine PCR oder eine Restriktion durchgeführt.

Transformation

Die Transformation bezeichnet einen Vorgang, bei dem DNS-Moleküle von Bakterienzellen aufgenommen werden. Unter normalen Bedingungen nehmen *E. coli*-Zellen nur in begrenztem Umfang DNS-Moleküle auf. Um die Zelle effektvoll zu transformieren, benötigt man so genannte kompetente Zellen, die aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften besonders leicht fremde DNS aufnehmen können. Transformationen werden durchgeführt, um rekombinante DNS-Moleküle in Bakterienzellen einzuführen.

Bei der Elektroporation wird eine DNS-Zellsuspension einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, welcher den Aufbau eines transmembranalen elektrischen Feldes induziert. Diese transmembranale Spannung verursacht eine vorübergehende lokale Zerstörung der

35

Zellmembran. Durch die so erzeugten Poren gelangt fremde DNS in die Zelle (DOWER et al., 1988).

Elektrokompetente Zellen wurden nach dem Protokoll von EquiBio Ltd. (Kent, UK) hergestellt. Danach wurden 200 ml LB-Medium mit 4 ml Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelinkubiert, bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht war. Die zweimal mit eiskaltem Ultrareinstwasser gewaschenen Zellen wurden anschließend in 100 µl Portionen unter Zugabe von 10 % Glyzerol aliquotiert, schockgefroren und bei –70 °C aufbewahrt oder ohne Zugabe von Glyzerol sofort zur Elektroporation benutzt.

Elekrtoporationen wurden nach der Anleitung von EquiBio Ltd. (Kent, UK) durchgeführt. Dabei wurden 1–4 µl des Ligationsansatzes oder des Plasmids zu 40 µl elektrokompetenter Zellen gegeben, durchmischt und 1 min auf Eis inkubiert. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml steriles SOC-Medium zugeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C schüttelinkubiert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung von 100 µl auf Selektivplatten, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

3.2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und sehr effektive Methode, DNS-Fragmente zu separieren, identifizieren und aufzureinigen. Die Auftrennung erfolgt in Abhängigkeit der DNS-Größe.

0,8–1,2 g Agarose wurde durch Aufkochen in 100 ml 1 x TBE gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55 °C und Zugabe von 1,3 µl einer Ethidiumbromidlösung (1 %ig) zum Zwecke der Sichtbarmachung der DNS-Banden unter UV-Licht wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probentaschenkamm befand. Nach dem Erhärten wurde das Gel in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Nachdem 10 µl des PCR-Produkts oder Plasmids, vermischt mit 2 µl der Stop-Lösung, sowie in Abhängigkeit der DNS-Fragmentgröße der 1 kb DNA Ladder bzw. 100 bp DNA Ladder (Life Technologies[™], Life Technologies GmbH, Karlsruhe) in die einzelnen Probentaschen pipettiert worden sind, wurde ein elektrisches Feld von 90 V für 90 min an die Elektrophoresekammer angelegt. Anschließend wurden die DNS-Banden mittels eines Transilluminators visualisiert. Die Dokumentation erfolgte mittels einer CCD-Kamera über einen angeschlossenen Thermodrucker.

3.2.4.8 Eluierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Eluierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen nach deren elektrophoretischer Auftrennung wurde der "Agarose Gel DNA Extraction Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entsprechend des Protokolls der Herstellerfirma verwendet.

Hierbei werden die DNS enthaltenen Gelblöcke verdaut und anschließend die DNS an eine

Trägermatrix gebunden. Nach diversen Waschschritten kann die DNS mit einem Puffer von der Trägermatrix eluiert werden.

3.2.4.9 DNS-Sequenzanalyse

AGOWA Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Berlin durchgeführt. Die Ermittlung von offenen Leserahmen (Open reading frame -ORF) erfolgte mittels der Programme Lasergene 2000 software package® (Dnastar Ltd., London, UK) und HUSAR (DKFZ, Heidelberg) basierend auf den Algorithmen des Gene Locator and Interpolated Markov Modeler (GLIMMER) sowie den Matrizen nach Borodovsky. Neben der Vorgabe einer Protein Minimum Länge von 50 Aminosäuren, wurde festgelegt, dass STOP-Codons innerhalb des ORFs nicht erlaubt, am Ende jedoch zwingend sind. Bei der Analyse der erhaltenen ORFs wurde das vom Nation Center For Biotechnology Information (NCBI) bereitgestellte Internet-Programm Basic Logic Alignment Search Tool (BLAST) auf Grundlage der Datenbanken EMBL und SWISSPROT verwendet.

3.2.5 RNS-Analytik

3.2.5.1 RNS-Isolierung

Zur Präparation von Gesamt-RNS aus Gram-negativen Bakterien wurde das "SV Total RNA Isolation System" (Promega GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers benutzt. Um die Möglichkeit eventueller DNS-Verunreinigungen zu vermindern wurde am Ende der Präparation ein zusätzlicher DNS-Verdau für 30 min bei 37 ℃ durchgeführt. Das Abstoppen des Enzyms DNAse erfolgte durch Zugabe von EDTA (25 mM) und 15 minütiger Inkubation bei 65 ℃.

3.2.5.2 RNS-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der RNS erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm (A_{260nm}) und 280 nm (A_{280nm}) im Photospektrometer (Ultraspec[®] 3000 pro, Amersham Pharmacia Biotech). Bei einem Ratiowert von $A_{260nm}/A_{280nm} = 2,0$ lag reine RNS vor. Ratiowerte unter 2,0 zeigen DNS-, Werte über 2,0 Proteinverunreinigungen an.

3.2.5.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNS in c-(copy-) DNS umgeschrieben. Die cDNS kann zum Nachweis der Transkription spezifischer Gensequenzen dienen, indem sie als Template in einer PCR eingesetzt wird. Für das Umschreiben der mRNS in cDNS ist eine RNS-abhängige DNS-Polymerase (Reverse Transkriptase –RT) notwendig, die z. B. aus dem *Meloney murine leukemia virus* (M-MLV) gewonnen werden kann. Die für gentechnische

Arbeiten eingesetzte M-MLV RT weist eine Punktmutation (H-) auf, die für eine fehlende RNaseH-Aktivität verantwortlich ist. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, aus langen mRNS-Templates (>5 kbp) eine cDNS zu synthetisieren. Um die Sekundärstruktur der RNS aufzulösen, wurde diese in einem entsprechenden Volumen bei 70 °C für 5 min erhitzt, und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Folgende Komponenten mussten zum Ansatz pipettiert werden:

5,0 μl	M-MLV-RT 5 x Reaktionspuffer
1,25 µl	dNTP-Mix (10 mM)
2,0 µl	Hexamerprimer (random hexamers, 1µg)
1,0 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µI)
1,0 µg	DMSO 1 %
1,0 µl	RNS
1,0 µl	Reverse Transkriptase (20 U/µI)

Das Umschreiben der mRNS in cDNS erfolgte bei 37 ℃ für 60 min. Die Deaktivierung der Enzyme fand infolge der Erhitzung der Proben auf 70 ℃ für 15 min statt.

Bei der anschließenden PCR, die nach standardisiertem Schema mit genspezifischen Primern erfolgte, diente die cDNS als Template. Die mRNS wurde in der PCR als Kontrolle mitgeführt, um eine mögliche Kontamination mit DNS aufzudecken.

3.2.6 Protein-Analytik

3.2.6.1 Protein-Sequenzanalyse

Analysen und Auswertungen von Proteinsequenzen wurden mit dem Computerprogramm Lasergene 2000 software package[®] (Dnastar Ltd., London, UK) unternommen. Die Bestimmung von Sequenzmotiven, konservierten Domänen, sowie die Errechnung von theoretischen Molekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen Scan Prosit, Profile Scan und Compute pl/Mw Expasy des Expasy Molecular Biology Server (Institut für Bioinformatik, Genf, CH), sowie der Conserved Domain Database (CDD) vom Nation Center For Biotechnology Information (NCBI).

3.2.6.2 Klonierung von DNS-Fragmenten in Expressionsvektoren

Zur Expression wurden zwei verschiedene Vektoren benutzt.

Der Vektor pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Freiburg) kodiert für das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST). Wird ein Gen in die "multiple cloning site" (mcs) kloniert, findet eine direkte Kopplung zwischen der GST kodierenden Region und der inserierten DNS statt. Das resultierende Genprodukt ist ein Fusionsprotein mit der GST am N-Terminus. Der Vektor besitzt ein Ampicillinresistenzgen (*ampr*) und einen tac-Promotor (*Ptac*) für eine effiziente Expression des Fusionsproteins. Durch das *laclq*-Gen wird ein Repressor gebildet, der an den Promotor bindet. Die Transkription des Fusionsproteins kann durch die Bindung von Isopropyl-B-D-thiogalactosidase (IPTG) an den Repressor induziert werden. Zur Replikation besitzt der Vektor einen pBR322 origin (*ori*).

Der Vektor pBAD/HIS-A (Invitrogen, Gronningen, NL) kodiert für eine Aminosäure-Abfolge von sechs Histidinen. Dieser so genannte His-tag, wird bei der Klonierung einer DNS-Sequenz in die mcs an den C-Terminus des exprimierten Genprodukts als Erkennungssequenz. Der pBAD/HIS-A Vektor enthält einen *ara*BAD-Promotor und eine Ampicillinresistenz (*bla*) zur Selektion positiver Transformanden. Die Induktion der Genexpression erfolgt durch Zugabe von Arabinose. Auch dieser Vektor besitzt einen pBR322 Replikationsstart.

Die gewünschten DNS-Sequenzen wurden via PCR amplifiziert, aufgereinigt, wie unter Punkt 3.2.4.6 ausgeführt in den Expressionsvektor kloniert, in den *E. coli*-K12 Laborstamm DH5α transformiert und auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektiert. Von positiven Klonen wurden Plasmidpräparationen vorgenommen. Das rekombinante Vektorkonstrukt wurde via PCR und Restriktion überprüfte und nach der Methode von SANGER et al. (1977) sequenziert. Nach erfolgreicher Sequenzanalyse folgte die Elektroporation in den *E. coli*-K12 Laborstamm BL21.

3.2.6.3 Induktion und Expression der rekombinanten Proteine

Von einem, den rekombinanten Expressionsvektor enthaltenden *E. coli*-BL21 Klon wurde eine Übernachtkultur in 5 ml YT-Medium/Ampicillin angelegt. Davon wurden 2 ml in 100 ml YT-Medium/Ampicllin überführt und bei 37 ℃ schüttelinkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte OD₆₀₀ gemessen, bis sie einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Jetzt wurde die Kultur im Falle des pGEX-6P-1 Vektors mit Isopropyl-β-D-thiogalactosidase (IPTG) in einer Konzentration von 1 mM und im Falle des pBAD/HIS-A Vektors mit Arabinose in einer Konzentrationsreihe von 0,02 % bis 2,0 % versetzt und weitere 4 h bei 25 °C schüttelinkubiert. Anschließend wurde die 100 ml Kultur mit 8.000 rpm, bei 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 10 ml eiskaltem STE-Puffer gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C gelagert. Durch Probennahme vor und nach der Induktion wurde die Expression der rekombinanten Proteine anhand von SDS-PAGE und in manchen Fällen auch mit nachfolgendem Immunoblot überprüft.

39

3.2.6.4 Zellaufschluß und Gewinnung von Protein-Rohextrakt

Das schonend auf Eis aufgetaute Bakterienpellet wurde in 5 ml eiskaltem STE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym für 30 min auf Eis gestellt. Um die Viskosität der Lösung zu verringern wurde sie 15 x mit einer 20 ml Spritze durch eine Kanüle (Ø 9 mm) gezogen. Die Suspension wurde mit 5 mM DTT und 1,5 % N-Laurylsarcosin versetzt, in ein Rossettenglas überführt und fünfmal für je 10 sec auf Eiswasser mit Ultraschall behandelt (5 mm Mikrospitze, Stäke 4, 50 %). Zur weiteren Lösung der rekombinanten Proteine wurde die Probe mit 3 % Triton-X-100 versetzt und 40 min bei Stufe zwei auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Der Zelldebris wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm abgetrennt und das resultierende bakterielle Lysat der Affinitätschromatographie zugeführt.

3.2.6.5 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Da bei der Verwendung des pBAD/HIS-A Vektors keine Expression der Proteine erreicht wurde, wird auf die Nickel-NTA- (Nitrilotriacetic acid) Affinitätschromatographie nicht weiter eingegangen.

Die Aufreinigung der via pGEX-6P-1 exprimierten Proteine erfolgte über Affinitätschromatographie mit dem "Glutathion-S-Transferase (GST) Gene Fusion System" (Amersham Biosciences, Freiburg). Bei dieser Trennmethode fungiert das, an das jeweilige Zielprotein rekombinierte Enzym GST als monospezifischer Ligand, der an das matrixgekoppelte Glutathion reversibel bindet. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution mit reduziertem Glutathion, welches von der GST gegenüber der oxidierten Form, wie sie an der Matrix vorliegt, bevorzugt gebunden wird.

Die Vorbereitung der Affinitätsmatrix "Gluthation-Sepharose- (GS) 4B" erfolgte nach den Angaben des Herstellers (GST Gene Fusion System Handbook).

Zu dem durch Zellaufschluss gewonnenen 5 ml bakteriellen Lysat wurden 100 µl GS-4B gegeben und 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Probe wurde bei 500 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die sedimentierte, beladene GS-Matrix dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Es folgte die Elution des rekombinanten Zielproteins von der Matrix. Die Probe wurde mit 150 µl Elutionspuffer versetzt, 15 min rotierend inkubiert, 5 min bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Bei der abschließenden Dialyse der Eluate wurde der "Roti[®] -Elutions-Kit" (Carl Roth GmbH & Co, Karslruhe) verwendet. Die Proben wurden in die Elutions- bzw. Dialysegefäße verbracht und unter mehrmaligem Wechsel der Lösung gegen 1 x PBS, bei 4 °C auf einem Magnetrührer dialysiert. Die Lagerung der Proteinlösungen erfolgte bei –20 °C. Der Erfolg der einzelnen Schritte wurde durch Probennahme und anschließender Analyse

mittels SDS-PAGE überprüft und dokumentiert.

3.2.6.6 Protein-Konzentrationsbestimmung

Der zur Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen verwendete "DC Protein Assay" (BioRad, München) basiert auf der so genannten Biuret-Reaktion, bei welcher es zu einer Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine im alkalischem Medium kommt, was mittels nachfolgender kolorimetrischer Messung eine Bestimmung der Proteinkonzentration ermöglicht. Es wurde entsprechend des Protokolls des Herstellers gearbeitet. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde bovines Serum Albumin (BSA) als Standard benutzt. Alle Messungen erfolgten im Doppelansatz.

3.2.6.7 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts (SHAPIRO et al., 1967). Durch Denaturierung und Anlagerung des anionischen Detergenz SDS werden sie bestimmt durch ihr Molekulargewicht geladen und wandern unterschiedlich schnell im elektrischen Feld. Die Trennung erfolgt im diskontinuierlichen Puffersystem (LAEMMLI, 1970). Benutzt wurden 4 %ige Sammelgele und je nach Größe der Proteine 10 oder 12,5 % ige Trenngele. Die Herstellung der Gele erfolgte nach SAMBROOK und RUSSELL (2001). Die Proteinprobe wurde mit Probenpuffer im Verhältnis 2:1 versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt, 5 min auf Eis gestellt und danach 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nachdem 15 µl der Probenlösung, sowie ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichts-Marker (BioRad, München) in die einzelnen Probentaschen pipettiert worden waren, wurde eine Spannung von 120 mV für ca. 2 h an die Elektrophoresekammer angelegt. Das Gel wurde entweder gefärbt, getrocknet und aufbewahrt oder ungefärbt im Immunoblot verwendet. Die Färbung erfolgte in Coomassie Brilliantblau-Färbelösung für 1 h bei RT und anschließender Entfärbung mit dem farbstofffreien Lösungsmittel (Coomassie-Brilliantblau-Entfärbelösung). Die gefärbten Gele wurden zur Dokumentation fotografiert und in einem Geltrockner (Promega GmbH, Mannheim) getrocknet.

3.2.7 Immunologische Methoden

3.2.7.1 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Die aufgereinigten Fusionsproteine GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3 wurden in jeweils 6 Portionen à 200 µg in physiologischem Puffer (PBS) zur Immunisierung von Kaninchen verschickt (Seqlab, Göttingen). Die Auswahl geeigneter Tiere erfolgte nach Testung von Präimmunseren im Immunoblot Verfahren, um zu gewährleisten, dass die Tiere nicht bereits Antikörper gegen die zu inokulierenden Antigene aufweisen. Alle zehn untersuchten Kaninchen zeigten schwache Signale gegen Proteine des *E. coli*-K12 Stamms, jedoch keine Signale gegenüber den zwei Fusionsproteinen. Es wurden pro Antigen zwei Tiere ausgewählt. Die Antigene wurden dreimal im Abstand von 21 Tagen zusammen mit einem, die Immunantwort steigernden Adjuvanz subkutan als Depot injiziert. Den Kaninchen wurde dreimal jeweils 14 Tage nach der Antigen-Injektion Blut entnommen, bei 15.000 rpm 15 min zentrifugiert, und das gewonnene Serum bei -70 ℃ aufbewahrt.

3.2.7.2 Immunoblot

Das Prinzip des Immunoblots beruht auf der spezifischen Bindung zwischen Antikörpern und ihren Antigenen. An das nachzuweisende, an eine Membran gebundene Protein (Antigen) lagert sich der primäre Antikörper, der es spezifisch erkennt. Ein sekundärer Antikörper (Autoimmunglobulin-Antikörper), an dem ein Enzym gekoppelt ist, erkennt den ersten Antikörper, nicht jedoch das nachzuweisende Protein. Das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym setzt ein hinzugefügtes Substrat in einer Farbreaktion um und visualisiert somit die gebildeten Immunkomplexe.

Das in Towbin-Transfer-Puffer äguilibrierte SDS-Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran "Optitran BA-S-85" (Whatmann BioScience, Middlesex, UK) aufgelegt und zwischen zwei in Towbin-Transfer-Puffer getränkten Elektrodenpapieren (BioRad, München) in die SemiDry Transferkammer verbracht. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel in die Membran erfolgte bei RT über 35 min bei einer Spannung von 15 Volt. Der Erfolg des Transfers wurde durch den vorgefärbten Molekulargewichts-Marker, sowie durch eine Ponceau-Rot-Färbung der Membran überprüft. Zur Absättigung der überschüssigen Bindungsstellen der Membran wurde diese über Nacht bei 4 °C in frisch angesetztem Blockpuffer geschwenkt und so eine unspezifische Adsorption der eingesetzten Antikörper verhindert. Die Membran wurde 2 x 15 min in TBS-Lösung gewaschen, danach mit dem primären Antikörper (Kaninchen-Ak gegen GST-Ag-LifA2 bzw. GST-Ag-LifA3) bei RT für 2 h schwenkend inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-Lösung wurde die Membran bei RT für 1,5 h mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Kaninchen-Ak, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) inkubiert. Die Membran wurde gewaschen wie beschrieben und anschließend mit dem Substrat der Peroxidase DAB (3,3'-Diaminobenzidin; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) schwenkend inkubiert, bis die Kontroll-Banden gut sichtbar waren. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Membran getrocknet.

3.2.7.3 Adsorption der Immunseren mit E. coli-K12 Proteinen

Durch die Adsorption der Immunseren mit Proteinen eines E. coli-Laborstamms werden

unspezifische Antikörper geblockt und von den spezifischen abgetrennt.

Zur Gewinnung der *E. coli*-Laborstamm Proteine wurden 10 ml einer Übernachtkultur des MG1655 bei 5.000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 1 ml PBS aufgenommen und einer Ultraschallbehandlung (5 x 10 sec, Mikrospitze, Stärke 4, 50 %) unterzogen. Die Fällung der nun zugänglichen Proteine erfolgte durch Zugabe von 5 ml -20 °C kaltem Aceton und Inkubation auf Eis für 20 min. Nach 20 minütiger Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 °C wurde das Pellet in 5 ml -20 °C kaltem Aceton aufgenommen und erneut für 20 min auf Eis gestellt. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das entstandene Proteinpulver auf Filterpapier zum Trocknen ausgebreitet. Anschließend wurde das Kaninchen-Serum 1/10 (w/v) mit dem Proteinpulver versetzt und unter leichtem Schwenken 30 min bei RT inkubiert. Die gebundenen unspezifischen Antikörper wurden 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.8 Methoden der Zellkultur

3.2.8.1 Kultivierung der HEp2-Zelllinie

Die eukaryotischen Zellen wurden mit 10 % DMSO versetzt und in einem Cryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -198 °C gelagert. Eingefrorene HEp2-Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut. Nach Aufnahme in 10 ml eines 37 °C warmen Erhaltungsmediums (DMEM -Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum -FKS) wurden sie 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Erhaltungsmedium (DMEM + 10 % FKS) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche Die Kulturen wurden bei 37 ℃ und 5 %iger CO₂-Spannung in verbracht. wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Zur Ernte wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 % Trypsin und 0,2 % EDTA in PBS-Lösung) inkubiert. Abgelöste Zellen wurden erneut zweimal mit 10 ml Zellkulturmedium gewaschen. Die Zellzählung erfolgte nach anfärben mit Trypanblaulösung in einer Zählkammer nach Thomas. Die für den Test erforderliche Zelldichte wurde durch Zugabe von Medium eingestellt. Ein Zehntel der entnommenen Zellsuspension wurde in die Kuturflasche zurückpipettiert, auf 10 ml Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FKS) aufgefüllt und für den Erhalt der Zelllinie weiter im Brutschrank inkubiert. Mediumwechsel fand nach mikroskopischer Kontrolle, spätestens nach 3 Tagen statt.

3.2.8.2 Zellkulturtest zum Nachweis von Efa1/LifA

Die HEp2-Zellen der Stammkultur wurden 48 h vor dem Test wie unter Punkt 3.2.8.1 beschrieben geerntet, in Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FKS) aufgenommen und gezählt. Die Aussaat von 0,5 x 10⁵ Zellen/Vertiefung/ml erfolgte in 12-Loch-Platten auf sterile Glasplättchen (Ø 15 mm, Carl Roth GmbH & Co, Karslruhe). 18 h vor dem Test wurden Einzelkolonien der Bakterienstämme in sterilem LB-, Penassav-, RPMI- oder M9-Minimal-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelinkubiert. Am Tag des Tests wurden die Übernachtkulturen in frisches Medium 1:100 überimpft und erneut bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6, 1,0 oder 2,0 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und durch Verdünnung mit FKS-freiem DMEM-Medium eine "Mutiplicity of Infection" (MOI) von 10 resp. 100 eingestellt (1 x 107 resp. 1 x 108 Bakterien/ml). Bei der Berechnung der MOI wurde davon ausgegangen, dass sich die Anzahl der eingesäten Zellen innerhalb von 48 h verdoppelt. Nachdem die vorbereiteten Zellkultur-Monolayer zweimal mit PBS-Lösung gewaschen worden waren, erfolgte die Beimpfung mit 1 ml der Bakteriensuspension. Einer ersten Inkubationsperiode von 3 h (37 °C) folgte die Abnahme des Überstands, dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit PBS-Lösung, Zugabe von jeweils 1 ml FKS-freiem DMEM und eine zweite Inkubationsperiode von 3 h bei 37 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei 4 ℃ fixiert, erneut gewaschen und ü.N. bei 4 ℃ in 0,1 %iger BSA-PBS-Lösung aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die HEp2-Zellen schonend auf RT erwärmt, mit den primären Kaninchen-Antikörperseren (Ak-GST-LifA2 bzw. Ak-GST-LifA3) versetzt und 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Die zum Teil mit Proteinen des *E. coli*-K12 Stamms MG1655 adsorbierten Antikörperseren wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:100; 1:200; 1:400; 1:800) in 0,1 %iger BSA-PBS-Lösung verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit eiskalter PBS-Lösung wurde der TRITC- (Tetrametylrhodamin Isothiocyanat) konjugierte Anti-Kaninchen Antikörper in einer 1:200 Verdünnung in 0,1 %iger BSA-PBS-Lösung zugegeben und 30 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen und je nach weiterer Verwendung 2 min mit 20 µl (1 µg/ml) DAPI-(4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid) oder mit 20 µl (5 µg/ml) PI- (Propidiumjodid) DNS-Färbelösung gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit A. bidest entfernt. Abschließend wurden die Glasplättchen mit einem Schnelleindeckelmedium auf einen Objektträger aufgeklebt. Die Präparate wurden mittels Licht-, Immunfluoreszenz (Leica DMLB, Heerbrugg, CH) und konfokalem Laserscan Mikroskop (Leica DMLB, Heerbrugg, CH) untersucht.

3.2.9 Computerprogramme

Die folgenden Computerprogramme wurden zur Analyse von DNS- und AS-Sequenzen, zur Auswahl von Oligonukleotid-Primern, zur Dokumentation der mikroskopisch gewonnenen Ergebnisse sowie zur Erstellung von Graphiken und Texten verwendet:

- Lasergene 2000 software package® (Dnastar Ltd., London, UK)
- Microsoft[®] Office (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- Gap4 (The Gap Group, Mathematical Institute St. Andrews, UK)
- HUSAR (DKFZ, Heidelberg, BRD)
- Expasy Molecular Biology Server (Institut für Bioinformatik, Genf, CH)
- Basic Logic Alignment Search Tool (Nation Center For Biotechnology Information)
- Leica Confocal Software (Leica AG, Heerbrugg, CH)

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der LEE-PAI im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)

4.1.1 Sequenzanalyse der LEE-PAI

In Vorarbeiten wurde eine den "locus of enterocyte effacement" (LEE) enthaltende Pathogenitätsinsel (PAI) im bovinen EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) doppelsträngig sequenzanalysiert und partiell charakterisiert. Die Annotierung der Sequenz-Rohdaten erfolgte unter Anwendung des Computerprogramms Gap4. Inseriert war die 111 kb lange PAI im Phenylalanin- (*pheV*) tRNS-Locus, an 67 min des *E. coli*-K12 Chromosoms. Die komplexe Zusammensetzung der PAI, die neben der 34 kb großen LEE-Kernregion das etwa 41 kb stromaufwärts lokalisierte 24 kb umfassende genetische O-Insel 122 (OI-122) Homolog beinhaltete, führte zu der Bezeichnung Mosaik PAI (Abbildung 3). Der G+C-Gehalt innerhalb der LEE-Kernregion war mit 38 % deutlich und innerhalb der OI-122 mit 45 % mäßig niedriger als der *E. coli*-K12 Durchschnitt von 50,8 %.

Die LEE-Kernregion wurde von zwei Insertionssequenzen (*IS*) *629* flankiert und umfasste 40 ORFs, die in Struktur und Orientierung den LEE-PAI-ORFs der Referenzstämme E2348/69 (O127:H6), EDL933 (O157:H7), 413/89-1 (O26:NM) und RDEC-1 (O15:H-) entsprachen. 38 der ORFs waren zu mindestens 97 % identisch mit den LEE-ORFs der Referenzstämme. Die höchste Übereinstimmung, 95 % über die gesamte Nukleotidsequenz der LEE-Kernregion, hatte der EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) mit dem EHEC-Stamm 413/89-1 (O26:NM). Abweichungen zeigten die Gene des LEE-encoded regulator (*ler*) und des LEE-sezernierten Proteins F (*espF*). Die Insertion eines kompletten *IS10* Elements führte zur Verkürzung des *ler* um 49 bp am 3'-Ende. Das *espF* war mit 884 bp deutlich länger als die homologen Gene beim EPEC-Stamm E2348/69 (621 bp), bei den EHEC-Stämmen EDL933 und 413/89-1 (746 bp resp. 623 bp) sowie bei den REPEC-Stämmen RDEC-1 und 83/39 (483 bp resp. 482 bp). Der LEE-Kernregion des EHEC-Stamms RW1347 fehlten, ebenso wie den beiden REPEC-Stämmen RDEC-1 und 83/39, das ERIC (enteric repetitive intergenic consensus) Element und der ORF3, welche im E2348/69 und EDL933 vorkamen.

Die Analys des 24 kb großen Homologs der EHEC O157:H7 O-Insel 122 offenbarte 18 ORFs. Die Gene der nicht-LEE-kodierten Effektorproteine *nleB* (*orf12*) und *nleE* (*orf13*) sowie das putative Virulenzgen *ent* des RW1374 waren 100 % identisch mit denen der O157:H7 OI-122. Das *efa1/lifA* stellte die große Genversion mit 9.672 bp dar. Das OI-122 Homolog des RW1374 wurde von zwei intakten, zur *IS3* Familie gehörenden *IS629* Elementen flankiert, die einerseits O157:H7 EHEC Transposasen und andererseits ein vom Bakteriophagen phi 4795 kodiertes hypothetisches Protein beinhalteten. Weitere mobile

Elemente der genetischen Insel waren vier putative Transposasen, von welchen zwei das *efa1/lifA* Gen flankierten und zu 100 % identisch mit putativen Transposasen bei EHEC (O157:H7) und REPEC (O15:H-) waren. Das für eine Prophagen P4-ähnliche Integrase kodierende Gen *int* befand sich bei den AEEC-Referenzstämmen E2348/69, EDL933, RDEC-1 und anderen sequenzanalysierten Stämmen stromaufwärts der OI-122 in unmittelbarer Nachbarschaft zum *pheU/pheV*-tRNS-Locus. Im bovinen EHEC-Stamm RW1374 zerstörte die Insertion eines der *IS629* Elemente das 1.266 bp lange Integrasegen, so dass nur das erste Drittel erhalten blieb.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden in die EMBL-Datenbank unter der Acc. Nr.: AJ303141 eingegeben.



Abb. 3: Schematische Darstellung der genetischen Organisation der Mosaik LEE-PAI des EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2)

4.1.2 Analyse der offenen Leserahmen (Stand: 09/2004)

Der 111 kb lange doppelsträngig sequenzanalysierte DNS-Bereich des bovinen EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2) wurde, wie unter Punkt 3.2.4.9. ausgeführt, hinsichtlich offener Leserahmen (Open reading frame – ORF) überprüft. Es wurden über 150 potentiell kodierende Regionen identifiziert, wovon 106 signifikante Ähnlichkeiten (mindestens 30 % Identität auf Ebene der Aminosäuresequenz) zu bereits definierten Genen oder Proteinen aufwiesen und als ORFs gewertet wurden (Anhang: Tabelle A). Von den 106 ORFs waren 40 in der LEE-Kernregion, 18 in der genetischen Insel OI-122 und 48 entweder im DNS-Abschnitt zwischen den genannten Regionen oder stromabwärts der LEE-Kernregion lokalisiert (Abbildung 3). Eine große Anzahl der ORFs hatte Übereinstimmung mit hypothetischen Proteinen des EHEC-Stamms 413/89-1 (O26:NM). Im Bereich zwischen der LEE-Kernregion und der OI-122 lagen acht resp. sieben ORFs mit großer Ähnlichkeit zu hypothetischen Proteinen des aviären pathogenen *E. coli*- (APEC) Stamms BEN2908 (O2:K1:H5) resp. des uropathogenen *E. coli*- (UPEC) Stamms CFT073 und sechs putative Stoffwechselproteine des EHEC EDL933 (O157:H7).

Einzelheiten der ORF-Analyseergebnisse sind der im Anhang aufgeführten Tabelle A zu entnehmen.

4.2 Charakterisierung der Gene *efa1/lifA* und *ent* sowie deren Produkte

Charakterisierung des efa1/lifA sowie dessen Produkts

Das virulenzassoziierte, als EHEC factor for adherence 1 (*efa1*) und bei EPEC-Stämmen als lymphocyte inhibitory factor A (*lifA*) bezeichnete Gen, war 9.672 bp groß und lag mit einem G+C-Gehalt von 41 % unter dem chromosomalen *E. coli*-K12 Durchschnitt von 50,8 %. Nachgewiesen wurde es bereits in verschiedenen AEEC-Stämmen sowie im *Citrobacter (C.) rodentium*, in dem es geringfügig kürzer war. Die Sequenzdaten waren von 10 Stämmen vollständig und von einem Stamm partiell bekannt (Tabelle 6).

Stamm (Pathovar)	Serovar	Gen (Größe)	Acc. Nr.	Referenz
E45035 (EHEC)	O111:H-	<i>efa1</i> (9.672 bp)	AF159462	NICHOLLS et al., 2000
413/89-1 (EHEC)	O26:NM	<i>efa1-lifA tox</i> (9.672 bp)	AJ277443	BENKEL und CHAKRABORTY, 2000

Tab. 6: Überblick über die sequenzierten efa1/lifA Gene

Stamm	Sorovar	Gon (Größo)	Acc. Nr.	Poforonz	
(Pathovar)	Seloval	Gen (Grobe)	ACC. NI.	neleleliz	
493/89	0157·H-	$e_{f_{2}1}(9.672 \text{ bn})$	A 1459584	IANIKA at al. 2002	
(EHEC)	0107.11	eiar (3.072 bp)	AJ459564		
EDL933	O157·H7	<i>efa1a</i> (1.302 bp); <i>efa1b</i>	AE005174	PERNA et al 2001	
(EHEC)	0107.117	(828 bp)			
Sakai	O157·H7	<i>ECs3860</i> (1.302 bp);	B400007	HAVASHLet al. 2001	
(EHEC)	0107.117	<i>ECs3861</i> (828 bp)	BAUUUUUI	TATASHI EL dl., 2001	
E2348/69	O127·H6	/ifA (9.672 hn)	A 1133705		
(EPEC)	0127.110		A0100700		
RDEC-1	015·H-	/ifA (9.672 hn)	AY840983	ZUH et al. 2001	
(REPEC)	010.11		///040000	2011 01 01., 2001	
83/39	015·H-	<i>efa1</i> (9.672 bp)	AF453441	TAUSCHEK et al. 2002	
(REPEC)	010.11		/ 100111		
C. rodentium		<i>efa1/lifA</i> (9.627 bp)	AY726731	KLAPPROTH et al., 2005	
RW1374	O103·H2	<i>efa1/lifA</i> (9.672 bp)	A.1303141	JOBES et al. 2005	
(EHEC)				001120 01 di., 2000	
API S144552	0145·H-	lifA partiell (537 bp)	AY123843	GABCIA et al. 2002	
(EPEC)					

Bisher konnten eine "lange" *efa1/lifA*- (9.672 bp bzw 9.627 bp) und eine "verkürzte" *efa1*- (2.130 bp) Genvariante identifiziert werden. Erstere kodierte einen ORF, die kürzere, trunkierte Form kodierte für zwei ORFs *efa1a* und *efa1b* (1.302 und 828 bp).

Das *efa1/lifA* Gen des EHEC RW1374 (O103:H2) kodierte ein 3.223 AS großes Produkt mit einem theoretischen Molekulargewicht von 365 kDa. Die Sequenzanalyse, deren Ergebniss in Abbildung 4 schematisch wiedergegeben wird, ergab Ähnlichkeiten zu verschiedenen Proteinen sowie konservierte Domänen und Motive. Identität (I) bedeutet, dass die Aminosäuren exakt übereinstimmen und Ähnlichkeit (Ä), dass die Aminosäuren ähnliche Struktur haben und so dieselbe oder ähnliche Funktion im Protein übernehmen können. Eine Identität von ≥ 30 % über die gesamte Länge wurde als signifikant angenommen.



Abb. 4: Schematische Darstellung der Identitäten (I - exakte Übereinstimmung der AS) und Ähnlichkeiten (Ä - ähnliche Struktur der AS) des EHEC RW1374 Efa1/LifA zu bekannten Proteinen sowie die Lokalisation konservierter Motive und Domänen. Erläuterungen siehe Text.

Efa1/LifA hatte 28 % Identität und 47 % Ähnlichkeit zu dem putativen Virulenzfaktor ToxB der EHEC-Serovar O157:H7. Das auf dem pO157 EHEC-Virulenzplasmid kodierte ToxB war mit 3.169 AS etwas kleiner als Efa1/LifA, und scheint sowohl adhäsionsverstärkende als auch immunmodulierende Fähigkeiten zu besitzen. 36 % Identität und 56 % Ähnlichkeit hatte Efa1/LifA zu Proteinen dreier obligat intrazellulärer Pathogene, *Chlamydia (C.) caviae* (putatives Zytotoxin), *C. felis* (Adhäsionsfaktor) und *C. muridarum* (Adhäsionsfaktor). Bei *C. muridarium* waren die zu *efa1/lifA* homologen Sequenzen in dreifacher Ausführung direkt aneinander. Den 3.255 und zweimal 3.336 AS großen Proteinen (TC0437, Tc0438, TC0439) werden ädhäsive Fähigkeiten zugeschrieben.

Die N-Termini von Efa1/LifA und ToxB zeigten je etwa 40 % Ähnlichkeit zu den 480 Nterminalen Aminosäuren der großen Clostridien Toxine (large clostridial toxins -LCTs), namentlich des α Toxins von *Clostridium* (*C.*) *novyi*, der Toxine A und B von *C. difficile* und des Letaltoxins von *C. sordellii*. Die über 270 kDa großen Zytotoxine greifen direkt in die Signaltransduktion der Wirtszellen ein, indem sie kleine GTP-bindende Proteine (Rho, Rha) glykosylieren und dadurch inaktivieren. Unsere Analyse zeigte, dass die bei Efa1/LifA, ToxB und den LCTs konservierte Region ein zur Glykosylfamilie gehörendes DXD-Motiv beinhaltete, das auch die Efa1/LifA-homologen Adhäsionsfaktoren von *Chlamydia muridarum* aufwiesen. In Efa1/LifA befand sich diese konservierte Domäne im Bereich 505-587 AS. Das DXD-Motiv besteht aus einer bestimmten Abfolge von Aminosäuren ("D" bezeichnet Aspartat und "X" eine beliebige Aminosäure) und ist die Zucker-bindende Region einer Glykosyltransferase, die unter Verwendung von Zucker-Nukleosid-Diphosphat und divalenten Kationen Kohlenhydrate an Proteine bindet. Das Efa1/LifA des RW1374 wies in dem 84 AS langem Bereich eine 99 %ige Übereinstimmung mit der Glykosyltransferase-Zucker-bindenen Region auf (Protein Familie: pfam04488).

Efa1/LifA, ToxB und die *C. muridarum* Adhäsionsfaktoren hatten ein Cysteinprotease-Motiv, dessen proteolytische Aktivität von drei konservierten Aminosäuren bestimmt wurde. In dem von uns charakterisierten Efa1/LifA waren dies Position 1.466 (Cystein), 1.568 (Histidin) und 1.584 (Aspartat). Das Cysteinprotease-Motiv liegt in einigen anderen bakteriellen Proteinen vor und wurde eingehend für YopT (*Yersinia* outer membrane protein T) charakterisiert.

Eine dritte konservierte Region umfasste die Aminosäuren 1.947 bis 1.957 des Efa1/LifA Proteins und kodierte für ein Aminotransferase-II-Motiv. Das aus zehn Aminosäuren (TMGKALSASA) bestehende Motiv findet sich in Pyridoxal-Phosphat-abhängigen Enzymen, welche das Coenzym kovalent an einen Lysin Rest heften.

Durch die Limitierung der Sequenzanalyse auf die N-terminalen 600 AS des RW1374 Efa1/LifA identifizierten wir, neben den bereits ausgeführten LCTs, weitere relevante Ähnlichkeiten. So hatte das Protein über eine Länge von 560 AS 35 %ige Identität und 57 %ige Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein CT166 bei *Chlamydia trachomatis*, das ebenfalls ein DXD-Motiv beinhaltet. Übereinstimmungen bestanden auch mit eukaryotischen Proteinen. Die 500 N-terminalen AS waren 19 % identisch und 37 % ähnlich mit dem Retikulozyten-bindenden Protein 2 von *Plasmodium vivax* (PvRBP2). PvRBP2 bindet an Sialinsäure-abhängige Rezeptoren auf der Oberfläche von Erythrozyten und spielt bei der Invasion derselben durch den Malaria-Erreger eine wichtige Rolle. Weitere 18 %ige Identität und 37 %ige Ähnlichkeit lag zu dem so genannten rhoptry Protein (Rhop) von *Plasmodium yoelii* vor. Dieses, ebenfalls in die Adhäsion involviert, wird vom Erreger während der Invasion des Erythrozyten an dessen Oberfläche transferiert und vermittelt die Bindung des infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen der Blutgefäße. 19 %ige Identität und 37 %ige Ähnlichkeit bestand zu dem Aktin-bindenden Protein Interaptin von *Dictyostelium discoideum*, dessen genaue Funktion unklar ist.

Wir konnten im Efa1/LifA Protein des RW1374 zwei potentielle Prepilin Peptidase (PPD)-

52

Prozessierungsstellen nachweisen. Die für PPD-prozessierte Proteine entscheidenden sowie konservierten Aminosäuren lagen an Position 54 und 772. Eine putative transmembrane Domäne befand sich zwischen Aminosäure 2.001 und 2.033. Das Efa1/LifA Homolog ToxB hat ebenfalls eine putative transmembrane Domäne an ähnlicher Position (1.961 – 1.980 AS). In den C-terminalen 2.000 Aminosäuren wurden keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen oder Motiven gefunden.

Charakterisierung des ent sowie dessen Produkts

Das putative Enterotoxin-Gen (ent) des EHEC RW1374 hatte eine Molekulargröße von 1.650 bp und war bereits in pathogenen EHEC- und EPEC-, in nicht-pathogenen E. coli- sowie in Citrobacter rodentium Stämmen nachgewiesen worden. Genseguenzdaten waren von sechs Stämmen [EHEC EDL933 (O157:H7), EHEC RW1374 (O103:H2), EHEC 413/89-1 (O26:NM), EPEC E2348/69 (O127:H6), REPEC 83/39 (O15:H-) und C. rodentium DBS100] bekannt und zeigten einen hohen Grad an Konservierung (> 99 % identische Nukleinsäuren). Der G+C-Gehalt des Gens war mit 31 % deutlich unter dem E. coli-K12 Durchschnitt (50,8 %). In der Aminosäureseguenz stellten wir eine 38 %ige Identität und 58 %ige Ähnlichkeit zum Shigella flexneri Enterotoxin 2 (ShET-2) fest. Dieses auf dem Invasionsplasmid (pINV) einiger pathogener Shigellen und enteroinvasiver E. coli (EIEC) kodierte Toxin war mit 565 AS nur unwesentlich länger als Ent (549 AS). Weiterhin wies Ent über eine Länge von 342 AS 24 % Identität und 46 % Ähnlichkeit zu den 496 AS großen putativen Enterotoxinähnlichen Proteinen (SenA) von Yersinia pestis und Y. pseudotuberculosis auf. Übereinstimmung (23 % Identität, 44 % Ähnlichkeit) fanden wir mit dem 728 AS großen Regulator der Acetyl-CoA Synthetase des O157:H7 EHEC EDL933 bzw. Ankyrin-ähnlichen Regulator-Protein (Arp) des E. coli-K12 Laborstamm, die beide in die Regulation der Fettsäure- und Phosphatidsäure-Biosynthese involviert sind.

Die Analyse der Ent Proteinsequenz des RW1374 ergab keine Hinweise auf Motive, konservierte Domänen oder für die Sekretion oder Prozessierung typische Signalsequenzen.

4.3 Vergleich des OI-122 Homologs des EHEC RW1374 mit anderen sequenzanalysierten OI-122 Regionen

Die Mosaik PAI des EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2) beinhaltete ein Homolog der O157:H7 EHEC genetischen O-Insel 122 (Abbildung 5). Diese war gemeinsam mit der 40 kb stromabwärts gelegenen LEE-Kernregion im *pheV*-tRNS-Locus inseriert.

In der RW1374 OI-122 waren zwei putative Virulenzgene *ent* und *efa1/lifA*, zwei nicht-LEE kodierende Effektorproteine NIeB und NIeE sowie 14 ORFs mit hypothetischer Funktion

lokalisiert (Tabelle 7). Die Gene ent, nleB und nleE des RW1374 waren identisch mit denen der O157:H7 OI-122. Das efa1/lifA bestand beim RW1374 aus einem ORF mit 9.672 bp und war somit länger als das trunkierte efa1' der O157:H7 Serovar. Der OI-122 des RW1374 fehlte das putative Virulenzgen pagC und vom Prophagen P4-ähnlichen Integrase Gen (int), das benachbart zum pheV-tRNS-Locus lag, die 3'-terminalen zwei Drittel. Zerstört wurde das int durch eines der IS629 Elemente, von welchen die OI-122 stromauf- und stromabwärts begrenzt wurde. Sie gehörten zur IS3-Familie und beinhalteten jeweils eine EHEC O157 Transposase sowie ein vom Bakteriophagen phi 4795 kodiertes hypothetisches Protein. Weitere mobile Elemente der OI-122 waren vier putative Transposasen, wovon zwei das efa1/lifA Gen flankierten und zu 100 % identisch mit putativen Transposasen bei EHEC und REPEC waren. Das IS-Element stromaufwärts von efa1/lifA wurde, da zu 88 % identisch mit einem bei Shigella flexneri beschriebenen IS630 Element, als IS630-ähnlich bezeichnet. Weiterhin fanden wir sechs hypothetische Proteine unbekannter Funktion, wovon vier 100 % identisch zu hypothetischen Proteinen der EHEC-Stämme 413/89-1 (O26:NM) und EDL933 (O157:H7) und zwei 99 resp. 78 % identisch zu hypothetischen REPEC 83/39 (O15:H-) resp. EHEC 413/89-1 Proteinen waren.

Die genetische Insel OI-122 des EHEC-Stamms RW1374 wurde mit bekannten ähnlichen Strukturen in EPEC und EHEC [E2348/69 (O127:H6), 413/89-1 (O26:NM), 83/39 (O15:H-)] verglichen (Abbildung 5). Die Größe der OI-122 variierte von 22,1 kb im 413/89-1 bis 27,7 kb im E2348/69. Inseriert war sie entweder im *pheV*-tRNS-Locus (EDL933, E2348/69, RW1374) oder im *pheU*-tRNS-Locus (413/89-1, 83/39). Eine direkte Verbindung zur LEE-Kernregion gab es im REPEC 83/39 (364 bp), im EHEC 413/89-1 (491 bp) und im EHEC RW1374 (41,7 kb). Die beim EHEC EDL933 und EPEC E2348/69 im *selC*-tRNS-Locus inserierte LEE-Kernregion war bei ersterem 0,7 Mb von der OI-122 entfernt, bei letzterem konnte aufgrund unvollständiger Sequenzdaten zum Zeitpunkt der Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Der Sequenzabschnitt, der die Gene *ent*, *nleB*, *nleE*, *efa1/lifA* sowie die putative Transposase des *IS630*-ähnlichen Elements umfasste, war in den fünf Stämmen (RW1374, 413/89-1, EDL933, E2348/69, 83/39), mit Ausnahme des trunkierten O157:H7 EHEC (EDL933) *efa1*' Gens (2.130 bp der 5'-terminalen Region), hoch konserviert und nahezu identisch. Diesen hohen Grad an Konservierung offenbarten auch die *C. rodentium* Gene *ent*, *nleB*, *nleE* und *efa1/lifA*, jedoch war die Sequenz der gesamten kodierenden Region nicht veröffentlicht. Signifikante Übereinstimmung hatten der O157:H7 EHEC und der O127:H6 EPEC im Bereich stomabwärts des *pheV*-tRNS-Locus bis zum Gen *ent*, wo neben einigen mobilen Elementen das *pagC* beherbergt war. Das Bakteriophagen P4-ähnlichen Integrase Gen *int* begrenzte die OI-122 stromaufwärts in allen analysierten Stämmen, mit Ausnahme des RW1374, in welchem das *int* durch ein *IS629* Element zerstört wurde.

54



Abb. 5: Schema der genetischen Organisation der OI-122 Regionen der E. coli-Stämme RW1374, EDL933, E2348/69, 413/89-1 und 83/39

ORF, Gen	Lakalia atian1	Größe	linemenen ähnläches Dustein ²		
oder IS	LOKAIISATION	(bp/AS)	Ursprung, annliches Protein	% AS Identitat	
IS629	1785-3096	1.311/436	IS3 Familie	100 (436/436)	
001	1828-2716	888/295	EHEC EDL933 Transposase für	97 (289/295)	
			IS <i>629</i> (AAG56045)		
002	2715-3042	327/108	Phage phi 4795 hypothetisches	100 (108/108)	
			Protein (CAD88881)		
003	3975-5547	1.572/523	REPEC 83/39 hypothetisches	99 (521/523)	
			Protein (AAL57570)		
004	5292-5637	345/114	EHEC 413/89-1 hypothetisches	78 (39/50)	
			Protein (CAC81894)		
005	5543-7163	1.620/539	REPEC 83/39 putative	99 (538/539)	
			Transposase (AAL57569)		
006	7297-8038	741/246	EHEC EDL933 putative	93 (230/246)	
			Transposase (AAG58108)		
007	7521-7713	192/63	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (63/63)	
			Protein (CAC81891)		
008	8390-8618	228/75	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (75/75)	
			Protein (CAC81889)		
009	8511-8682	171/56	EHEC EDL933 hypothetisches	100 (56/56)	
			Protein (AAG58109)		
010	8550-8745	195/64	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (64/64)	
			Protein (CAC81888)		
ent	8825-10475	1.650/549	EHEC EDL933 putatives	100 (549/549)	
			Enterotoxin Ent (BAB37278)		
			EIEC, Shigella spp. SenA,	38 (209/547)	
			ShET-2 (CAA90938)		
<i>nleB</i> (012)	11081-12071	990/329	EHEC 413/89-1 NIeB	100 (329/329)	
			(CAC81886)		
<i>nleE</i> (013)	12119-12794	675/224	EHEC 413/89-1 NIeE	100 (224/224)	
			(CAC81885)		
IS630-ähnlich	13032-14169	1.137/378	Shigella flexneri 2a IS630 ORF	88 (296/343)	
			(AAL722384)		
014	13171-14017	846/281	EHEC EDL933 putative	100 (281/281)	
			Transposase (AAG58114)		

Tab. 7:	Offene Leserahmen (ORF), Gene und Insertionssequenzen (IS) innerhalb der
	genetischen O-Insel 122 des EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2)

ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe Ursprung, ähnliches Protein ²		% AS Identität
oder IS		(bp/AS)		
efa1/lifA	14671-24343	9.672/3.223	EPEC E2348/69 LifA	98
			(AJ133705);	(3166/3223)
			EHEC E45035 Efa1	98
			(AF159462)	(3169/3223)
IS629	24937-26248	1.311/436	<i>IS3</i> Familie	100 (436/436)
016	24514-24910	396/131	REPEC 83/39 putative	100 (131/131)
			Transposase (AAL57561)	
017	24992-25319	327/108	Phage phi 4795 hypothetisches	100 (108/108)
			Protein (CAD88881)	
018	25318-26206	888/295	EHEC EDL933 Transposase für	97 (289/295)
			IS <i>629</i> (AAG56045);	
			EHEC pO103 putative	97 (289/295)
			Transposase (CAC80497)	

¹: Die Lokalisation ist als Nukleotidposition wiedergegeben, beginnend mit der ersten Base der LEE-PAI Sequenz des RW1374 (GenBank Acc. Nr. AJ303141).

²: Die Homologie Angaben basieren auf der Datenbank-Analyse unter Verwendung von BLAST.

4.4 Nachweis der OI-122 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Um das Vorkommen und die Struktur der genetischen Insel OI-122 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen festzustellen, wurden 268 Stämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung und bei fraglichen Signalen zusätzlich mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) molekular untersucht. Die Existenz der LEE-PAI kann alleine durch den Nachweis des Intimin kodierenden "*E. coli* attaching and effacing" Gens (*eae*) ermittelt werden, da dieses ausschließlich im LEE lokalisiert ist. Auf diese Weise wurde die LEE-PAI bei 164 (61 %) nachgewiesen und die Isolate in zwei Gruppen unterteilt: (i) *E. coli*-Stämme mit LEE-PAI (AEEC - "attaching and effacing" *E. coli*) (ii) *E. coli*-Stämme ohne LEE-PAI (nicht-AEEC).

4.4.1 Vorkommen der virulenzassoziierten Gene *efa1/lifA*, *ent* und *pagC*

Zur Identifizierung der OI-122 wurden die Gene *efa1/lifA*, *ent* sowie *pagC* ausgewählt und ihr Vorkommen in 268 *E. coli*-Stämmen anhand der DNS-DNS-Hybridisierung von Dot-Blots (beispielhaft Abbildungen 6 und 7) folgendermaßen nachgewiesen: Das gesamte *efa1/lifA* Gen war in 73 (27,2 %), die trunkierte Version *efa1*' in 15 (5,6 %) Isolaten vorhanden. Sieben (2,6 %) Stämme ergaben nur für den 3'-terminalen Genbereich ein positives Signal, während ein Stamm in beiden terminalen Bereichen, jedoch nicht im Mittelteil positiv war. Das Gen *ent*

В С D E F G Н I J A 1 2 3 4 5 • 6 0 * 7 * 8 * 9 * 10 *

war in 118 (44 %) und das *pagC* in 58 (21,6 %) der untersuchten Stämme vorhanden. Zur Lokalisation und Bezeichnung der verwendeten Sonden siehe Abbildung 2 unter Punkt 3.1.5.

* = keine DNS aufgetropft

Abb. 6: Autoluminogramm nach DNS-DNS-Hybridisierung einer Dot-Blot Membran mit *E. coli*-Stämmen für den Nachweis des Gens *ent* mittels der Sonde E.

- **Positivkontrollen:** A1: Referenzstamm E2348/69, A2: Referenzstamm RDEC-1, A4: Referenzstamm EDL933, A5: RW1374
- Negativkontrolle: A3: E. coli-K12 Laborstamm MG1655
- *E. coli*-Isolate: Spalten B bis J



* = keine DNS aufgetropft

- Abb. 7: Autoluminogramm nach DNS-DNS-Hybridisierung einer Dot-Blot Membran mit *E. coli*-Stämmen für den Nachweis der 3'-terminalen Region des Gens *efa1/lifA* mittels der Sonde B.
 - **Positivkontrollen:** A4: RW1374, A6: Referenzstamm RDEC-1, A7: Referenzstamm E2348/69
 - Negativkontrollen: A2: Referenzstamm EDL933, A3: *E. coli*-K12 Laborstamm MG1655
 - E. coli-Isolate: A8 bis O4
 - ECOR-Stämme: O5 bis U11

4.4.2 Kombination und Lokalisation der Gene efa1/lifA, ent und pagC

Die genetische O-Insel 122 gibt es in einer vollständigen, die drei Gene *efa1/lifA*, *ent* und *pagC*, sowie einer unvollständigen, nur zwei der Gene beinhaltenden Version. Ist nur eines der Gene vorhanden, wird nicht von einer genetischen Insel ausgegangen. Von den untersuchten *E. coli*-Stämmen hatten 51 (19 %) eine vollständige und 43 (16 %) eine unvollständige OI-122. 174 (65 %) hatten nur eines oder keines der Gene (Tabelle 8). Die Kombination *efa1/lifA* – *ent* lag 36mal und die Kombination *ent* - *pagC* sieben mal vor. Die Kombination *efa1/lifA* - *pagC* gab es nicht.

Nach Ermittlung der Gene sollte sichergestellt werden, dass sie benachbart und somit innerhalb einer genetischen Insel lokalisiert waren. Zu diesem Zweck wurden PCRs durchgeführt, welche die Region zwischen den Genen überspannten. Für die Verbindung zwischen *pagC* und *ent* wurde das Primerpaar PaEn-fw und PaEn-rev, für die Verbindung

zwischen ent und efa1/lifA das Primerpaar EnLi-fw und LiEn-rev verwendet.

Von den 58 *pagC*- und *ent*-positiven Stämmen ergaben 54 ein Amplifikat, womit die benachbarte Lokalisation der Gene bewiesen wurde. Die Größe des PCR-Produkts war bei 51 Stämmen 3,6 kb. Zweimal war es größer (4,0 resp. 4,5 kb) und einmal kleiner (3,0 kb). Für 4 Stämme konnte auch nach wiederholten Versuchen keine Nachbarschaft der Gene nachgewiesen werden.

Von den 87 *ent-* und *efa1/lifA-*positiven Stämmen ergaben 85 ein 4,6 kb großes Amplifikat, was ihre örtliche Verbindung bewies. Zwei Stämme ergaben kein Amplifikat.

4.4.3 Assoziation zwischen dem Auftreten der OI-122 und der LEE-PAI

Alle OI-122 positiven Stämme, 51 mit vollständiger und 43 mit unvollständiger genetischer Insel besaßen die LEE-PAI. Die 51 Stämme mit vollständiger OI-122 wiesen verschiedene Versionen des *efa1/lifA* Gens auf: 35 waren für drei Regionen, 15 nur für die 5`-Region und einer für die 5'- und 3'-Regionen aber nicht für den Mittelteil des Gens positiv. Stämme mit unvollständiger OI-122 waren für zwei der getesteten Gene positiv, entweder in der Kombination *efa1/lifA* - *ent* (36 Stämme) oder *pagC* - *ent* (7 Stämme). Alle OI-122 positiven Stämme waren AEEC, jedoch hatten 20 AEEC-Stämme nur eines (13 *ent* und 7 *efa1/lifA*) und 50 keines der drei Gene. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Assoziation der OI-122 Virulenzgene und der LEE-PAI bei nicht-AEEC- und AEEC-Stämmen ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tab. 8:	Verteilung der Gene efa1/lifA (unterteilt in drei Regionen), ent und pagC bei nicht-
	AEEC- und AEEC-Stämmen bezüglich des Vorkommens der OI-122. ("+" steht für
	Gen-Nachweis; "-" steht für kein Gen-Nachweis)

	Patho- var		efa1/lifA					
		Anzahl	5'-	mittlere	3'-	ent	pagC	OI-122 ¹
			Region	Region	Region			
AEEC (164	EHEC	15	+	+	+	+	+	voll.
Gesamt)	EPEC	20	+	+	+	+	+	
	EHEC	13	+	-	-	+	+	
	EPEC	2	+	-	-	+	+	
	EHEC	0	+	-	+	+	+	
	EPEC	1	+	-	+	+	+	
	EHEC	20	+	+	+	+	-	
	EPEC	16	+	+	+	+	-	
	EHEC	6	-	-	-	+	+	
	EPEC	1	-	-	-	+	+	
	EHEC	2	-	-	-	+	-	
	EPEC	11	-	-	-	+	-	keine
	EHEC	1	+	+	+	-	-	
	EPEC	0	+	+	+	-	-	
	EHEC	1	-	-	+	-	-	
	EPEC	5	-	-	+	-	-	
	EHEC	10	-	-	-	-	-	
	EPEC	40	-	-	-	-	-	
Nicht-AEEC		91	-	-	-	-	-	
(104		11	-	-	-	+	-	keine
Gesamt)		1	+	+	+	-	-	
		1	-	-	+	-	-	

¹: voll.: vollständige OI-122; unvoll.: unvollständige OI-122; keine: keine OI-122;

4.5 Untersuchungen zur Lokalisation der OI-122 im bakteriellen Chromosom

4.5.1 Physische Assoziation zwischen OI-122 und der LEE-Kernregion

Wie durch die publizierte Sequenzanalyse des EHEC-Stamms 413/89-1 (O26:NM) (GenBank Acc. Nr.: AJ277443) bekannt war, ist eine direkte Verbindung (1,9 kb) zwischen der im *pheU*-tRNS-Locus inserierten LEE-Kernregion und der genetischen O-Insel 122 möglich. Darauf basierend wurden alle LEE- und *efa1/lifA*-positiven Stämme hinsichtlich

einer solchen Verbindung untersucht. Eine PCR sollte den Bereich zwischen dem letzten Gen der OI-122 (*efa1/lifA*) und dem ersten Gen der LEE-Kernregion (*espF*) überspannen. Als Primer wurden efa1-3-fw und espF-fw und als positiv Kontrolle der Stamm 413/89-1 verwendet.

Von 79 AEEC-Stämmen (positiv für 3'-terminalen Bereich von *efa1/lifA*) wurde bei 28 ein PCR-Produkt amplifiziert. Die Größe des PCR-Produkts variierte von 1,0 kb bei zwei, 1,5 kb bei einem, 1,9 kb bei 20 sowie 3,0 kb bei fünf Stämmen. Die Mehrzahl der Stämme (27) hatte neben *efa1/lifA* das Gen *ent*, jedoch kein *pagC*. Nur ein Stamm war für alle drei Gene positiv.

4.5.2 Bestimmung des Insertionsorts der OI-122 mittels PCR

Bei unmittelbarer Nachbarschaft zwischen genetischer O-Insel 122 und LEE-Kernregion wurde von einer Mosaik PAI mit gemeinsamer Insertion in einem tRNS-Locus ausgegangen. Dies betraf 28 der 79 OI-122 positiven AEEC-Stämme, von denen 20 im *pheU*-, einer im *selC*- und einer im *pheV*-tRNS-Locus inseriert waren. Bei 6 REPEC Stämmen (O153:H7) war kein Insertionsort zu bestimmen.

Aus der Literatur und eigenen Untersuchungen war bekannt, dass die OI-122 unabhängig von der LEE-Kernregion sowohl im *pheV*- als auch im *pheU*-tRNS-Locus inseriert sein kann. So wurde zunächst die Integrität der genannten tRNS-Gene überprüft. Bei negativem Befund versuchten wir eine mögliche Verbindung zwischen Genen der OI-122 und des jeweiligen tRNS-Gens zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden Primerpaare verwendet, die einerseits ein intaktes tRNS-Gen (*pheU*: cadC1-cycZ1; *pheV*: 6229PVr-yqgAfw), andererseits die Existenz der genetischen Insel innerhalb dieser tRNS-Loci (*pheU*: PaEnrev-cycZ1; *pheV*: PaEnrev-

Für die 51 Stämme ergab sich folgendes: Fünf hatten die OI-122 im *pheV*-tRNS-Locus, von denen die LEE-PAI bei drei ebenfalls im *pheV*- und bei zwei im *selC*-tRNS-Locus inseriert war. Für 46 Stämme konnte der Insertionsort der OI-122 mit der verwendeten Methode nicht ermittelt werden.

62
4.5.3 Überprüfung des *cad*-Locus bei Lysin-Decarboxylase negativen *E. coli*-Stämmen

Bei der Amplifizierung des *pheU*-tRNS-Locus, im Hinblick auf den Insertionsort der LEE-PAI, offenbarten einige *E. coli*-Stämme eine mögliche Mutation im *cadBA*-Operon (Abbildung 8).



Abb. 8: Schematische Darstellung der Organisation des *cad*-Locus im *E. coli*-K12 Laborstamm mit Lokalisation der Oligonukleotid-Primer (→) zum Nachweis des p*heU*-tRNS-Locus (C1/cycZ1) und der Gene *cadA* (A1/A2), *cadB* (B1/B2) und *cadC* (C1/C2)

Zunächst wurde die Aktivität der LDC phänotypisch bei 212 der 268 *E. coli*-Stämme getestet. Es waren 24 (15 EHEC, 8 EPEC, 1 Nicht-pathogen) negativ. Bei diesen wurde mittels DNS-DNS-Hybridisierungen und PCRs das Vorkommen bzw. die Unversehrtheit des *ent* Gens sowie der *cadBA*-Operon Gene überprüft.

Zwanzig Stämme gaben weder für *cadA* noch für *cadB* ein positives Signal. Vier Stämme reagierten mit beiden Proben, weshalb für diese zusätzlich das *cadC* getestet wurde. Der EHEC-Stamm 9675 (O2:H5) ergab bei der PCR für das *cadC* ein Amplifikat von 3,8 kb statt der erwarteten 2,5 kb. Die verbleibenden drei Stämme 3842 (NT:NM), 3852 (NT:NM) und 4660 (NT:H19) wiesen keine Veränderungen in der Größe des *cadC* PCR-Produkts von 2,5 kb auf. Siebzehn der 24 LDC-negativen Stämme hatten das *ent* Gen. Eine Assoziation zwischen der Zerstörung des *cadBA*-Operons und dem Auftreten des *ent* war nicht aufzuzeigen. Die Ergebnisse zum Nachweis der Gene *cadA*, *cadB*, *cadC* und *ent* bei LDC-negativen *E. coli*-Stämmen sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tab. 9:Ergebnisse der Untersuchung des cad-Locus in Lysin-Decarboxylase (LDC)
negativen E. coli-Stämmen ("+" steht für positives Hybridisierungs-Signal bzw.
PCR-Amplifikat; "-" steht für negatives Hybridisierungs-Signal bzw. PCR-
Amplifikat; bei cadC Angabe der PCR-Produkt Größe)

LDC-negative Stämme	cadA	cadB	cadC	<i>ent</i> -positiv
13 EHEC				13
6 EPEC	-	-	Nicht getestet	1
1 NP				1
1 EHEC	+	+	3,8 kb	-
1 EHEC	+	+	2,5 kb	1
2 EPEC			, -	1

LDC: Lysin-Decarboxylase; NP: nicht-pathogen; *cadA*: Gen für Lysin-Decarboxylase; *cadB*: Gen für Lysin-Cadaverin-Antiporter; *cadC*: Gen für Transkriptionsaktivator; *ent*: Gen für putatives Enterotoxin;

4.6 Funktionelle Analyse der virulenzassoziierten Faktoren Efa1/LifA und Ent

4.6.1 Nachweis der Genexpression von *efa1/lifA* und *ent* im EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2)

Die Expression der Gene *efa1/lifA* und *ent* im bovinen EHEC-Stamm RW1374 wurde in verschiedenen Medien getestet. Der Stamm wurde in LB-, Penassay-, M9-Minimal- und in Eisenmangel-Medium (M9-Minimal-Medium + 2,2-Bipyridin) kultiviert, gesamt-RNS präpariert und diese mittels Reverser Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Unter Nutzung genspezifischer *efa1/lifA*- und *ent*-Primer wurden durch PCR für jedes Gen ein 5'-terminaler und ein 3'-terminaler Sequenzbereich amplifiziert. Die Molukulargröße der Amplifikate waren für das *efa1/lifA* 532 bp (5'-terminale Primer lifa3 - lifa4) und 560 bp (3'-terminale Primer lifa1 - lifa2), für das *ent* 474 bp (5'-terminale Primer enF - en1R) und 519 bp (3'-terminale Primer en3F - enR). PCR-Produkte für *efa1/lifA* konnten in allen vier Medien nachgewiesen werden. Das Gen *ent* wurde nur in M9-Minimal- und Eisenmangel-Medium exprimiert. Unterschiedliche Konzentrationen des selektiven Eisen-Chelators 2,2-Bipyridin (100 μ M, 200 μ M) zeigten keine Auswirkung auf die Genexpression.

Eine DNS-Kontamination der Gesamt-RNS, die in den genspezifischen PCRs zu entsprechenden Amplifikaten führen kann, wurde durch Mitführen von Proben mit Gesamt-RNS als Template sichergestellt. Die Spezifität der PCRs wurde durch eine entsprechende Positiv- (präparierte DNS des RW1374) und Negativkontrolle (präparierte DNS des MG1655) gewährleistet.

4.6.2 Gewinnung von Efa1/LifA-Antigenen

Auswahl und Klonierung der subgenischen Fragmente Ag-lifA1-4

Zur Generierung polyklonaler Antikörper gegen das *efa1/lifA* Genprodukt wurde dieses in einem *E. coli*-Laborstamm fremdexprimiert, aufgereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Der Expressionsvektor pGEX-6P-1 limitiert die einzubringende Fremd-DNS auf 2 kb, weshalb vier subgenische Fragmente des Gens *efa1/lifA* kloniert wurden (Tabelle 10). Die Auswahl der Fragmente erfolgte anhand computergestützter Analysen (Lasergene 2000 software package[®]; Dnastar Ltd., London, UK), welche basierend auf der Basensequenz die Hydrophilität der zu erwartenden Aminosäuresequenz ermittelten. Die Hydrophilität verwendet. Je hydrophiler ein Aminosäurekettenabschnitt, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass er sich später an der Oberfläche des gebildeten Proteins befindet und folglich die spezifische Bildung von homologen Antikörpern induziert.

Die vier Fragmente, *Ag-lifA1*, *Ag-lifA2*, *Ag-lifA3* sowie *Ag-lifA4* wurden so gewählt, dass jeder Bereich des Gens *efa1/lifA* (5'-terminal, Mitte, 3'-terminal) vertreten war. Ihre Lokalisation im Gen, die Bezeichnungen der jeweiligen Vektorklone und Protein-Fragmente sowie deren Molekulargrößen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10:	Bezeichnung, Lokalisation und Molukulargröße/-gewicht der lifA-DNS-Fragment	te
	und GST-LifA-Antigene	

DNS-	Lokalisation im Gen	Größe	Vaktor Klan	Protein-	Gewicht
Fragment	<i>efa1/lifA</i> (bp) ¹	(bp)	VERIOI-RIOII	Fragment	(kDa)
Ag-lifA1	292 – 1.221	929	pGEX-6P-L1	GST-Ag-LifA1	59,4
Ag-lifA2	3.466 - 4.320	854	pGEX-6P-L2	GST-Ag-LifA2	56,6
Ag-lifA3	6.112 – 7.176	1.064	pGEX-6P-L3	GST-Ag-LifA3	64,4
Ag-lifA4	8.422 – 9.504	1.082	pGEX-6P-L4	GST-Ag-LifA4	65,0

¹: Die Lokalisation wurde entsprechend der Lage im offenen Leserahmen des EHEC RW1374 (GenBank Acc. Nr. AJ303141) angegeben.

Die Generierung der subgenischen Fragmente erfolgte via PCR (Abbildung 9), wobei der jeweilige Vorwärts-Primer eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI und der entsprechende Rückwärts-Primer eine Schnittstelle für *Sal*I enthielt. Nach Überprüfung und Aufreinigung wurden die PCR-Amplifikate ebenso wie der Vektor mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I restringiert und anschließend ligiert. Die Sequenzanalyse der rekombinanten

Vektoren ergab, dass die vier eingebrachten Fragmente in einem Leserahmen mit der am 5'-Ende befindlichen Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) waren und keine fehlerhaften Basen enthielten. Die erhaltenen Vektorkonstrukte, pGEX-6P-L1, pGEX-6P-L2, pGEX-6P-L3 und pGEX-6P-L4 wurden mittels Elektroporation in den *E. coli*-K12 Empfängerstamm BL21 transformiert.



Abb. 9: Elektropherogramm der Polymerase-Kettenreaktion zur Generierung der DNS-Fragmente *Ag-lifA1-4* (0,7 %iges Agarosegel, 1,5 h, 90 V)

M: Marker 1 kb-ladder, **1**: *Ag-lifA1* (929 bp), **2**: *Ag-lifA2* (854 bp), **3**: *Ag-lifA3* (1.064 bp), **4**: *Ag-lifA4* (1.082 bp)

Expression der Antigene GST-Ag-LifA1-4

Durch Expressionstudien wurden die optimalen Bedingungen bezüglich Medium, Temperatur, Induktionszeitpunkt und Konzentration des Induktors für die Expression der Fusionsproteine GST-Ag-LifA1, GST-Ag-LifA2, GST-Ag-LifA3 und GST-Ag-LifA4 ermittelt. Die exprimierten rekombinanten Proteine wurden im Gesamtextrakt durch SDS-PAGE bezüglich ihrer theoretischen Molekulargewichte identifiziert (Tabelle 10). Als Kontrolle diente jeweils eine Kultur des nicht-induzierten Klons. In Abbildung 10 sind die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Gesamtproteinextrakte der induzierten und der nicht-induzierten Klone pGEX-6P-L2, pGEX-6P-L3 und pGEX-6P-L4 dargestellt. Die Extrakte wurden in einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie Blue gefärbt. In den Extrakten der induzierten Klone pGEX-6P-L2 (1b) und pGEX-6P-L3 (2b) war deutlich die GST-Ag-LifA2 bei ca. 56 kDa resp. die GST-Ag-LifA3 Bande bei ca. 64 kDa zu erkennen, die in der jeweiligen Kontrolle (1a und 2a) fehlte. Die beiden Fusionsproteine GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3 wurden gut und für eine Aufreinigung in ausreichender Menge exprimiert. Die unter Punkt 3.2.6.3. aufgeführten Bedingungen erwiesen sich für ihre Expression als optimal. Der Klon pGEX-6P-L4 bildete unter keiner der getesteten Expressions-Bedingungen genügend GST-Ag-LifA4 Fusionsprotein. In Abbildung 10 ist es als schwache Bande im SDS-PAGE bei ca. 65 kDa zu erkennen.



Abb. 10: SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten der Klone pGEX-6P-L2 (1), pGEX-6P-L3 (2) und pGEX-6P-L4 (3) nach der Induktion mit 1 mM IPTG (b) bei 25 °C für 4 h. Als Kontrolle dienten die nicht-induzierten Klone (a); LMW: 24-66 kDa. Die Extrakte wurden in einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt

Das GST-Ag-LifA1 (ca. 60 kDa) konnte unter keiner Bedingung im Gesamtproteinextrakt des Klons pGEX-6P-L1 nachgewiesen werden. Der entsprechende Stamm wuchs im Vergleich zu den anderen deutlich langsamer und erreichte früher die stationäre Phase. Nach der Induktion der Expression starb er regelmäßig ab, ohne erfolgreichen Nachweis des GST-Ag-LifA1 Proteins. Auch die sehr sensitive Detektion durch GST-Antikörper im Western-Blot Verfahren blieb erfolglos (nicht gezeigt).

Aufreinigung der Antigene GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3

Die Fusionsproteine GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3 wurden mittels Glutathion Sepharose-4B (GS-4B) Säulenchromatographie aufgereinigt. Diese Affinitätschromatographie basiert auf der reversiblen spezifischen Bindung der Glutathion-S-Transferase mit dem an eine Matrix gekoppelten, oxidierten Glutathion. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch reduziertes Glutathion.

Die für eine Immunisierung benötigte Mindestmenge von 1,2 mg pro Antigen wurde durch die Verwendung von 5 x 100 ml Kulturen für jedes Fusionsprotein erzielt. Die Kulturen wurden induziert und daraus bakterielles Lysat gewonnen (Punkt 3.2.6.4). Für 5 ml Gesamtextrakt wurden 100 μ l GS-4B und 5 Elutionsfraktionen mit je 150 μ l eingesetzt. Die Ausbeute der

Eluate ist für GST-Ag-LifA2 in Abbildung 11 und für GST-Ag-LifA3 in Abbildung 12 wiedergegeben. Die Hauptmenge der Fusionsproteine eluierte mit der ersten und zweiten Fraktion. Nach Durchfluss des 4-fachen Säulenvolumens an Elutionspuffer waren die gebundenen Fusionsproteine vollständig ausgewaschen. Geringe Proteinkontaminationen gab es im Bereich von ca. 37 und 25 kDa. Da diese Banden in beiden Aufreinigungen erschienen, gingen wir von unvollständig prozessierten oder proteolytisch degradierten Fusionsproteine aus und entschieden, aufgrund der geringen Mengen, im Vergleich zum Hauptprotein, die Kontaminationen zu vernachlässigen. Eluatfraktionen mit höchstem Antigenanteil wurden vereinigt und umgepuffert.

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Antigene GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3 in je 6 Portionen zu 200 µg aliquotiert und zur Generierung polyklonaler Antiseren eingeschickt (Seqlab GmbH, Göttingen).



Abb. 11: SDS-PAGE der Eluatfraktionen (1, 2, 3) des affinitätsgereinigten Antigens GST-Ag-LifA2 (Pfeil); MW: 25-250 kDa. Die Eluate wurden in einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt



Abb. 12: SDS-PAGE der Eluatfraktionen (1, 2, 3) des affinitätsgereinigten Antigens GST-Ag-LifA3 (Pfeil); LMW: 24-66 kDa. Die Eluate wurden in einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt

4.6.3 Nachweis des Proteins Efa1/LifA mittels polyklonalen Antikörpern im Immunoblot und im Zellkulturverfahren

Spezifitätsnachweis der Immunseren gegen GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3

Die Spezifität der Immunseren auf Anti-GST-Ag-LifA2- und Anti-GST-Ag-LifA3-Antikörper wurde mittels Immunoblot getestet. Zur Detektion dienten Gesamtproteinextrakte der im *E. coli*-Laborstamm BL21 exprimierten GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3 Antigene sowie die ohne Anhang exprimierte GST. Die elektrophoretisch aufgetrennten bakteriellen Lysate wurden auf eine Membran transferiert. Die Präimmunseren sowie die Immunseren der Erst-, Zweit- und Drittimmunisierung wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Der zweite Antikörper war ein mit Peroxidase gekoppelter Ziegen Anti-Kaninchen Antikörper, der die Visualisierung der Immunkomplexe ermöglichte.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft Immunoblot-Membranen mit Immunseren gegen GST-Ag-LifA2 und GST (A) sowie gegen GST-Ag-LifA3 und GST (B). Die Gesamtproteinextrakte der Klone pGEX-6P-L2 resp. pGEX-6P-L3 wurden in den Linien a, die Gesamtproteinextrakte des Klons pGEX-6P-1 in den Linien b aufgetragen. Die Membranstreifen wurden mit Präimmunserum (1), Erst- (2), Zweit- (3) und Drittimmunisierungs-Serum (4) jeweils in einer Verdünnung von 1:8.000 inkubiert. Die Präimmunseren zeigten mit keinem Protein der Klone pGEX-6P-1 und pGEX-6P-L2 resp. pGEX-6P-L3 eine Reaktion, was auch durch Erniedrigung der Verdünnung bis auf 1:100 verfiziert werden konnte. Die Kaninchen wiesen folglich vor der Immunisierung keine Antikörper gegen die Proteine Efa1/LifA oder GST auf. Bereits mit der ersten Immunisierung wurden Antikörper gegen die eingebrachten Antigene gebildet. Ihre Konzentration stieg, abzulesen an der zunehmenden Farbintensität der detektierten Banden, mit jeder weiteren Immunisierung an.



Abb. 13: Immunoblots zum Spezifitäts-Nachweis der Kaninchen-Immunseren gegen Gesamtproteinextrakte der exprimierten LifA-Antigene (b) und des exprimierten GST (a). MW: 15-250 kDa; Präimmunserum (1), Erst- (2), Zweit- (3) und Drittimmunisierungs-Serum (4) Verdünnung 1:8.000. Sekundär-Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:5.000

A: Gesamtproteinextrakte des GST-Ag-LifA2 (Bande bei ca. 56 kDa) exprimierenden Klons pGEX-6P-L2 und des GST (Bande bei ca. 26 kDa) exprimierenden Klons pGEX-6P-1
B: Gesamtproteinextrakte des GST-Ag-LifA3 (Bande bei ca. 64 kDa) exprimierenden Klons pGEX-6P-L3 und des GST (Bande bei ca. 26 kDa) exprimierenden Klons pGEX-6P-L3

Die gegen GST-Ag-LifA2 immunisierten Kaninchen bildeten auch Antikörper gegen die GST und Proteine im Bereich von ca. 37–45 kDa, deren Konzentration ebenfalls anstieg. Eine Steigerung der Verdünnung bis auf 1:20.000 erbrachte keine Reduktion der zusätzlichen Banden im Verhältnis zur Hauptbande.

Die gegen GST-Ag-LifA3 immunisierten Kaninchen bildeten zusätzliche Antikörper gegen ca. 23, 37 und 50 kDa große Proteine. Auffallend war eine auf etwa gleicher Höhe mit der GST-

Ag-LifA3 liegende Bande im Gesamtproteinextrakt des GST-exprimierenden Klons pGEX-6P-1. Möglicherweise wurde das vom Expressionsvektor pGEX-6P-1 oder vom *E. coli*-Laborstamm BL21 stammende Protein mit dem GST-Ag-LifA3 aufgereinigt und führte zu geringer Antikörperbildung. Berücksichtigung fand die Bande bei der Bewertung der GST-Ag-LifA3 Bandenintensität. Insgesamt bildeten die gegen GST-Ag-LifA3 immunisierten Kaninchen mehr Antikörper gegen die GST als gegen das Fusionsprotein GST-Ag-LifA3. Trotzdem konnte von einer guten Spezifität der Immunseren gegenüber den eingesetzten Antigenen ausgegangen werden. Das Mitführen der Präimmunseren als Negativkontrollen erhöhte die Aussagekraft der Versuche deutlich.

Nachweis des Proteins Efa1/LifA im Immunoblot

Das Protein Efa1/LifA sollte im bovinen EHEC-Wildstamm RW1374 (O103:H2) mittels der Kaninchen-Immunseren im Immunoblot-Verfahren detektiert werden. Der Stamm wurde in verschiedenen Medien kultiviert, Gesamtproteinextrakte in unterschiedlichen Wachstumsphasen und Konzentrationen gewonnen, elektrophoretisch im SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Es folgte eine erste Inkubation mit den Zweitoder Drittimmunisierungs-Seren gegen GST-Ag-LifA2 resp. GST-Ag-LifA3 sowie eine zweite mit dem Peroxidase konjugierten Sekundär-Antikörper und schließlich die Visualisierung der Banden durch das Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin). Als Positivkontrollen dienten die Gesamtproteinextrakte des GST-Ag-LifA2 resp. GST-Ag-LifA3 exprimierenden Klons sowie des GST exprimierenden Klons pGEX-6P-1. Der E. coli-K12 Laborstamm MG1655 wurde wie der Wildtyp behandelt und diente als Negativkontrolle.

Abbildung 14 gibt solche Immunoblots beispielhaft wieder. Es konnten keine Proteine des EHEC RW1374 detektiert werden. Die Positivkontrollen (GST-Ag-LifA2, GST-Ag-LifA3, GST) zeigten deutliche und die Negativkontrolle (*E. coli*-K12 Laborstamm MG1655) keine Banden.

Da eine Sekretion des Efa1/LifA nicht ausgeschlossen werden konnte wurde der Bakterienüberstand des RW1374 mit 20 %iger Trichloressigsäure gefällt und ebenfalls im Immunoblot auf das Protein Efa1/LifA hin überprüft. Es wurden keine Banden detektiert (nicht gezeigt).

A	1	2	3	4	MW	5	6	7	8		В	1	2	3	4	MW	5	6	7	8
									5 24											
					1.576		-	GST	-Ag-Li	fA2						ing a	kadiai/*	←(GST-	-Ag-LifA3
						ductori											ilia renta			
		GS	т 🛶	-10825	iki sisis								GST							

Abb. 14: Immunoblots zur Efa1/LifA-Protein Detektion in Gesamtproteinextrakten des bovinen EHEC-Stamms RW1374. RW1374 kultiviert in BHI- (1), RPMI- (2) und M9 Minimal-Medium (3); Negativkontrolle: *E. coli*-K12 Stamm MG1655 kultiviert in BHI- (6), RPMI- (7) und M9 Minimal-Medium (8); Positivkontrolle: GST-Ag-LifA2 (A) resp. GST-Ag-LifA3 (B) exprimierende Klone pGEX-6P-L2 resp. pGEX-6P-L3 (5) und GST exprimierender Klon pGEX-6P-1 (4). Drittimmunisierungs-Serum (Kaninchen-Ak gegen LifA2 resp. LifA3) Verdünnung 1:6.000; Sekundär-Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:5.000; MW: 25-250 kDa

Nachweis des Proteins Efa1/LifA im Zellkulturverfahren

Der an epitheliale Zellen adherierte EHEC-Stamm RW1374 wurde, unter Verwendung der polyklonalen Antikörper gegen GST-Ag-LifA2 und GST-Ag-LifA3, bezüglich der Präsenz des Efa1/LifA-Proteins untersucht. Die Zellkulturpräparate wurden unter dem Licht-, Immunfluoreszenz- und konfokalen Laserscan Mikroskop analysiert.

Der an HEp2-Zellen adherierte bovine EHEC-Wildstamm RW1374 zeigte eine deutliche Immunfluoreszenz-Färbung (Abbildung 15), nicht so der *E. coli*-K12 Laborstamm MG1655 (Abbildung 16).

Der RW1374 adherierte sehr gut, was mit dem Lichtmikroskop und mittels DNS-Färbungen (DAPI und PI) im Immunfluoreszenz- und im konfokalen Laserscan Mikroskop nachgewiesen wurde. Die HEp2-Zellen zeigten im Immunfluoreszenz-, nicht aber im konfokalen Laserscan Mikroskop eine unspezifische TRITC-Hintergrundfärbung.

Wie die Abbildungen 15 und 17 zeigen, wurden nicht alle Bakterien des EHEC-Stamms RW1374 gleichermaßen Efa1/LifA-positiv detektiert, sondern nur bestimmte Anhäufungen. Eine Abhängigkeit zwischen positivem Signal und der Lage der Bakterien zueinander oder zu den eukaryotischen Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Bei höherer Auflösung im konfokalen Laserscan Mikroskop war die Bakterienhülle stärker immungefärbt. Der nicht adhärente K12-Laborstamm hatte eine diffuse unregelmäßige TRITC-Färbung (Abbildung 16 A) unabhängig der Lage zu den eukaryotischen Zellen. Diese unspezifische Bindung konnte auch durch zweimalige Adsorption der Seren mit *E. coli*-K12 Proteinen nicht beseitigt werden. Im konfokalen Laserscan Mikroskop waren die unregelmäßigen, oberflächlichen Signale ebenfalls vorhanden, jedoch deutlich schwächer (Abbildung 16 B). Ein Unterschied zwischen den Antiseren gegen GST-Ag-LifA2 oder GST-Ag-LifA3 wurde nicht festgestellt. Ebenso zeigte die Verwendung verschiedener Bakterien-Anzuchtmedien (LB, BHI, RPMI, M9 Minimal-Medium), die Infektion der HEp2-Zellen mit Bakterien in verschiedenen Wachstumsphasen oder die Adsorption der Seren mit *E. coli*-K12 Proteinen keine Auswirkungen auf die Ergebnisse.



Abb. 15: Aufnahmen der Immunfluoreszenz Mikroskopie (x 1.000). HEp2-Zellen mit EHEC-Stamm RW1374 infiziert, mit Efa1/LifA-Antiserum und TRITC-Anti-Kaninchen-Antikörpern (gelb) inkubiert und mit DAPI-DNS-Lösung (türkis) angefärbt.
 A: HEp2-Zellkerne und Bakterien mittels DAPI-DNS-Färbung (türkis) visualisiert. Adhäsion des RW1374 (→).

B: Identisches Feld wie A mit TRITC-Filter (gelb) aufgenommen. Geringe unspezifische Hintergrund-Färbung der HEp2-Zellen (\blacktriangleleft). Anhäufung TRITC-positiver RW1374 Kolonien (\rightarrow).



Abb. 16: Aufnahmen der Immunfluoreszenz (A) und der konfokalen Laserscan (B) Mikroskopie (x 1.000). HEp2-Zellen mit *E. coli*-K12 Stamm MG1655 inkubiert, Efa1/LifA-Antiserum zugegeben und mit TRITC-Ak (gelb) gefärbt.
A: Unspezifische TRITC-Hintergrundfärbung der HEp2-Zellen (◄). MG1655 (←) zeigen, unabhängig ihrer Lokalisation unregelmäßige TRITC-Signale (gelb).
B: Keine HEp2-Zellen im Bildausschnitt. Bakterien-DNS mit PI (rot) angefärbt. Unregelmäßige TRITC-Signale (gelb) an der Oberfläche der MG1655 (←).



Abb. 17: Aufnahmen mittels konfokaler Laserscan Mikroskopie (x 1.000). HEp2-Zellen mit EHEC-Stamm RW1374 infiziert, mit Efa1/LifA-Antiserum und TRITC-Anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert und mit PI-DNS-Lösung angefärbt. Prokaryotische und eukaryotische (◄) DNS rot, Efa1/LifA detektierender Antikörperkomplex gelb. Lokalisation der Antikörperkomplexe gegen Efa1/LifA an der Bakterienhülle des Stamms RW1374.

4.6.4 Expressionsversuche der rekombinanten Ent-Proteine

Klonierung und Expression des kompletten sowie des fragmentierten Gens ent

Die Generierung polyklonaler Antikörper gegen das *ent* Genprodukt erforderte dessen Fremdexpression in einem *E. coli*-Laborstamm, mit anschließender Aufreinigung und Immunisierung von Kaninchen. Zu diesem Zweck wurde das gesamte *ent* (1.650 bp) in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert. Das Gen wurde via PCR amplifiziert, wobei der Vorwärts-Primer eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI und der Rückwärts-Primer eine Schnittstelle für *Sal*I enthielten. Nach Überprüfung und Aufreinigung wurde das PCR-Amplifikat ebenso wie der Vektor mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I restringiert und anschließend ligiert. Die Sequenzanalyse des rekombinanten Vektors ergab keine fehlerhaften Basen und zeigte das Gen in einem Leserahmen mit der am 5'-Ende lokalisierten Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST). Das Vektorkonstrukt wurde mittels Elektroporation in den *E. coli*-K12 Empfängerstamm BL21 transformiert.

Selbst vielfältige Variationen der Expressionsbedingungen bezüglich Medium, Temperatur, Induktionszeitpunkt, -länge sowie Konzentration des Induktors führten zu keinen Ent-GST-Fusionsprotein-Banden (ca. 87 kDa) im SDS-PAGE oder Immunoblot (nicht gezeigt). Ein weiterer Versuch wurde unter Verwednung eines **HIS-Tag-Expressionssytems** unternommen. Mit Hilfe des Vektors pBAD/HIS-A wird eine Histidin-(HIS) Erkennungssequenz an die entsprechende Fremd-DNS ligiert. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgt über Nickel-Säulen. In den Expressionsvektor pBAD/HIS-A wurden das gesamte ent Gen (pBAD/HIS-Ent) sowie drei etwa gleich große Teile (~ 350 bp) Ag-Ent1, Ag-Ent2, und Ag-Ent3 kloniert. Die Teilung des Gens sollte einerseits die Erfolgschancen erhöhen und andererseits einer möglichen Toxizität des Proteins entgegen Die Klonierung erfolgte wie beim Vektor wirken. pGEX-6P-1, wobei die Restriktionsendonukleasen Pstl und HindIII und entsprechend veränderte Primer eingesetzt wurden. Die Sequenzanalyse der rekombinanten Vektoren ergab keine Fehler in der Basenfolge oder im Leserahmen. Abbildung 18 zeigt beispielhaft die in SDS-PAGE aufgetrennten Gesamtproteinextrakte der Klone pBAD/HIS-Ent und pBAD/HIS-Ent1 vor und nach der Induktion mit 0,02 %, 0,2 % und 2,0 % Arabinose bei 25 °C nach 4h. Keines der erwarteten Ent-Fusionsproteine (Ag-Ent: 66 kDa, Ag-Ent1: 22 kDa, Ag-Ent2: 24 kDa, Ag-Ent3: 22 kDa) wurde exprimiert. Variationen der Induktion bezüglich Zelldichte, Temperatur, Dauer und Induktor-Konzentration brachten keinen Erfolg.



Abb. 18: SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten der Klone pBAD/HIS-Ent (1) und pBAD/HIS-Ent1 (2) nach Induktion mit 0,02 % (b), 0,2 % (c) und 2,0 % (d) Arabinose bei 25 °C nach 4 h. Negativkontrollen sind die nicht-induzierten Klone (a); MW: 31-97 kDa; LMW: 24-66 kDa. Die Extrakte wurden in einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt

5 Diskussion

Charakterisierung der LEE-PAI des bovinen EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2)

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sind eine an Bedeutung zunehmende Gruppe darmassoziierter Pathogene bei Mensch und Tier. Einige EHEC-Infektionen verursachen beim Menschen wässrige oder blutige Diarrhoe, die in schwerwiegenden Komplikationen wie der hämorrhagischen Kolitis, dem hämolytisch-urämischen Syndrom oder der thrombotischthrombozytopenische Purpura münden können (KARCH et al., 2005; SMITH et al., 2002). Wiederkäuer gelten als transientes Reservoir vieler EHEC-Stämme. Einige Serovare (z. B. O103:H2) werden häufiger als andere in Rinderherden nachgewiesen. Es ist unklar, warum manche Serovare bei Menschen jedoch nicht bei Rindern Erkrankungen verursachen, obwohl sie die gleichen Kombinationen an möglichen Virulenzfaktoren aufweisen. Viele Virulenzfaktoren sind in großen chromosomalen Pathogenitätsinseln organisiert, die durch horizontalen Gentransfer erworben werden (HACKER und KAPER, 2001).

In dieser Arbeit wurde eine von JORES et al. (2001) in Vorarbeit partiell sequenzierte und charakterisierte Pathogenitätsinsel (PAI) des bovinen EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2), die sowohl spezifische LEE- als auch andere Virulenzgene beherbergt, analysiert und charakterisiert. Diese bislang größte (111 kb) LEE-enthaltende sequenzanalysierte PAI, war im *pheV*-tRNS-Locus inseriert und besaß große DNS-Blöcke mit hoher Ähnlichkeit zur *pheU*-inserierten LEE-PAI des EHEC-Stamms 413/89-1 (O26:NM) und des REPEC-Stamms 83/39 (O15:H-) (TAUSCHEK et al., 2002). Die DNS-Blöcke beinhalteten die LEE-Kernregion und ein Homolog der genetischen O-Insel (OI-) 122 der EHEC Serovar O157:H7 mit den Genen *efa1/lifA* (EHEC factor for adherence/lymphocyte inhibitory factor), *ent* (Enterotoxin) sowie *nleB* und *nleE* (non-LEE-encoded effectors).

Die von TAUSCHEK et al. (2002) beschriebene, ebenfalls *pheV* inserierte LEE-PAI des REPEC 84/110-1 (O103:H2) ist nur 85 kb groß und besitzt nicht die Gene *efa1/lifA* und *ent*. Eine Integration der OI-122 (24 kb) als transposables Element in die LEE-PAI des RW1374 oder eine Deletion der genetischen Insel in der LEE-PAI des 84/110-1 könnte die unterschiedlichen Größen erklären, was positive Mobilisierungs- und Intergrationsversuche der 84/110-1 LEE-PAI vermuten lassen (TAUSCHEK et al., 2002). Des Weiteren erfolgte in der LEE-PAI des RW1374 eine Zerstörung des Integrasegens *int* durch ein *IS629*-Homolog, das offenbar nach der PAI-Insertion integriert worden war. MUNIESA et al. (2006) konnten die Notwendigkeit einer intakten Integrase zur Mobilisierung der LEE-PAI im EHEC-Stamm 413/89-1 (O26:NM) demonstrieren. Die Zerstörung des Gens könnte zur Stabilisierung der PAI beigetragen haben (HACKER und KAPER, 2001).

Für eine mosaikartige Zusammensetzung der LEE-PAI RW1374 sprechen außerdem die LEE-Kernregion flankierenden *IS629*-Homologe, das Vorkommen auffallender *E. coli*-K12 Sequenzstrecken innerhalb der PAI sowie Unterschiede im G+C-Gehalt zwischen der LEE-Kernregion (38 %) und dem OI-122 Homolog (45 %). Die Insertionssequenzen und Homologen des 23 bp 3'-Endes des *pheV-/pheU*-Gens, angrenzend an die LEE-Kernregion, lassen vermuten, dass der LEE in eine schon vorhandene PAI inseriert ist (RUMER et al., 2003).

JORES et al. (2005) konnten ein *pheV* inseriertes Homolog der LEE-PAI mit einem integrierten OI-122 Homolog in 28 humanen und bovinen O103:H2 EHEC nachweisen. Eine derartige Mosaik PAI wurde kürzlich auch in 20 EHEC und 20 atypischen EPEC der Serovar O26:H11/NM festgestellt (BIELASZEWSKA et al., 2007). Dies bestätigt die hohe Virulenz und das einheitliche Profil an Virulenzfaktoren dieser Serovare (SCHMIDT et al., 1999).

Unser Sequenzvergleich der LEE-Kernregion des RW1374 mit sequenzanalysierten LEE-PAIs humaner und lapiner EPEC- (O127:H6; O103:H2; O15:H-) sowie humaner und boviner EHEC- (O157:H7; O26:NM) Stämme offenbarte einen relativ hohen Grad an Konservierung der Typ III-Sekretionsapparat-kodierenden Gene. Während das Intimin-kodierende Gen sowie die Gene der exportierten Proteine weniger ähnlich in der Sequenz waren. Die geringe Sequenzähnlichkeit wird durch die Interaktion der kodierten Proteine mit dem Wirtsorganismus bei erhöhtem Selektionsdruck auf diese Gene erklärt (FRANKEL et al., 1998).

Besonderheiten der Sequenz waren im 5'- und 3'-Randbereich der LEE-Kernregion auszumachen. Am 3'-Ende war das Gen ler (LEE-encoded regulator) durch Insertion eines IS10 Elements verkürzt. Der Ler gilt als zentrales Regulationselement, der die Transkription der benötigten LEE-Operons aktiviert und die Expression der LEE-kodierten Proteine steuert (ELLIOTT et al., 2000; FRIEDBERG et al., 1999). Trotz der Verkürzung des ler um 49 bp am 3'-Ende besaß der EHEC-Stamm RW1374 die Fähigkeit zur Ausbildung der typischen Attaching-and-Effacing- (A/E-) Läsionen (JORES et al., 2001). Ob die Veränderung der ler-Gensequenz die regulatorische Funktion beeinflusst, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Das am 5'-Ende der LEE-Kernregion lokalisierte espF (E. coli secreted protein) war mit 885 bp deutlich länger als die Homologe anderer Stämme (EDL933: 727 bp; 413/89-1: 624 bp; E2348/69: 624 bp; 83/39: 483 bp). Die größte Ähnlichkeit (81 %) bestand zum EspF des C. rodentium (301 AS). Das EspF des RW1374 hatte fünf Prolin-reiche Regionen, über die eine Interaktion mit der Zielzelle stattfindet, die zur mitochondrialinduzierten Apoptose der Wirtszelle, zur Zerstörung der zellulären thight junctions und somit der intestinalen Barriere führt (McNAMARA et al., 2001). Eine Beeinflussung der Ausbildung von A/E-Läsionen durch EspF liegt nicht vor (SHAW et al., 2005). Die Bedeutung der

Sequenzvariationen auf die Funktion ist Gegenstand mehrerer Studien.

Der LEE-Kernregion des EHEC RW1374 fehlte, wie den REPEC-Stämmen 84/110-1 und 83/39, der *orf3* und das ERIC (enteric repetitive intergenic consensus) Element. ERIC Sequenzen, über deren Funktion und Rolle in der Pathogenese noch keine eindeutige Aussage getroffen wird, werden an anderer Stelle eingehend dargestellt und untersucht (WILSON und SHARP, 2006). Das Orf3 Protein, ein Homolog des EspG, ist in die Zerstörung der Mikrotubuli und der intestinalen Barriere, jedoch nicht in die Ausbildung von A/E-Läsionen oder der Induktion des Enteritis-Geschehens involviert (TOMSON et al., 2005). Ein Fehlen des Gens hat jedoch keine signifikante Auswirkung auf die Pathogenese der Erreger.

Vergleichende Analyse der genetischen O-Insel (OI-) 122

Das OI-122 Homolog des RW1374 (O103:H2) wurde mit der OI-122 des EHEC O157:H7 (EDL933) sowie den entsprechenden Homologen im EPEC O127:H6 (E2348/69), im EHEC O26:NM (413/89-1) und im REPEC O15:H- (83/39) vergleichend analysiert. Es war gemeinsam mit der LEE-Kernregion mosaikartig im *pheV*-tRNS-Locus inseriert. Eine solche Mosaik PAI liegt bei den *pheU* inserierten Stämmen 413/89-1 und 83/39 vor, nicht jedoch bei den *pheV* inserierten Stämmen EDL933 und E2348/69. Bei letzteren ist die LEE-Kernregion unabhängig von der OI-122 in *selC* lokalisiert.

Das hier analysierte OI-122 Homolog zeigte einige Abweichungen von der im EHEC O157:H7 definierten genetischen O-Insel 122, die neben den hoch konservierten Genen *int*, *pagC*, *ent*, *nleB* und *nleE* die trunkierte Genversion des *efa1*' beinhaltet (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001). Die 18 ORFs der RW1374 OI-122 beherbergten neben den virulenzassoziierten Genen *ent*, *nleB*, *nleE* und *efa1/lifA*, vier für hypothetische Proteine kodierende und acht für mobile Elemente kodierende Gene. Die längere *efa1/lifA* Version wurde in nicht-O157:H7 EHEC-, EPEC-Stämmen sowie im *C. rodentium* identifiziert, wohingegen das trunkierte *efa1*' bislang nur in den Serovaren O157:H7 und O145:NM nachgwiesen wurde.

Die OI-122 des EHEC RW1374 wurde stromauf- und stromabwärts durch ein *IS629*-Homolog eingefasst. Eine derartige Begrenzung liegt bei keinem der anderen Stämme vor. Die Insertion des stromaufwärts gelegenen *IS629* Elements zerstörte das zur Familie der P4 Integrasen gehörende Integrasegen *int* des RW1374. Während die Region stromabwärts des *ent* bis einschließlich *efa1/lifA* einen besonders hohen Grad an Konservierung aufwies, gestalteten sich die ersten 9 kb stromabwärts des *pheV/U*-Locus in den untersuchten Stämmen sehr variabel, da hier einige mobile Elemente (Integrase, Transposasen, Insertionssequenzen) lokalisiert waren.

Des Weiteren fehlte dem RW1374, wie dem EHEC 413/89-1 und dem REPEC 83/39, das putative Virulenzgen *pagC*. Dieses besitzt Ähnlichkeit mit dem PagC Membran Protein von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, das dem Erreger ein Überleben in Makrophagen ermöglicht (PULKKINEN und MILLER, 1991). Untersuchungen bei *C. rodentium* zur Folge ist das PagC für die intestinale Kolonisation von Mäusen unerheblich (WICKHAM et al., 2006). Da keine Studien zur Funktion des PagC in *E. coli* vorliegen, kann keine Aussage über mögliche Auswirkungen der Gendeletion getroffen werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das Vorkommen des OI-122 Homologs in 268 *E. coli* überprüft. Die 181 als pathogen (80 EPEC, 67 EHEC, 16 REPEC, 13 APEC, 5 STEC) und 87 als nicht-pathogen (NP) eingestuften Stämme wurden, begründet auf dem Nachweis des *eae* Gens, grob in 164 A/E-Läsionen verursachende *E. coli* (AEEC) und 104 nicht-AEEC zusammengefasst. Es erfolgte der Gennachweis von *pagC*, *ent* und *efa1/lifA* (in drei Regionen unterteilt). Die Detektion flankierender Sequenzen ist aufgrund der vielen mobilen Elemente abzulehnen, da diese in mehreren Kopien vorhanden sein können und ihr Nachweis nicht unbedingt auf das Vorkommen spezifischer Virulenzgene schließen lässt. Dieser Studie wurde die von MORABITO et al. (2003) vorgeschlagene Annahme zugrundegelegt, dass bei drei positiven Genen von einer vollständigen und bei zwei von einer unvollständigen OI-122 ausgegangen werden kann, wenn zusätzlich die Amplifizierung der jeweiligen Region zwischen den nachgewiesenen Genen möglich ist.

Von den 164 AEEC hatten 51 (31 %) eine vollständige und 43 (26 %) eine unvollständige Ol-122. Die nicht-AEEC besaßen maximal ein Gen der genetischen O-Insel (91 Stämme: kein Gen; 11 Stämme: *ent*, 2 Stämme: *efa1/lifA*). Diese Ergebnisse bestätigen Literaturangaben, wonach nur A/E-positive Stämme eine OI-122 aufweisen (KARMALI et al., 2003; MORABITO et al., 2003). Trotz der starken A/E-Assoziation sind die Virulenzgene der OI-122 nicht für die Ausbildung des Phänotyps nötig (STEVENS et al., 2002 b, 2004). Drei EPEC-Stämme zeigten Besonderheiten im *efa1/lifA* Gen. Bei einem (O111:NM) war die mittlere und bei zwei (O111:H2; O55:H6) die mittlere und 3'-terminale Genregion nicht zu detektieren. Letztere wären die ersten EPEC mit einem trunkierten *efa1*', wie es sonst nur bei EHEC O157:H7 und O145:NM vorliegt (TOMA et al., 2004; PERNA et al., 2001; HAYASHI et al., 2001; diese Arbeit). Die Möglichkeit, dass es sich um neue Genvariationen handelt, ist ebenso wie Unterschiede in der Zielsequenz der verwendeten Primer bzw. Sonden nicht auszuschließen, da andere Stämme derselben Serovare (14x O111:NM/H2; 3x O55:H6) für das gesamte *efa1/lifA* Gen positiv waren.

Die Tatsache, dass die OI-122 in 26 % der untersuchten Stämme unterschiedlicher Serovare unvollständig war, reflektiert die durch die mobilen genetischen Elemente bedingte

Instabilität der Insel. Bei den unvollständigen OI-122 Versionen hatten 36 Stämme *efa1/lifAent* und 7 *ent-pagC* kombiniert. Da die Kombination von *efa1/lifA* und *pagC* nicht nachgewiesen wurde, scheinen Sequenzveränderungen im Bereich zwischen den beiden Genen, mit einem Verlust des *ent* Gens, sehr selten vorzukommen. Mit Ausnahme von zwei EHEC 055:H7 war der Abstand zwischen den Genen *efa1/lifA* und *ent* für alle Stämme mit unvollständiger oder vollständiger OI-122 gleich groß. Dies bestätigt unsere Ergebnisse der OI-122 Sequenzanalyse, nach der die Region stromabwärts von *ent*, einschließlich *efa1/lifA*, hoch konserviert und stabil war. Dem gegenüber beinhaltete die Region stromaufwärts des *ent* neben dem *pagC* Gen einige mobile Elemente, was sich in den ermittelten Abständen (3–5 kb) zwischen den Genen *ent* und *pagC* wiederspiegelte. Vier Stämme (3x EHEC O111; EPEC 0177:H11) ergaben, bedingt durch einen mit den gewählten PCR-Bedingungen nicht zu amplifizierenden größeren Abstand oder durch eine Variation in der Primer-Zielsequenz, kein Amplifikat.

Wir konnten eine Mosaik PAI in 28 (35 %) nicht-O157:H7 EHEC und EPEC durch Amplifizierung der Region zwischen dem am 3'-Ende der OI-122 gelegenen *efa1/lifA* und dem am 5'-Ende der LEE-Kernregion lokalisierten *espF* identifizieren. Inseriert war die Mosaik PAI bei 20 Stämmen im *pheU*- und bei je einem im *pheV*- (EPEC O177:H11) resp. im *selC*-tRNS-Locus (EPEC O55:H7). Bei 6 Stämmen (REPEC O153:H7) blieb der Insertionsort unbekannt. Die in diesem PCR-Assay negativ getesteten Stämme hatten die beiden Inseln, wie der EHEC O157:H7 und der EPEC O127:H6, möglicherweise in verschiedenen chromosomalen Loci inseriert oder Unterschiede in der Zielsequenz der verwendeten Primer. Es ist nicht auszuschließen, dass in einigen Stämmen die Strecke zwischen *efa1/lifA* und *espF* zu lang für die gewählten Amplifizierungsbedingungen war, da wir Größenvariationen dieser Region feststellen konnten. So waren LEE-Kernregion und OI-122 in drei Stämmen (2x O103:H2; 1x O118:H5) gemeinsam im *pheV*-tRNS-Locus inseriert, ohne dass eine Verbindung amplifiziert werden konnte. Wie für den RW1374 (O103:H2) gezeigt, kann der Abstand zwischen den beiden Inseln durchaus 41 kb betragen. Die Amplifizierung solch großer Regionen erfordert spezielle, sehr sensible Langstrecken-PCRs.

Im Hinblick auf den Ursprung der LEE Mosaik PAI ist interessant, dass in den sequenzierten EHEC O157:H7 (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001) die 3'-Region der OI-122 ein etwa 2 kb großes Duplikat der 3'-Region der LEE-Kernregion des eigenen Stamms beinhaltet. Zusammen mit den hier erbrachten Ergebnissen könnte dies auf eine ursprünglich gemeinsame Aquirierung einer großen PAI, bestehend aus LEE-Kernregion und OI-122, hindeuten, die sich später in einigen Klonen (z.B. EHEC O157:H7) in Folge chromosomaler Neuanordnung separiert hat. Übereinstimmend dazu identifizierten wir die LEE-PAI mit OI-122 in drei der vier phylogenetischen Cluster (EHEC2, EPEC1, EPEC2), mit

Ausnahme der O157 Gruppe (EHEC1), wie dies bereits für die LEE-PAI ohne OI-122 beschrieben wurde (WIELER et al., 1997 b). Trotz allem kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die zwei Inseln separate Ursprünge haben und erst Rekombinationen zu ihrer Fusion in einigen AEEC-Klonen geführt haben.

Neben der direkten Kombination der OI-122 mit der LEE-PAI, sprechen auch die starke Konservierung ihrer virulenzassoziierten Gene sowie ihre weite Verbreitung in AEEC-Stämmen für einen Beitrag zur Pathogenese von AEEC-Infektionen. Weitere Studien in verschiedenen experimentellen Systemen sind nötig, um die Funktion aller putativen Virulenzgene der OI-122 zu erfassen und um festzustellen, ob und in wie weit die OI-122 einen selektiven Virulenzvorteil bedeutet.

Charakterisierung und funktionelle Analyse des Virulenzfaktors Efa1/LifA

In dieser Arbeit wurden *E. coli* verschiedener Serovare auf das Vorkommen des Virulenzgens *efa1/lifA* mittels DNS-DNS-Hybridisierung unter Verwendung von vier DNS-Sonden (5'-terminal, 2x intern, 3'-terminal) untersucht. Das trotz seiner erstaunlichen Größe (9.672 bp) hoch konservierte Gen, wurde in nicht-O157:H7 EHEC und EPEC nachgewiesen. Dabei identifizierten wir zwei EPEC-Stämme (O111:H2; O55:H6), die nur für die 5'-terminale Region positiv waren. Bei diesen Stämmen könnte eine trunkierte *efa1'* (2.130 bp) Version vorgelegen haben, wie sie bisher nur für EHEC Serovare O157:H7 und O145:NM beschrieben wurde (TOMA et al., 2004; HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001). Da die Möglichkeit einer Variation in der Zielsequenz der DNS-Sonden nicht auszuschließen ist, ist zur Verifizierung dieser Ergebnisse eine Sequenzierung der fraglichen Gene angebracht. Gleiches gilt für einen EPEC-Stamm (O111:NM), der möglicherweise eine neue Version des *efa1/lifA* Gens mit interner Deletion oder Insertion beherbergte. In dessen Fall waren nur die 5'- und 3'-terminalen, jedoch nicht die beiden mittig im Gen lokalisierten DNS-Sonden, positiv.

Dem Virulenzfaktor Efa1/LifA wird sowohl adhäsive als auch lymphotoxische Wirkung zugeschrieben (KLAPPROTH et al., 2000; NICHOLLS et al., 2000). Das *toxB*, ein auf dem *E. coli* O157:H7 Virulenzplasmid (pO157) kodiertes *efa1/lifA*-Sequenzhomolog (BURLAND et al., 1998; MAKINO et al., 1998), wird als mögliches funktionelles Homolog diskutiert (KLAPPROTH et al., 2000). Das pO157 verleiht *E. coli*-Laborstämmen die Fähigkeit zur Hemmung der Synthese von IL-2 und IL-4 in mitogen-aktivierten humanen peripheren Blut Lymphozyten. Ein O157:H7 Stamm ohne pO157 verliert diese Fähigkeit. Jedoch sei darauf hingewiesen, dass das pO157 für einige andere sezernierte Zytotoxine, wie das Enterohämolysin (Hly_{EHEC}), eine extrazelluläre Serin-Protease (EspP), eine Metalloprotease (StcE) sowie ein Typ II-Sekretionssystem kodiert, weshalb die Hemmung der Interleukin-

Synthese nicht zwangsläufig dem ToxB zugeschrieben werden kann.

Unsere Sequenzanalyse des EHEC RW1374 Virulenzfaktors Efa1/LifA offenbarte, dass dieser, ebenso wie das trunkierte Efa1' und das ToxB, Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen hat. Die N-terminalen Regionen der drei Proteine stimmten zu etwa 40 % mit den 470 Aminosäuren der N-terminalen katalytischen Domänen der großen Clostridien Toxine (LCT) überein. Die LCTs zählen zu den größten bakteriellen Zytotoxinen und sind als Bestandteil einer Pathogenitätsinsel entscheident für die Pathogenese der Clostridien. Die Toxine hemmen durch eine Glykosylierung kleiner GTP-bindender Proteine die biologische Aktivität der GTPasen (BUSCH et al., 1998) und destruieren so unter anderem das Aktin Zytoskelett der Zielzellen (JUST et al., 2000; von EICHEL-STREIBER, 1996). Auf diese Weise induzieren die Clostridien eine pseudomembranöse Kolitis als Komplikation einer Antibiotika-assoziierten Diarrhöe (BORRIELLO, 1998).

Hohe Übereinstimmung des Efa1/LifA fanden wir auch zu Proteinen der obligat intrazellulären Chlamydien (*C.*) wie *C. caviae* (putatives Zytotoxin), *C. felis* (Adhäsionsfaktor) sowie *C. muridarum* (Adhäsionsfaktor: TC0437, TC0438, TC0439) (READ et al., 2000). Bei letztem liegt das Sequenzhomolog interessanterweise dreimal direkt hintereinander im Chromosom.

Für die Glykosyltransferase Aktivität wird ein DXD-Motiv benötigt, das in den N-Termini von Efa1/LifA, ToxB, den LCTs und den *C. muridarum* Adhäsionsfaktoren hoch konserviert war, jedoch im trunkierten Efa1' des EHEC O157:H7 fehlte.

Weiterhin hatten Efa1/LifA, ToxB und TC0437-9, nicht aber das trunkierte Efa1', ein zentrales Cysteinprotease-Motiv, das in sezernierten Proteinen der YopT-Familie (*Yersinia* outer membrane protein) hoch konserviert vorliegt. YopT schneidet Rho GTPasen posttranslational, was die Zerstörung des zellulären Aktin Zytoskeletts zur Folge hat (SHAO et al., 2002). Die YopT Familie wird eingeteilt in 30-40 kDa Proteine, die über ein Typ III-Sekretionssystem in die Zielzelle geschleußt werden und >300 kDa Proteine, die zusätzliche funktionelle Domänen besitzen. Efa1/LifA muss zu letzteren gezählt werden, über deren Funktion und Sekretionsmechanismus bislang kaum Erkenntnisse vorliegen.

Das Efa1/LifA Protein des RW1374 besaß ein konserviertes Aminotransferase-II-Motiv. Mit diesem heften die für den enzymatischen Auf- und Abbau der Aminosäuren verantwortlichen ubiquitären Transaminasen das Coenzym Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆) kovalent an einen Lysin Rest.

Noch offen ist, inwiefern die konservierten Protein-Motive für die Efa1/LifA-Wirkungen verantwortlich sind. So beeinträchtigt eine Deletion im Leserahmen einerseits im Glykosyltransferase-Motiv, andererseits im Cysteinprotease-Motiv des *C. rodentium*

Efa1/LifA signifikant die intestinale Kolonisation im Maus-Model sowie die Pathogenese der transmissiblen murinen Kolonhyperplasie (KLAPPROTH et al., 2005). Demgegenüber zeigen Bakterienlysate eines *E. coli*-Laborstamms, der jeweils den N-terminalen oder zentralen Bereich des Efa1 eines nicht-O157:H7 oder das trunkierte Efa1' eines O157:H7 EHEC fremdexprimiert, keinen inhibitorischen Effekt auf mitogen-stimulierte bovine periphere Blut Lymphozyten (ABU-MEDIAN et al., 2006).

Die Wahrscheinlichkeit einer adhäsiven Domäne des Efa1/LifA wurde durch weitere Übereinstimmungen der N-terminalen Region zu Adhäsions-vermittelnden Proteinen untermauert. Das Retikulozyten-bindenden Protein 2 von *Plasmodium vivax* (PvRBP2), das rhoptry Protein (Rhop) von *Plasmodium yoelii* sowie das Aktin-bindende Protein Interaptin von *Dictyostelium discoideum* sind in die Adhäsion der Erreger an Wirtszellen involviert, wenn auch der genaue Wirkungsmechanismus teilweise unklar ist (GALINSKI et al., 2000; RIVERO et al., 1998). Nicht zuletzt ermöglicht die putative transmembrane Domäne der Proteine Efa1/LifA und ToxB eine Membran Assoziation.

Die Bedeutung des Efa1/LifA für die Persistenz von nicht-O157:H7 EHEC in Kälbern ist unumstritten (STEVENS et al., 2002 b). Jedoch ist die Frage inwiefern Efa1/LifA oder ToxB selbst als Adhäsin fungieren oder die beobachteten Effekte auf eine Beeinflussung der Produktion und Sekretion von LEE-kodierten Effektorproteinen in EHEC und EPEC zurückzuführen sind, nicht mit Sicherheit zu klären. Einige Autoren berichten von einer Modulierung der LEE-kodierten Proteine Tir, EspA, EspB und EspD durch *efa1/lifA* oder *toxB* (STEVENS et al., 2002 b, 2004; TATSUNO et al., 2001). Eine ernsthafte Beeinflussung liegt jedoch nicht vor, da die Ausbildung der LEE-bedingten A/E-Läsionen unbeeinträchtigt bleibt. Des Weiteren wurden beachtliche natürliche Schwankungen im Sekretionslevel der LEE-kodierten Tir und EspD Proteine bei EHEC O157:H7 festgestellt (McNALLY et al., 2001).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkungsweise des Efa1/LifA besser kennen zu lernen. Als Grundlage der funktionellen Studien musste zunächst geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen eine Expression des jeweiligen Gens im Wildstamm vorliegt. Für das *efa1/lifA* Gen des bovinen EHEC-Stamms RW1374 (O103:H2) konnte die Expression für den 5'- und den 3'-terminalen Bereich bestätigt werden. Sowohl in reichhaltigen, wie auch in Mangel-Medien gelang uns mRNS des *efa1/lifA* Gens nachzuweisen. Eine Quantifizierung der mRNS wurde jedoch nicht vorgenommen. Die Ergebnisse lassen eine Expression des Gens in voller Länge annehmen, über eine mögliche posttranslationale Prozessierung mit resultierenden Proteinuntereinheiten kann aber keine Aussage getroffen werden.

Die zur Sequenzanalyse der LEE-PAI des EHEC RW1374 (O103:H2) angelegte Genbank

wurde bezüglich efa1/lifA-positiver Cosmide gescreent. Wie auch in der Literatur berichtet wird (STEVENS et al., 2002 b; NICHOLLS et al., 2000; KLAPPROTH et al., 1995), waren diese deutlich unterrepräsentiert und häufig instabil. Ebenso mißlang den Autoren die Elektroporation eines efa1/lifA-tragenden Cosmids in eine entsprechende Deletions-Mutante des EHEC O5:H-, was auf eine mögliche Inkompatibilität mit einem der endogenen Plasmide zurückgeführt wurde (HALL et al., 1985). In unserer Arbeit endeten mehrere Versuche das komplette efa1/lifA Gen zu klonieren erfolglos, weshalb schließlich vier einzelne Teile (Nterminal: LifA1; intern: LifA2 und LifA3; C-terminal: LifA4) in einen Expressionsvektor kloniert wurden. Die Regionen wurden so gewählt, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Proteinoberfläche liegen und somit über hohes antigenetisches Potential verfügen. Folglich beinhalteten sie nicht die oben beschriebenen Motive, die katalytische Domänen darstellen und daher zumeist im Proteininneren liegen. Die Expression der vier Fragmente offenbarte deutliche Unterschiede. E. coli-K12 Laborstämme mit dem N-terminalen Bereich wuchsen verlangsamt und traten frühzeitig in die stationäre Wachstumsphase ein. Nach der Induktion der Expression starb der Stamm ab, ohne dass eine Synthese des N-terminalen Efa1/LifA Proteins nachgewiesen werden konnte. STEVENS et al. (2004) berichten ebenfalls von einer reduzierten Wachstumsrate eines E. coli-K12 Laborstamms, jedoch erst nach Induktion des in einen Expressionsvektor klonierten trunkierten Efa1' des EHEC O157:H7. Während der Cterminale Genbereich nur in sehr geringer Menge exprimiert wurde, konnte in einer anderen Studie ein ähnlich gewählter Bereich gar nicht zu Expression gebracht werden (ABU-MEDIAN et al., 2006). Wir vermuten eine toxische Wirkung des Efa1/LifA Proteins auf das Bakterium, die insbesondere bei Überexpression zum Tragen kommt. Diese These wird von den häufig beschriebenen Problemen bei der Klonierung und Expression der Gene efa1/lifA und *toxB* unterstützt (STEVENS et al., 2002 b, 2004).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Protein Efa1/LifA mittels spezifischer Antikörper zu detektieren, um so etwas über dessen Lokalisation und Wirkungsweise in Erfahrung zu bringen. Die dargestellten Expressionsprobleme bedingten, dass nur die internen Regionen des Efa1/LifA (LifA2 und LifA3) in ausreichender Menge als Glutathion-S-Transferase- (GST) Fusionsproteine gebildet wurden. Die Aufreinigung der Proteinfragmente erfolgte in nativer Form durch GST-vermittelte Affinitätschromatographie. Unsere Bemühungen, den GST-Teil anschließend durch eine spezifische Protease vom Zielprotein abzutrennen, schlugen fehl. Möglicherweise hinderte eine Faltung der Fusionsproteine, im Sinne einer Sekundär- oder Tertiärstruktur, die Protease an der Spaltung. Die Herstellung eines denaturierenden Mileus war nicht möglich, da dieses zwangsläufig die enzymatische Wirkung der Protease negativ beeinflusst hätte. Wir entschieden die GST an den Efa1/LifA-Fragmenten zu belassen und die Fusionsproteine zur Antikörpergenerierung durch

Immunisierung von Kaninchen zu verwenden. Die vorab im Immunoblot überprüften Seren der Tiere zeigten schwache Signale gegen *E. coli*-K12 Proteine, jedoch keine gegen die zu inokulierenden Antigene.

Die gewonnenen polyklonalen Antikörper gegen Teile des Efa1/LifA wurden im Immunoblot zur Untersuchung von Gesamtproteinextrakten des EHEC RW1374 eingesetzt. Die Bedingungen der Kultivierung und Ernte des Stamms orientierten sich an den beim mRNS-Nachweis gewonnenen Daten. Unser Hauptaugenmerk lag auf dem Bereich um 365 kDa, dem theoretischen Molekulargewicht des Efa1/LifA. Wir detektierten weder in diesem noch in einem anderen Größenbereich ein in Frage kommendes Protein, obwohl die Immunseren eine relativ gute Spezifität gegenüber den Antigenen aufwiesen. Da eine Sekretion des Efa1/LifA nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde der Bakterienüberstand des RW1374 gefällt und ebenfalls im Immunoblot überprüft. Auch hier blieb der Bandennachweis negativ.

Mögliche Gründe für den mißlungenen Nachweis des Efa1/LifA sind vielfältig. Zum einen war die Größe des gesuchten Proteins ungewiss. Es kann eine Prozessierung an den potentiellen PPD-Schnittstellen im Efa1/LifA stattfinden, die eine N-terminale Domäne ähnlich dem trunkierten Efa1' freisetzen würde, gegen welche wir keine Antikörper bereithielten. Sollte Efa1/LifA jedoch als Einheit vorliegen, ist es sehr schwierig ein Protein dieser Größe (365 kDa) in ein SDS-Polyacrylamidgel bzw. auf eine Membran zu transferieren. Da uns ein Vergleichprotein dieser Größe fehlte, konnten wir nicht sicher sein, dass die Auftrennung und Übertragung gelingt. Zum anderen könnte die Menge des gebildeten Proteins unterhalb der in unserem System verwendeten Nachweisgrenze gelegen haben.

Eine weitere Möglichkeit die Lokalisation des Efa1/LifA zu ermitteln, ist die gezielte Präparation einzelner Bakterienbestandteile, besonders der Membranen, und anschließende Auftrennung im zweidimensionalen Polyacrylamidgel. Denn gerade die 2D-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit das Protein neben dem Molekulargewicht auch anhand des isoelektrischen Punkts zu identifizieren.

In dieser Studie benutzten wir die gegen den internen Teil des Proteins Efa1/LifA spezifischen Antikörper in Verbindung mit der Immunfluoreszenz sowie der konfokalen Laserscan Mikroskopie zur Detektion des Proteins im EHEC-Stamm RW1374. Da die LEE-PAI dem RW1374 die Fähigkeit zur Adhäsion an kultivierte Epithelzellen verleiht, war es uns möglich, das Efa1/LifA im adhärierten Bakterium zu identifizieren. Die Versuche zeigten, dass nicht alle Bakterien des Stamms gleichermaßen Efa1/LifA-positiv detektiert werden, sondern nur bestimmte Anhäufungen. Des Weiteren konnte eine deutliche Anfärbung der Bakterienhülle erkannt werden, die sich im Laserscan Mikroskop besonders auffällig

darstellte. Eine Abhängigkeit zwischen positivem Signal und der Lage der Bakterien zueinander oder zu den eukaryotischen Zellen war nicht zu erkennen.

Der *E. coli*-K12 Laborstamm (Negativkontrolle) zeigte in der Immunfluoreszenz Mikroskopie diffuse Hintergrundsignale, die wahrscheinlich durch unspezifische Bindungen verursacht wurden. Der Versuch, diese durch Adsorption der Immunseren mit *E. coli*-K12 Proteinen zu beseitigen, blieb wirkungslos. Die in getrennten Versuchen eingesetzten Antiseren, die Antikörper gegen die Efa1/LifA Region 1.155-1.440 AS (LifA2) bzw. 2.037-2.392 AS (LifA3) beinhalteten, ließen keinen Unterschied in der Immunfärbung der Bakterien erkennen. Ebenso hatte die Verwendung verschiedener Bakterien-Anzuchtmedien oder die Infektion der HEp2-Zellen mit Bakterien in verschiedenen Wachstumsphasen keine Auswirkungen auf die Ergebnisse.

Bis dato ist die zelluläre Lokalisation von Efa1/LifA nicht klar nachgewiesen und das Protein beinhaltet keine erkennbare Signalsequenz, die auf eine Sekretion hinweist. Unsere Versuche unterstützen die These einer möglichen Oberflächen-Assoziation des Efa1/LifA, wie sie infolge von Studien mit dem plasmidfreien EPEC-Stamm E2348/69 diskutiert wird (BADEA et al., 2003). Für diese Lokalisation spricht ebenfalls die putative transmembrane Domäne des Efa1/LifA.

In Versuchen von ABU-MEDIAN et al. (2006) verursachen *E. coli*-K12 Lysate, die zur Expression von trunkiertem Efa1', Efa1-N (N-terminale Region) oder Efa1-M (mittige Region) induziert werden, keine signifikante Inhibition von mitogen-stimulierten peripheren Blut Lymphozyten. Trotzdem sollte die inhibitorische Wirkung des Efa1/LifA nicht in Frage gestellt werden, da das Ausbleiben des Effekts auf einer Unlöslichkeit der fremdexprimierten Proteinteile im Bakterienlysat beruhen könnte.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Efa1/LifA zur effizienten Kolonisation des bovinen Darmtrakts durch EHEC, besonders durch nicht-O157:H7 Serovare, erforderlich ist. Möglicherweise beeinflusst der Virulenzfaktor Efa1/LifA die Kolonisation des Darmtrakts auf verschiedenen Wegen. Er könnte direkt als Adhäsionsfaktor fungieren, das Überleben des Bakteriums im Darm durch Modulation der mukosalen Immunität fördern oder indirekt durch Beeinflussung der Expression und Sekretion von LEE-kodierten Proteinen oder anderer membran-assoziierter für die Kolonisation verantwortlicher Proteine wirken. Wobei sich zytotoxische und adhäsive Funktionen nicht gegenseitig ausschließen. Ein so großes Protein kann durchaus, aufgrund distinkter oder sogar separierter Domänen, unterschiedliche Aufgaben bei der Virulenz pathogener *E. coli* erfüllen.

Charakterisierung und funktionelle Analyse des virulenzassoziierten Faktors Ent

Das putative Enterotoxin-Gen ent des EHEC RW1374 ist in pathogenen EHEC- und EPEC-, in nicht-pathogenen E. coli- sowie in Citrobacter rodentium Stämmen nachzuweisen. Die Gensequenzdaten von sechs Stämmen [EHEC EDL933 (O157:H7), EHEC RW1374 (O103:H2), EHEC 413/89-1 (O26:NM), EPEC E2348/69 (O127:H6), REPEC 83/39 (O15:H-) und C. rodentium DBS100] zeigten einen hohen Grad an Konservierung (> 99 % identische Nukleinsäuren) und der G+C-Gehalt war mit 31 % deutlich unter dem E. coli-K12 Durchschnitt (50,8 %). Das Ent des RW1374 hatte 38 % Identität und 58 % Ähnlichkeit zum Shigella flexneri Enterotoxin 2 (ShET-2) (BUCHRIESER et al., 2000; NATARO et al., 1995). Dieses, auf dem Invasionsplasmid (pINV) einiger pathogener Shigellen und enteroinvasiver E. coli (EIEC) kodierte Toxin, ist nur unwesentlich länger als Ent und verursacht im Krankheitsbild der bakteriellen Dysenterie im Zusammenspiel mit weiteren Toxinen eine massive Flüssigkeitssekretion der Enterozyten. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bis dato nicht bekannt. Weiterhin war das Ent des RW1374 ähnlich zu den putativen Enterotoxin-ähnlichen Proteinen (SenA) von Yersinia (Y.) pestis und Y. pseudotuberculosis, deren Funktion unklar ist (PARKHILL et al., 2001). Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz des Ent fanden wir mit dem Regulator der Acetyl-CoA Synthetase des O157:H7 EHEC bzw. Ankyrin-ähnlichen Regulator-Protein (Arp) des E. coli-K12 Laborstamms, die beide in die Regulation der Fettsäure- und Phosphatidsäure-Biosynthese involviert sind.

Die Analyse der Ent Proteinsequenz ergab keine Hinweise auf Motive, konservierte Domänen oder für die Sekretion oder Prozessierung typische Signalsequenzen.

Der EHEC-Stamm RW1374 (O103:H2) exprimierte das Gen *ent* nur in Minimal-Medium sowie definiertem Eisenmangel-Medium. Dies korreliert mit den Angaben von FASANO et al. (1990), wonach bei EIEC eine Eisen-abhängige Regulation der ShET-2 Expression vorliegt, mit maximaler enterotoxischen Aktivität des ShET-2 unter Eisen-limitierenden Bedingungen. Eine solche Induktion der Proteinsynthese durch Eisenmangel ist bereits für mehrere Zytotoxine und virulenzassoziierte Faktoren nachgewiesen (LITWIN und CALDERWOOD, 1993). Des Weiteren unternahmen wir mehrere Versuche einer Fremdexpression des *ent* im Ganzen sowie in Teilen. Obwohl die Klonierungen und Kultivierungen der Konstrukte keine Schwierigkeiten bereiteten, gelang uns auch mit verschiedenen Systemen und Bedingungen keine Fremdexpression. Ein mögliches internes STOP-Codon in den klonierten Sequenzen wurde durch die Sequenzierung der Klone ausgeschlossen. Diese Ergebnisse weisen neben den ermittelten Ähnlichkeiten ebenfalls auf eine toxische Wirkung des Proteins hin. Zur Klärung, in wie weit der hoch konservierte, weitverbreitete und in einer Pathogenitätsinsel

lokalisierte putative Virulenzfaktor Ent die Pathogenese von *E. coli* beeinflusst, müssen weitere funktionelle Studien angestrebt werden.

Überprüfung der Lysin-Decarboxylase Aktivität und der Integrität des cadBA-Operons

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und einige *Shigella* spp. besitzen Veränderungen im Lysin-Decarboxylase (LDC) kodierendem *cadBA*-Operon, die in einer Inaktivierung des Enzyms resultieren. Der LDC-negative Phänotyp führt unteranderem zu einer verstärkenden Wirkung der Enterotoxine (ShET-1 und ShET-2) bei *Shigella flexneri* (MAURELLI et al., 1998) und einer vermehrten Induktion der transepithelialen Migration von Neutrophilen bei *Shigella flexneri* und EPEC (MICHAIL et al., 2003; McCORMICK et al., 1999; SAVKOVIC at al., 1996).

Von 212 in dieser Arbeit auf Lysin-Decarboxylase (LDC) Aktivität getesteten *E. coli*-Stämmen waren 24 (15 EHEC, 8 EPEC, 1 Nicht-pathogen) negativ. Darunter sieben Stämme mit humanpathogen bedeutenden Serovaren (O26:NM, O111:H8/NM und O157:NM), wie bereits andere Ergebnisse bestätigen (TORRES et al., 2005). Von einem LDC-negativen Phänotyp dreier EHEC-Isolate von Kindern in Brasilien wurde berichtet, jedoch das *cadBA*-Operon dieser Stämme nicht weiter analysiert (GUTH et al., 2002).

Bei den 24 LDC-negativen *E. coli* wurde der *cad*-Locus mittels DNS-DNS-Hybridisierung und PCR untersucht. Zwanzig Stämme gaben weder für *cadA*, noch für *cadB* ein positives Signal, was auf eine Deletion, ähnlich der bei *Shigella boydii* 18 hinweist (DAY et al., 2001). Vier Stämme reagierten mit beiden Proben, weshalb für diese zusätzlich das *cadC* getestet wurde. Interessanterweise ergab der EHEC-Stamm 9675 (O2:H5) bei der PCR für das *cadC* ein Amplifikat von 3,8 kb statt der erwarteten 2,5 kb. Eine mögliche Ursache kann eine Insertion sein, beispielsweise einer Insertionssequenz wie sie für EIEC beschrieben wurde (CASALINO et al., 2003). Die anschließende Sequenzanalyse des 3,8 kb großen PCR-Amplifikats bestätigte die Insertion eines IS-Elements 303 bp stromabwärts des Translationsstarts des *cadC* (JORES et al., 2006). Die verbleibenden drei Stämme 3842 (NT:NM), 3852 (NT:NM) und 4660 (NT:H19) wiesen weder eine Deletion noch eine Insertion in *cadC* auf, obwohl sie deutlich LDC-negativ reagierten. JORES et al. (2006) konnten in weiterführenden Arbeiten bei drei der untersuchten Stämme durch Komplementierung des *cad*-Locus die LDC-Aktivität wiederherstellen und eine reduzierte Adhäsion an kultivierte Epithelzellen nachweisen.

Die starke Sequenzähnlichkeit zwischen dem Enterotoxin (ShET-2) von *Shigella* spp./EIEC und dem putativen Virulenzfaktor Ent von EHEC und EPEC (BUCHRIESER et al., 2000;

NATARO et al., 1995) ließ uns einen Zusammenhang zwischen LDC-negativem Phänotyp und Vorkommen des Ent vermuten. Deshalb wurden die 24 LDC-negativen *E. coli* bezüglich des *ent* Gens untersucht. Obwohl 17 Stämme (14 EHEC, 3 EPEC, 1 Nicht-pathogen) *ent* positiv waren, lag keine Assoziation zwischen der Inaktivierung des *cadBA*-Operons und dem Auftreten des *ent* vor.

Gezeigt werden konnte, dass neben *Shigella* spp./EIEC und EHEC auch EPEC eine ähnliche Form der Mutation des *cad*-Locus aufweisen. Die so genannte "pathoadaptive Mutation" bedeutet möglicherweise einen Vorteil für die Bakterien hinsichtlich der Pathogenität und des Wettbewerbs mit anderen Bakterien um ökologische Nischen.

6 Zusammenfassung

Humane Infektionen mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) der Serovar O103:H2 gewinnen in Deutschland zunehmend an Bedeutung. Da Wiederkäuer als transientes EHEC Reservoir mehrheitlich für die humanen Infektionen verantwortlich sind, haben wir die DNS einer Pathogenitätsinsel (PAI) des bovinen O103:H2 Stamms RW1374 analysiert, um putative Virulenzmerkmale zu identifizieren. Diese komplex zusammengesetzte PAI beinhaltet die Kernregion des "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE) und ein Homolog der genetischen O-Insel (OI-) 122, bestehend aus den virulenzassoziierten Genen *efa1/lifA*, *ent*, *nleE*, *nleB* und einigen mobilen Elementen. Sie hat eine Gesamtlänge von 111 kb und ist im *pheV*-tRNS-Locus inseriert. Die Kombination mehrerer komplexer Virulenzmerkmale könnte teilweise die hohe Virulenz der EHEC Serovar O103:H2 für den Menschen erklären.

Beim Vergleich der PAI mit homologen Loci von humanen EPEC (O127:H6) und EHEC (O157:H7; O26:NM) sowie Kaninchen-spezifischen EPEC (O103:H2; O15:H-) zeigte sich die LEE-Kernregion weitgehend konserviert, während die OI-122 deutliche Unterschiede aufwies. In der LEE-Kernregion des RW1374 fehlen der Orf3 und das ERIC-Element, die Gene für EspF und Ler weichen von den Homologen der anderen Stämme ab. Der OI-122 fehlt das *pagC* Gen, das *efa1/lifA* Gen wird von zwei Insertionssequenzen (IS) flankiert und das Integrasegen am 5'-Ende der PAI durch ein *IS629* Element zerstört.

Um nähere Aufschlüsse über die Verbreitung der OI-122 zu erhalten, wurden 268 intestinale *E. coli*-Isolate mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung auf das Vorkommen der Gene *pagC*, *ent* und *efa1/lifA* bzw. *efa1*' untersucht. Während das trunkierte *efa1*' Gen ausschließlich in EHEC der Serovar O157:H7 vorkam, wiesen 27 % der Isolate verschiedener Serovare das *efa1/lifA* auf. In drei Stämmen fanden wir Hinweise auf neuartige *efa1/lifA* Genvarianten. Das Gen *ent* besaßen 44 % und das Gen *pagC* 22 % der überprüften *E. coli*. Zwei oder drei der Gene identifizierten wir ausschließlich in Attaching-and-Effacing (A/E-) Läsionen-verursachenden *E. coli* (AEEC). Von den 164 AEEC hatten 31 % eine vollständige und 26 % eine unvollständige Version der OI-122. Die nicht-AEEC wiesen maximal eines der Gene auf. Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Assoziation zwischen der genetischen Insel und dem LEE hin. In einigen Stämmen konnten wir eine direkte Nachbarschaft der beiden Inseln feststellen.

Die Ermittlung effizienter Strategien zur Minimierung der Infektionsgefahr mit EHEC und zur Bekämpfung der Verbreitung setzt möglichst genaue Kenntnisse über die Wirkungsweise der involvierten Virulenzfaktoren voraus. Aus diesem Grund wurden die Proteine Efa1/LifA und Ent des EHEC RW1374 weiterführend untersucht. In der Proteinsequenz des Efa1/LifA waren Homologien zu verschiedenen Toxinen (ToxB der O157:H7 EHEC, LCT der *Clostridien* spp., putatives Zytotoxin von *Chlamydia caviae*) und Adhäsinen (TC0437 von *Chlamydia muridarum*, YopT von *Yersinia* spp., PvRBP2 und Rhop von *Plasmodium* spp., Interaptin von *Dictyostelium discoideum*) sowie einige Protein-Motive zu finden. Die Expression von Efa1/LifA konnten wir mittels RT-PCR nachweisen. Trotz einiger Probleme bei der Klonierung und Kultivierung ließen sich zwei interne Proteinfragmente (LifA2 und LifA3) fremdexprimieren, aufreinigen und zur Generierung polyklonaler Antikörper verwenden. Während im Immunoblot keine Detektion des Efa1/LifA im Wildstamm nachzuweisen war, konnten wir im Zellkulturverfahren eine spezifische Anfärbung der Bakterienhülle des adhärenten EHEC-Stamms RW1374 mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscan Mikroskopie sichtbar machen.

Der virulenzassoziierte Faktor Ent zeigte Sequenzhomologien zu den Enterotoxinen von enteroinvasiven *E. coli* (EIEC)/*Shigella* spp. (ShET-2) sowie *Yersinia* spp. (SenA) und wurde nur unter Eisenmangel-Bedingungen exprimiert. Eine Fremdexpression des Ent gelang uns nicht, was wir auf eine mögliche Toxizität zurückführten.

7 Summary

Molecular and functional comparative analysis of the "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE) of bovine EHEC strain RW1374 (O103:H2)

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains of serotype O103:H2 are increasingly associated with human infections in Germany. As ruminants have been implicated as the main reservoir and source of human infections, the DNA of a pathogenicity island (PAI) of the bovine O103:H2 strain RW1374 was analysed in regard to the presence of putative virulence factors. This complex PAI spans over 111 kb and comprises the core-region of the "locus of enterocyte effacement" (LEE), and a homologue of the O-island (OI-) 122, including its virulence-associated genes *efa1/lifA*, *ent*, *nleE*, *nleB* and some mobile elements. It is inserted in the *pheV*-tRNA-locus. The high level of pathogenicity EHEC serovar O103:H2 causes in human infections could be attributed to this combination of multiple complex virulence factors.

Comparison with homologue loci of human EPEC (O127:H6) and EHEC (O157:H7; O26:NM), and rabbit-specific EPEC (O103:H2; O15:H-) respectively, revealed the LEE coreregion of the PAI to be largely conserved, whereas the OI-122 differed considerably. Regarding the LEE core-region, RW1374 lacks the *orf3* and ERIC (enteric repetitive intergenic consensus) element present in the other strains, and showed variations of genes encoding EspF and Ler. The OI-122 of RW1374 lacks the *pagC* gene, it's *efa1/lifA* gene is flanked by two insertion sequences (IS) and the integrase gene at the 5' terminus of the PAI is disrupted by an *IS629* element.

To clarify the distribution of OI-122, we performed PCR and DNA-DNA hybridization assays on 268 intestinal *E. coli* isolates in search for the genes *pagC*, *ent* and *efa1/lifA* or *efa1'*, respectively. While the truncated *efa1'* gene was exclusively present in EHEC O157:H7, the *efa1/lifA* homologue was detected in 27 % of isolates belonging to different serovars. Three isolates revealed new variations of *efa1/lifA* genes. In 44 % of the *E. coli* strains we detected gene *ent*, and in 22 % gene *pagC*. A combination of two or three of these genes occurred only in attaching-effacing *E. coli* (AEEC). Among the 164 AEEC isolates, 31 % contained a complete and 26 % an incomplete version of OI-122. In non-AEEC isolates we found no more than one of these genes. Our results suggest a strong association between the two islands, and for some isolates they could be demonstrated to be located in immediate genetical neighbourhood.

The design of efficient strategies apt to minimize the risk of infection and to control the spreading requires an exact knowledge about the mode of action of the involved virulence factors. Thus, the proteins Efa1/LifA and Ent of RW1374 were studied in more detail. The protein sequence encoding Efa1/LifA showed homologies to different toxins (ToxB of EHEC O157:H7, LCT of *Clostridium* spp., putative cytotoxin of *Chlamydia caviae*) and adhesins (TC0437 of *Chlamydia muridarum*, YopT of *Yersinia* spp., PvRBP2 and Rhop of *Plasmodium* spp., Interaptin of *Dictyostelium discoideum*), as well as to some protein motives. Using RT-PCR we could provide evidence for the expression of Efa1/LifA. In spite of some difficulties concerning cloning and cultivation, two internal protein fragments (LifA2 and LifA3) could be overexpressed, purified and used for preparation of polyclonal antibodies. While no detection of Efa1/LifA could be achieved using immunoblot assays on the wild-type, in in vitro assay of bacterial adherence a specific stain of the bacterial wall of adherent EHEC RW1374 was yielded using immunofluorescens and confocal laserscan microscopy.

The virulence associated factor Ent was found to be characterized by sequence-homologies to enterotoxins of enteroinvasive *E. coli* (EIEC)/*Shigella* spp. (ShET-2) and *Yersinia* spp. (SenA). It was exclusively expressed in iron-deficiency situations. Foreign expression of Ent could not be realized, which we attributed to an assumed toxicity.

8 Anhang

Tab. A:Offene Leserahmen (ORF) innerhalb der LEE-PAI des EHEC-Stamms RW1374
(O103:H2)

ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe	Ursprung, ähnliches Protein ²	% AS Identität ³						
oder IS		(bp/AS)								
Beginn der genetischen O-Insel 122										
IS629	1785-3096	1.311/436	<i>IS3</i> Familie	100 (436/436)						
001	1828-2716	888/295	EHEC EDL933 Transposase für	97 (289/295)						
			IS <i>629</i> (AAG56045)							
002	2715-3042	327/108	Phage phi 4795 hypothetisches	100 (108/108)						
			Protein (CAD88881)							
003	3975-5547	1.572/523	REPEC 83/39 hypothetisches	99 (521/523)						
			Protein (AAL57570)							
004	5292-5637	345/114	EHEC 413/89-1 hypothetisches	78 (39/50)						
			Protein (CAC81894)							
005	5543-7163	1.620/539	REPEC 83/39 putative	99 (538/539)						
			Transposase (AAL57569)							
006	7297-8038	741/246	EHEC EDL933 putative	93 (230/246)						
			Transposase (AAG58108)							
007	7521-7713	192/63	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (63/63)						
			Protein (CAC81891)							
008	8390-8618	228/75	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (75/75)						
			Protein (CAC81889)							
009	8511-8682	171/56	EHEC EDL933 hypothetisches	100 (56/56)						
			Protein (AAG58109)							
010	8550-8745	195/64	EHEC EDL933 hypothetisches	100 (64/64)						
			Protein (CAC81888)							
ent	8825-10475	1.650/549	EHEC EDL933 putatives	100 (549/549)						
			Enterotoxin Ent (BAB37278)							
			EIEC, <i>Shigella</i> spp. SenA, ShET-2	38 (209/547)						
			(CAA90938)							
(012) <i>nleB</i>	11081-12071	990/329	EHEC 413/89-1 NIeB (CAC81886)	100 (329/329)						
(013) <i>nleE</i>	12119-12794	675/224	EHEC 413/89-1 NIeE (CAC81885)	100 (224/224)						
IS630-	13032-14169	1.137/378	Shigella flexneri 2a IS630 ORF	88 (296/343)						
ähnlich			(AAL722384)							
014	13171-14017	846/281	EHEC EDL933 putative	100 (281/281)						
			Transposase (AAG58114)							

ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe	Ursprung, ähnliches Protein ²	% AS Identität ³		
oder IS		(bp/AS)				
efa1/lifA	14671-24343	9.672/3.223	EPEC E2348/69 LifA (AJ133705);	98 (3166/3223)		
			EHEC E45035 Efa1 (AF159462)	98 (3169/3223)		
IS629	24937-26248	1.331/436	<i>IS3</i> Familie	100 (436/436)		
016	24514-24910	396/131	REPEC 83/39 putative	100 (131/131)		
			Transposase (AAL57561)			
017	24992-25319	327/108	Phage phi 4795 hypothetisches	100 (108/108)		
			Protein (CAD88881)			
018	25318-26206	888/295	EHEC EDL933 Transposase für	97 (289/295)		
			IS <i>629</i> (AAG56045);			
			EHEC pO103 putative Transposase	97 (289/295)		
			(CAC80497)			
Ende der ge	enetischen O-Inse	122				
019	26676-27180	504/167	Yersinia pseudotuberculosis	64 (107/167)		
			hypothetisches Protein (YP071941)			
020	28283-30314	2.031/676	UPEC CFT073 hypothetisches	97 (335/346)		
			Protein (NP755533)			
021	30320-30896	576/191	UPEC CFT073 hypothetisches	97 (126/129)		
			Protein ISEc8 assoziiert			
			(NP755532)			
022	30699-31029	330/109	UPEC CFT073 hypothetisches	100 (109/109)		
			Protein (NP755531)			
023	32215-33124	909/302	EHEC EDL933 putatives Regulator	99 (301/302)		
			Protein (AAG57278)			
024	33250-34609	1.359/452	EHEC EDL933 putatives Transport	98 (446/452)		
			Protein (AAG57277)			
025	34620-35649	1.029/342	EHEC EDL933 putative	97 (333/342)		
			Dioxygenase (AAG57276)			
026	35664-36366	702/233	EHEC EDL933 putative Isomerase-	98 (230/233)		
			Decarboxylase (AAG57275)			
027	36371-37019	648/215	EHEC EDL933 putative Glutathion-	99 (214/215)		
			S-Tranferase (AAG57274)			
028	37033-38227	1.194/397	EHEC EDL933 putative	98 (391/397)		
			Hydroxylase (AAG57273)			
029	41486-42008	522/173	Shigella flexneri 2a hypothetisches	97 (168/173)		
			Protein (AAL08463)			

ORF, Gen	Lokalisation ¹	kalisation ¹ Größe Ursprung, ähnliches Protein ²				
oder IS		(bp/AS)				
030	41908-42316	408/135	EHEC EDL933 hypothetisches	91 (122/133)		
			Protein (CAD58983)			
031	42568-43138	570/189	APEC BEN2908 hypothetisches	97 (184/188)		
			Protein Aec61 (AAW51744)			
032	44785-45064	279/92	UPEC CFT073 hypothetisches	95 (88/92)		
			Protein (AAN80961)			
033	45003-45753	750/249	Shigella flexneri 2a hypothetisches	96 (193/201)		
			Protein (AAL08467)			
034	46074-47559	1.485/494	APEC BEN2908 hypothetisches	100 (494/494)		
			Protein Aec63 (AAW51746)			
035	49959-53127	3.168/1.055	E. coli-K12 Adhäsin Ag43	95 (966/1006)		
			(BAA15825)			
036	53261-55778	2.517/838	APEC BEN2908 hypothetisches	98 (835/838)		
			Protein Aec68 (AAW51751)			
IS629	55957-57267	1.311/436	<i>IS3</i> Familie	100 (436/436)		
037	55999-56887	888/295	EHEC EDL933 Transposase für	97 (288/295)		
			IS <i>629</i> (AAG56045))			
038	56886-57213	327/108	Phage phi 4795 hypothetisches	99 (107/108)		
			Protein (CAD88881)			
039	57700-57934	234/77	APEC BEN2908 hypothetisches	100 (77/77)		
			Protein Aec70 (AAW51753)			
040	58033-58852	819/272	APEC BEN2908 hypothetisches	100 (272/272)		
			Protein Ace71 (AAW51754) – kons.			
			Domäne			
041	58906-59392	486/161	APEC BEN2908 hypothetisches	98 (158/161)		
			Protein Aec72 (AAW515755) -			
			kons. Domäne			
042	58960-59392	912/303	UPEC CFT073 hypothetisches	92 (281/303)		
			Protein (AAN82118)			
yeeS	59392-59884	492/163	UPEC CFT073 putatives radC-	98 (161/163)		
			ähnliches Protein (AAN82119)			
044	59946-60168	222/73	UPEC CFT073 hypothetisches	99 (72/73)		
			Protein (AAN83573)			
045	60788-61163	375/124	APEC BEN2908 hypothetisches	100 (124/124)		
			Protein Aec76 (AAW51759)			
(046)	61159-61648	489/162	APEC BEN2908 hypothetisches	96 (157/162)		
yeeW			Protein Aec77 (AAW51760)			
ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe	Ursprung, ähnliches Protein ²	% AS Identität ³		
------------	---------------------------	-----------	--	-----------------------------		
oder IS		(bp/AS)				
047	61614-61857	243/80	APEC BEN2908 hypothetisches	95 (76/80)		
			Protein Aec78 (AAW51761)			
048	61953-62523	570/189	Shigella spp. hypothetisches	93 (153/164)		
			Protein (AAP18299)			
049	63728-65090	1.365/454	REPEC 84/110-1 hypothetisches	100 (454/454)		
			Protein (AAL60260)			
050	65380-66019	639/212	REPEC 84/110-1 hypothetisches	99 (211/212)		
			Protein (AAL60256)			
051	66216-66801	585/194	REPEC 84/110-1 hypothetisches	98 (192/194)		
			Protein (AAL60258)			
052	66875-67070	195/64	REPEC 84/110-1 hypothetisches	98 (63/64)		
			Protein (AAL60257)			
Beginn der	LEE-Kernregion	•	-			
espF	67046-67931	885/294	EspF Citrobacter rodentium	81 (236/290)		
			(AAL06387)			
054	68146-68425	279/92	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (92/92)		
			Protein (CAC81879)			
escF	68430-68652	222/73	EscF EHEC 413/89-1 u.a.	100 (73/73)		
			(CAC81878)			
057	68688-69096	408/135	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (135/135)		
			Protein (CAC81877)			
espB	69102-70047	945/314	EspB EHEC 413/89-1 u.a.	99 (313/314)		
			(CAC81876)			
espD	70067-71210	1.143/380	EspD EHEC 413(89-1 u.a.	99 (378/380)		
			(CAC81875)			
espA	71222-71801	579/192	EspA B-Variante EHEC	97 (187/192)		
			(AAO666617)			
sepL	71858-72914	1.056/351	SepL REPEC 83/39 (AAL57553)	98 (348/351)		
escD	73056-74277	1.221/406	EscD EHEC 413/89-1 u.a.	100 (406/406)		
			(CAC81872)			
eae	74550-77397	2.847/948	Intimin epsilon EHEC (AAO27352)	100 (948/948)		
cesT	77457-77928	471/156	CesT EHEC 413/89-1 u.a.	100 (156/156)		
			(CAC81870)			
tir	78060-79677	1.617/538	Tir EPEC (AAC69318)	98 (536/538)		
066	80123-80735	612/203	Map EHEC 413/89-1 u.a.	99 (202/203)		
			(CAC81868)			

ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe	Ursprung, ähnliches Protein ²	% AS Identität ³
oder IS		(bp/AS)		
067	80985-81345	360/119	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	98 (117/119)
			Protein (CAC81867)	
068	81563-82079	516/171	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	99 (170/171)
			Protein (CAC81866)	
sepQ	82109-83027	918/305	SepQ EHEC 413/89-1 (CAC81865)	99 (303/305)
070	82989-83265	276/91	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	100 (91/91)
			Protein (CAC81864)	
071	83398-83776	378/125	EHEC 413/89-1 hypothetisches	100 (125/125)
			Protein (CAC81863)	
escN	83778-85119	1.341/446	EscN EHEC 413/89-1 (CAC81862)	98 (440/446)
escV	85102-87130	2.028/675	EscV REPEC 83/39 u.a.	99 (674/675)
			(AAL57541)	
074	87126-87480	354/117	REPEC 83/39 u.a. (AAL57540)	100 (117/117)
sepZ	87633-87960	327/108	SepZ UPEC (AAB92636)	96 (88/89)
076	87992-88421	429/142	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	100 (142/142)
			Protein (CAC81858)	
escJ	88422-88995	573/190	EscJ EHEC 413/89-1 u.a.	100 (190/190)
			(CAC81857)	
sepD	89000-89456	456/151	SepD EHEC 413/89-1 u.a.	100 (151/151)
			(CAC81856)	
escC	89455-90994	1.539/512	EscC EHEC 413/89-1 u.a.	100 (512/512)
			(CAC81855)	
cesD	91007-91463	456/151	CesD EHEC 413/89-1 u.a.	100 (151/151)
			(CAC81854)	
081	91848-92307	459/152	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	99 (151/152)
			Protein (CAC81853)	
082	92337-92694	357/118	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	99 (117/118)
			Protein (CAC81852)	
083	92884-93349	465/154	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	100 (154/154)
			Protein (CAC81851)	
escU	93345-94383	1.038/345	EscU REPEC 83/39 u.a.	100 (345/345)
			(AAL57530)	
escT	94375-95152	777/258	EscT EHEC 413/89-1 u.a.	100 (258/258)
			(CAC81849)	
escS	95151-95421	270/89	EscS EHEC 413/89-1 u.a.	98 (88/89)
			(CAC81848)	

ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe	Ursprung, ähnliches Protein ²	% AS Identität ³		
oder IS		(bp/AS)				
escR	95420-96074	654/217	EscR EHEC 413/89-1 u.a.	100 (217/217)		
			(CAC81847)			
088	96078-96774	696/231	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	100 (231/231)		
			Protein (CAC81846)			
089	96718-97318	600/199	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	100 (199/199)		
			Protein (CAC81845)			
090	97641-97860	219/72	EHEC 413/89-1 u.a. hypothetisches	100 (72/72)		
			Protein (CAC81844)			
Ler	97874-98225	351/116	Ler EHEC 413/89-1 u.a.	88 (100/113)		
			(CAC81843)			
IS10	98169-99498	1.329/442	IS4 Familie bei <i>E. coli-</i> K12 u.a.	100 (1329/132)		
092	98276-99485	1.209/402	E. coli-K12 Transposase für IS10	100 (402/402)		
			(AAB28848)			
espG	100740-101937	1.197/398	EspG REPEC 83/39 u.a.	99 (395/398)		
			(AAL57522)			
Ende der LEE-Kernregion						
094	102083-102902	819/272	REPEC 84/110-1 hypothetisches	99 (271/272)		
			Protein (AAL57582) kons. Domäne			
095	103107-103983	876/291	Vibrio parahaemolyticus putatives	37 (93/248)		
			OspB Protein (BAC62723)			
IS629	104691-106002	1.311/436	<i>IS3</i> Familie	100 (436/436)		
096	104746-105073	327/108	EHEC EDL933 hypothetisches	99 (106/108)		
			Protein in IS <i>629</i> (AAG57059)			
097	105072-105960	888/295	EHEC EDL933 putative	100 (295/295)		
			Transposase (CAC80501)			
098	106480-107158	678/225	APEC BEN2908 putative	100 (225/225)		
			Transposase Aec65 (AAW51748)			
099	107988-108531	543/180	UPEC CFT073 hypothetisches	98 (177/180)		
			Protein (AAN78763)			
100	108051-109011	960/319	UPEC CFT073 hypothetisches	91 (291/319)		
			Protein (AAN78762)			
yeeS	108531-109023	492/163	UPEC CFT073 putatives radC-	98 (160/163)		
			ähnliches Protein YeeS			
			(AAN82119)			
101	109085-109307	222/73	REPEC 84/110-1 hypothetisches	100 (73/73)		
			Protein (AAL57578)			

ORF, Gen	Lokalisation ¹	Größe	Ursprung, ähnliches Protein ²	% AS Identität ³
oder IS		(bp/AS)		
102	109361-109838	477/158	REPEC 84/110-1 hypothetisches Protein (AAL57576)	98(156/158)
103	110301-110790	489/162	UPEC 536 hypothetisches Protein (CAD66208)	90 (147/162)
104	110756-110999	243/80	UPEC 536 hypothetisches Protein (CAD33791)	97 (78/80)
105	111080-111926	846/281	REPEC 84/110-1 hypothetisches Protein (AAL57572)	99 (279/280)
yghD	112268-112805	537/178	<i>E. coli</i> -K12 putatives Sekretions unterstützendes Protein (AAC76004)	97 (174/178)

¹: Die Lokalisation ist als Nukleotidposition wiedergegeben, beginnend mit der ersten Base der LEE-PAI Sequenz des RW1374 (GenBank Acc. Nr. AJ303141).

²: Die Homologie Angaben basieren auf der Datenbank-Analyse unter Verwendung von BLAST.

³: In Klammern Verhältnis identischer Aminosäuren des ähnlichen Proteins zu den Aminosäuren des ORFs.

9 Literaturverzeichnis

- Abu-Median, A., P. M. van Diemen, F. Dziva, I. Vlisidou, S. T. Wallis, and M. P. Stevens.
 2006. Functional analysis of lymphostatin homologues in enterohaemorrhagic
 Escherichia coli. FEMS Microbiol. Lett. 258:43-39.
- Ammon, A., L. R. Peterson, and H. Karch. 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. J. Infect. Dis. **179:**1274-7.
- Andreoli, S. P., H. Trachtmann, D. W. K. Acheson, R. L. Siegler, and T. G. Obrig. 2002. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. Pediatr. Nephrol. 17:293-8.
- Armstrong, G. L., J. Hollingsworth, and J. G. Morris, Jr. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol. Rev. 18:29-51.
- Badea, L., S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland. 2003. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. Microb. Pathogen. **34:**205-15.
- Ball, H.J., D. Finlay, L. Burns, and D. P. Mackie. 1994. Application of monoclonal antibodybased sandwich ELISA to detect verotoxins in cattle faeces. Res. Vet. Sci. 57:225-32.
- Banatvala, N., P. M. Griffin, K. D. Greene, T. J. Barrett, W. F. Bibb, J. H. Green, and J. G.
 Wells. 2001. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. J. Infect. Dis. 183:1063-70.
- Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells, and P. M.
 Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. JAMA 269:2217-20.
- Bettelheim, K. A. 2000. Role of non-O157 VTEC. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29:38S-50S.
- Beutin, L., M. Bulte, A. Weber, S. Zimmermann, and K. Gleier. 2000. Investigation og human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. Epidemiol.

Infect. **125:**47-54.

- Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J. Clin. Microbiol. **42**:1099-108.
- Bielaszewska, M., J. Janda, K. Blahova, H. Minarikova, E. Jikova, M. A. Karmali, J. Laubova, J. Sikulova, M. A. Preston, R. Khakhria, H. Karch, H. Klazarova, and O. Nyc. 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. Epidemiol. Infect. 119:299-305.
- Bielaszewska, M., A. Sonntag, M. A. Schmidt, and H. Karch. 2007. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. Microbes Infect. **9**:891-7.
- Blanco, M., J.E. Blanco, J. Blanco, E. A. Gonzalez, A. Mora, C. Prado, L. Fernandez, M.
 Rio, J. Ramos, and M. P. Alonso. 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. Epidemiol. Infect. 117:251-7.
- Blanco, M., J Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, C. Prado, M. P. Alonso, M. Mourino, C. Madrid, C. Balsalobre, and A. Juarez. 1997. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. Vet. Microbiol. 54:309-19.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. 277:1453-74.
- Bokete, T. N., T. S. Whittam, R. A. Wilson, C.R. Clausen, C. M. O'Callahan, S. L.
 Moseley, T.R. Fritsche, and P. I. Tarr. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children.
 J. Infect. Dis. 175:1382-9.
- **Borriello, S. P.** 1998. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. J. Antimicrob. Chemother. **41**:13-9.
- Brooks, J. T., E. G. Sower, J. G. Wells, K. D. Greene, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, and N. A. Strockbine. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J. Infect. Dis. **192:**1422-9.

- Bürk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bulte, and E. Martlbauer. 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. J. Clin. Microbiol. **41:**2106-12.
- Burland, V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner. 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic.Acids. Res. 26:4196-204.
- Burnens, A. P., A. Frey, H. Lior, and J. Nicolet. 1995. Prevalence and clinical significance of vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. Zentralbl. Veterinärmed. B. **42:**311-8.
- Busch, C., F. Hofmann, J. Selzer, S. Munro, D. Jeckel, and K Aktories. 1998. A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. J. Biol. Chem. 273:19566-72.
- Cantey, J. R., and R. K. Blake. 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. J. Infect. Dis. **135:**454-62.
- Caprioli, A., A. E. Tozzi, G. Rizzoni, and H. Karch. 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. Emerg. Infect. Dis. **3**:578-9.
- Casalino, M., M. C. Latella, G. Prosseda, and B. Colonna. 2003. CadC is the preferential target of a convergent evolution driving enteroinvasive *Escherichia coli* toward a lysine decarboxylase-defective phenotype. Infect. Immun. **71**:5472-9.
- Chalmers, R. M., R. L. Salmon, G. A. Willshaw, T. Cheasty, N. Looker, I. Davies, and C. Wray. 1997. Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. Lancet. 349:1816.
- Cobbold, R., and P. Desmarchelier. 2001. Characterization and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. Vet. Microbiol. **79:**323-5.
- Cody, S. H., M. K. Glynn, J. A. Farrar, K. L. Cairns, P. M. Griffin, J. Kobayashi, M. Fyfe,
 R. Hoffman, A. S. King, J. H. Lewis, B. Swaminathan, R. G. Bryant, and D. J.
 Vugia. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Ann. Intern. Med. 130:202-9.
- Cornick, N. A., S. L. Booher, and H. W. Moon. 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. Infect. Immun. **70:**2704-7.

- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. **3:**95-9.
- Cray, W. C., Jr., and H. W. Moon. 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. **61:**1586-90.
- Crump, J. A., A. C. Sulka, A. J. Langer, C. Schaben, A. S. Crielly, R. Gage, M. Baysinger, M. Moll, G. Withers, D. M. Toney, S. B. Hunter, R. M. Hoekstra, S. K. Wong, and P. M. Griffin. 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. N. Engl. J. Med. 347:555-60.
- Day Jr., W. A., R. E. Fernandez, and A. T. Maurelli. 2001. Pathoadaptive mutations that enhance virulence: genetic organization of the *cadA* regions of *Shigella* spp. Infect. Immun. 69:7471-80.
- Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, W. C. Cray, Jr., and H. W. Moon. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect. Immun. 65:1842-8.
- Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, H. W. Moon, and A. D. O'Brien. 1998. Escherichia coli O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. Infect. Immun. 66:4560-3.
- Dell'Omo, G., S. Morabito, R. Quondam, U. Agrimi, F. Ciuchini, A. Macrì and A. Caprioli. 1998. Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Vet. Rec. 142:309-10.
- Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikow, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay. 2004. Dissecting virulence: systemic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:3597-602.
- DeVinney, R., M. Stein, D. Reinscheid, A. Abe, S. Ruschkowski, and B. B. Finlay. 1999. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. Infect. Immun. 67:2389-98.
- Donnenberg, M. S., C. O. Tacket, S. P. James, G. Losonsky, J. P. Nataro, S. S. Wasserman, J. B. Kaper, and M. M. Levine. 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. J. Clin. Invest. 92:1412-7.

- **Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. Nucleic. Acids. Res. **16:**539-48.
- Duhamel, G. E., R. A. Moxley, C. W. Maddox, and E. D. Erickson. 1992. Enteric infection of a goat with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O103:H2). J. Vet. Diagn. Invest. 4:197-200.
- **Eklund, M., F. Scheutz, and A. Siitonen.** 2001. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxinproducing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. J. Clin. Microbiol. **39:**2829-34.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Girón, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. The locus of enterocyte effacement LEE-encoding regulator controls expression of both LEE- and non-LEEencoded virulence factors in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 68:6115-26.
- Elliott, E. L., R. M. Robins-Browne, E. V. O'Loughlin, V. Benett-Wood, J. Bourke, P. Henning, G. G. Hogg, J. Knight, H. Powell, and D. Redmond. 2001. Nationwide study of haemolytic uremic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. Arch. Dis. Child. 85:125-31.
- Ethelberg, S., K. E. Olsen, F. Scheutz, C. Jensen, P. Schiellerup, J. Enberg, A. M. Petersen, B. Olesen, P. Gerner-Schmidt, and K. Molbak. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg. Infect. Dis. 10:842-7.
- Fasano, A., B. A. Kay, R. G. Russell, D. R. Maneval, Jr., and M. M. Levine. 1990. Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect. Immun. 58:3717-23.
- Ferens, W. A., and C. J. Hovde. 2000. Antiviral activity of shiga toxin 1: suppression of bovine leukaemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. Infect. Immun. 68:4462-9.
- Fey, P. D., R. S. Wickert, M. E. Rupp, T. J. Safranek, and S. H. Hinrichs. 2000. Prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. Emerg. Infect. Dis. 6:530-3.
- Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol. Microbiol. **30**:911-21.

- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 34:941-52.
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch. 2002. Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J. Infect. Dis. 185:74-84.
- Friedrich, A. W., J. Borell, M. Bielaszewska, A. Fruth, H. Tschäpe, and H. Karch. 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. J. Cli. Microbiol. **41:**2448-53.
- Fruth, A., R. Freidrich, T. Kuczius, P. Roggentin, H. Karch, A. Ammon, J. Bockemühl,
 H. Tschäpe. 2002. Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001. Bundesgesundhbl. 45:715-21.
- Fürst, S., J. Scheef, M. Bielaszewska, H. Russmann, H. Schmidt, and H. Karch. 2000. Identification and characterization of *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. J. Med. Microbiol. **49:**383-6.
- Galinski, M. R., M. Xu, and J. W. Barnwell. 2000. Plasmodium vivax reticulocyte binding protein-2 (PvRBP-2) shares structural features with PvRBP-1 and the Plasmodium yoelii 235 kDa rhoptry protein family. Mol. Biochem. Parasitol. **108:**257-62.
- Gannon, V. P. J, M. Rashed, R. K. King, E. J. Golsteyn Thomas. 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **31**:1268-74.
- Garcia, A., R. P. Marini, Y. Feng, A. Vitsky, K. A. Knox, N. S. Taylor, D. B. Schauer, and J. G. Fox. 2002. A naturally occurring rabbit model of enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced disease. J. Infect. Dis. **186**:1682-6.
- Garcia, A., and J. G. Fox. 2003. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. **9**:1592-7.
- Gerber, A., H. Karch, F. Allerberger, H. M. Verweyen, and L. B. Zimmerhackl. 2002. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. J. Infect. Dis. **186:**493-500.
- Geue, L., M. Segura-Alvarez, F. J. Conraths, T. Kuczius, J. Bockemühl, H. Karch, and P.

Gallien. 2002. A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. Epidemiol. Infect. **129:**173-85.

- Griffin, P. M., and R. V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. **13:**60-98.
- Gunning, R. F., A. D. Wales, G. R. Pearson, E. Done, A. L. Cookson, and M. J. Woodward. 2001. Attaching and effacing lesions in the intestines of two calves associated with natural infection with *Escherichia coli* O26:H11. Vet. Rec. 148:780-2.
- Guth, B. E., S. R. Ramos, A. M. Cerqueira, J. R. Andrade, and T. A. Gomes. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in Sao Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97:1085-9.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23:1089-97.
- Hacker, J., and J. Kaper. 2001. The concept of pathogenicity islands. In: Kaper, J. B., A. D.
 O'Brien (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. ASM Press, Washington, DC, pp. 1-11
- Hall, G. A., D. J. Reynolds, N. Chanter, J. H. Morgan, K. R. Parsons, T. G. Debney, A. P.
 Bland, and J. C. Bridger. 1985. Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. Vet. Pathol. 22:156-63.
- Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, E. D. Ebel, D. E. Herriot and L. V. Carpenter. 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. Prev. Med. Vet. **35**:11-9.
- Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C.G. Han, E.
 Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T.
 Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M.
 Hattori, and H. Shinagawa. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA Res. 8:11-22.
- Herold, S., H. Karch, and H. Schmidt. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages genomes in motion. Int. J. Med. Microbiol. **294:**115-21.

- Heuvelink, A. E., F. L. van den Biggelaar, E. Boer, R. G. Herbes, W. J. Melchers, J. H.
 Huis in`t Veld, and L. A. Monnens. 1998. Isolation and characterization of verotoxinproducing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. J. Clin.
 Microbiol. 36:878-82.
- Heuvelink, A. E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, F. L. van den Biggelaar, W. J. van Leeuwen, and E. Boer. 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. Int. J. Food Microbiol. 52:67-75.
- Hilborn, E. D., J. H. Mermin, P. A. Mshar, J. L. Hadler, A. Voetsch, C. Wojtkunski, M. Swartz, R. Mshar, M. A. Lambert-Fair, J. A. Farrar, M. K. Glynn, and L. Slutsker. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. Arch. Intern. Med. **159**:1758-64.
- **Holme, R.** 2003. Drinking water contamination in walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. Water Sci. Technol. **47:**1-6.
- Itho, Y., Y. Sugita-Konishi, F. Kasuga, M. Iwaki, Y. Hara-Kudo, N. Saito, Y. Noguchi, H. Konuma, and S. Kumagai. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. Appl. Environ. Microbiol. **64:**1532-5.
- Janka, A., M. Bielaszewska, U. Dobrindt, and H. Karch. 2002. Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (*efa1*) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. Int. J. Med. Microbiol. 292:207-14.
- Jarvis, K.G., and J. B. Kaper. 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* via putative type III secretion system. Infect. Immun. 64:4826-9.
- Jelacic, J. K., T. Damrow, G. S. Chen, S. Jelacic, M. Bielaszewska, M. Ciol, H. M. Carvalho, A. R. Melton-Celsa, A. D. O'Brien, and P. I. Tarr. 2003. Shiga toxinproducing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. J. Infect. Dis. 188:719-29.
- Jenkins, C., H. Chart, T. Cheasty, G. A. Willshaw, M. C. Pearce, G. Foster, G. J. Gunn,
 H. R. Smith, G. Dougan, B. A. Synge, and G. Frankel. 2002. Verocytotoxinproducing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 from Scottish cattle. Vet. Rec. 151:58-60.

- Jenkins, C., M. C. Pearce, A. W. Smith, H. I. Knight, D. J. Shaw, T. Cheasty, G. Foster,
 G. J. Gunn, G. Dougan, H. R. Smith, and G. Frankel. 2003. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. Lett. Appl. Microbiol. 37:207-12.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:7839-43.
- Jerse, A. E., and J. B. Kaper. 1991. The *eae* gene of enteropathogenetic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. Infect. Immun. **59:**4302-9.
- Jores, J., L. Rumer, S. Kiessling, J. B. Kaper, and L. H. Wieler. 2001. A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at pheV in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103:H2. FEMS. Microbiol. Lett. **204:**75-9.
- Jores, J., L. Rumer, and L. H. Wieler. 2004. Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. Int. J. Med. Microbiol. **294**:103-13.
- Jores, J., S. Wagner, L. Rumer, J. Eichberg, C. Laturnus, P. Kirsch, P. Schierack, H. Tschäpe, and L. H. Wieler. 2005. Description of a 111-kb pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2. Int. J. Med. Microbiol. 294:417-25.
- Jores, J., A. G. Torres, S. Wagner, C. B. Tutt, J. B. Kaper, and L. H. Wieler. 2006. Identification and characterization of "pathoadaptive mutations" of the cadBA operon in several intestinal *Escherichia coli*. Int. J. Med. Microbiol. **296**:547-52.
- Just, I., F. Hofmann, and K. Aktories. 2000. Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 250:55-83.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2:123-40.
- Karaolis, D. K., T. K. McDaniel, J. B. Kaper, and E. C. Boedeker. 1997. Cloning of the RDEC-1 locus of enterocyte effacement (LEE) and functional analysis of the phenotype on HEp-2 cells. Adv. Exp. Med. Biol. 421:241-5.

- Karch, H., M. Bielaszewska, M. Bitzan, and H. Schmidt. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34:229-43.
- Karch, H., and M. Bielaszewska. 2001. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H- strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. J. Clin. Microbiol. **39:**2043-9.
- Karch, H., P. I. Tarr, and M. Bielaszewska. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295:405-18.
- Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, and B. T. Steele. 1983. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. Lancet **2**:1299-300.
- Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, and J. B. Kaper. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J. Clin. Microbiol. 41:4930-40.
- Keene, W. E., E. Sazie, J. Kok, D. H. Rice, D. D. Hancock, V. K. Balan, T. Zhao, and M. P. Doyle. 1997. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. JAMA 277:1229-31.
- Kelly, M., E. Hart, R. Mundy, O. Marches, S. Wiles, L. Badea, S. Luck, M. Tauschek, G.
 Frankel, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland. 2006. Essential role of the type III secretion system effector NIeB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. Infect. Immun. 74:2328-37.
- Kenny, B., L. LLai, B. B. Finlay, and M. S. Donnenberg. 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenetic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. Mol. Microbiol. 20:313-24.
- Kenny, B., and M. Jepson. 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. Cel. Microbiol. **2:**579-90.
- Kenny, B. 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. Int. J. Med. Microbiol. 291: 469-77.
- Klapproth, J. M., M. S. Donnenberg, J. M. Abraham, H. L. T. Mobley, and S. P. James. 1995. Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and

lymphokine production. Infect. Immun. 63:2248-54.

- Klapproth, J. M., I. C. Scaletsky, B. P. McNamara, L. C. Lai, C. Malstrom, S. P. James, and M. S. Donnenberg. 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. Infect. Immun. 68:2148-55.
- Klapproth, J. M., M. Sasaki, M. Sherman, B. Babbin, M. S. Donnenberg, P. J. Fernandes, I. C. Scaletsky, D. Kalman, A. Nusrat, and I. R. Williams. 2005. *Citrobacter rodentium lifA/efa1* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia in vivo. Infect. Immun. 73:1441-51.
- Klein, E. J., J. R. Stapp, C. R. Clausen, D. R. Boster, J. G. Wells, X. Qin, D. L. Swerdlow, and P. I. Tarr. 2002. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: a prospective point-of-care study. J. Pediatr. 141:172-7.
- Kobayashi, H., J. Shimada, M. Nakazawa, T. Morozumi, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen, and K. Yamamoto. 2001. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 67:484-9.
- Kuczius, T., M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, and W. Zhang. 2004. A rapid methode for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*. Mol. Nutr. Food. Res. 48:515-21.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-5.
- Leclercq, A., and J. Mahillon. 2003. Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7. Vet. Rec. 152:723-4.
- Leung, P. H. M., J. S. M. Peiris, E. W. S. Ng, R. M. Robins-Brown, K. A. Bettelheim, and
 W. C. Yam. 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69:7549-53.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155:**377-89.
- Litwin, C. M., and S. B. Calderwood. 1993. Role of iron regulation of virulence genes. Clin. Microbiol. Rev. 6:137-49.
- Locking, M. E., S. J. O'Brien, W. J. Reilly, E. M. Wright, D. M. Campbell, J. E. Coia, L. M. Browning, and C. N. Ramsay. 2001. Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta. Epidemiol. Infect.

127:215-20.

- Lorenz, M. G., and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. **58:**563-602.
- Mainil, J. G., C. J. Duchesnes, S. C. Whipp, L. R. Marques, A. D. O'Brien, T. A. Casey, and H. W. Moon. 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. Am. J. Vet. Res. 48:743-8.
- Mainil, J. 1999. Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. Vet. Res. **30:**235-57.
- Makino, K., K. Ishii, T. Yasunaga, M. Hattori, K. Yokoyama, C. H. Yutsudo, Y. Kubota, Y. Yamaichi, T. Iida, K. Yamamoto, T. Honda, C. G. Han, E. Ohtsubo, M. Kasamatsu, T. Hayashi, S. Kuhara, and H. Shinagawa. 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. DNA Res. 5:1-9.
- Malstrom, C., and S. James. 1998. Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. Infect. Immun. 66:3120-7.
- Mariani-Kurkdjian, P., E. Denamur, A. Milon, B. Picard, H. Cave, N. Lambert-Zechovsky,
 C. Loirat, P. Goullet, P. J. Sansonetti, and J. Elion. 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. J. Cli. Microbiol. 31:296-301.
- Maurelli, A. T., R. E. Fernandez, C. A. Bloch, C. K. Rode, and A. Fasano. 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3943-8.
- McCarthy, T. A., N. L. Barrett, J. L. Hadler, B. Salsbury, R. T. Howard, D. W. Dingman,
 C. D. Brinkman, W. F. Bibb, and M. L. Cartter. 2001. Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. Pediatrics 108:E59.
- McCormick, B. A., M. I. Fernandez, A. M. Siber, A. T. Maurelli. 1999. Inhibition of *Shigella flexneri-*induced transepithelial migration of polymorphonuclear leucocytes by cadaverine. Cell. Microbiol. **1:**143-55.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1664-8.

- McKee, M. L., A. R. Melton-Celsa, R. A. Moxley, D. H. Francis, and A. D. O'Brien. 1995. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. Infect. Immun. **63**:3739-44.
- McNally, A., A. J. Roe, S. Simpson, F. M. Thomson-Carter, D. E. E. Hoey, C. Currie, T. Chakraborty, D. G. E. Smith, and D. L. Gally. 2001. Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. Infect. Immun. 69:5107-14.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S.

Donnenberg, and G. Hecht. 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. J. Clin. Investig. **107:**621–9.

- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607-25.
- Meng, J., and M. P. Doyle. 1998. Microbiology of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: Kaper, J. B., A. D. O'Brien (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. ASM Press, Washington, DC, pp. 92-108.
- Menge, C., L. H. Wieler, T. Schlapp, and G. Baljer. 1999. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. Infect. Immun. 67:2209-17.
- Menge, C., I. Stamm, M. Wuhrer, R. Geyer, L. H. Wieler, and G. Baljer. 2001. Globotriaosylceramide (Gb(3)/CD77) is synthesized and surface expressed by bovine lymphocytes upon activation in vitro. Vet. Immunol. Immunopathol. 83:19-36.
- Menge, C., I. Stamm, P. M. van Diemen, P. Sopp, G. Baljer, T. S. Wallis, and M. P. Stevens. 2004. Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. J. Med. Microbiol. **53**:573-9.
- Menge, C. 2006. Immunmodulatorische Wirkung und pathogenetische Bedeutung der *Escherichia coli* Shiga Toxine beim Rind. DVG Verlag, Gießen.
- Mermin, J. H., and P. M. Griffin. 1999. Public health in crisis: outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Japan. Am. J. Epidemiol. **150**:797-803.

Michail, S. K., D. R. Halm, and F. Abernathy. 2003. Enteropathogenic Escherichia coli:

stimulating neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium without altering transepithelial conductance. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **36:**253-60.

- Michino, H., H. Araki, S. Minami, T. Nakayama, Y. Ejiama, K. Hiroe, H. Tanaka, N. Fujita,
 S. Usami, M. Yonekawa, K. Sadamoto, S. Takaya, and N. Sakai. 1998. Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: Kaper, J. B.,
 A. D. O'Brien (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. ASM Press, Washington, DC, pp. 73-81.
- Morabito, S., G. Dell'Omo, U. Agrimi, H. Schmidt, H. Karch, T. Cheasty, and A. Caprioli. 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. Vet. Microbiol. **82:**275-83.
- Morabito, S., R. Tozzoli, A. Caprioli, A. Karch, and A. Carattoli. 2002. Detection and characterization of class 1 integrons in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Micob. Drug. Resist. 8:85-91.
- Morabito, S., R. Tozzoli, E. Oswald, and A. Caprioli. 2003. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. Infect. Immun. **71:**3343-8.
- Moxley, R. A., and D. H. Francis. 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. Infect. Immun. **53**:339-46.
- **Moxley, R. A.** 2004. *Escherichia coli* O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. Anim. Health Res. Rev. **5**:15-33.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold. Spring. Harb. Symp. Quant Biol. 51:263-73.
- Muniesa, M., M. A. Schembri, N. Hauf, and T. Chakraborty. 2006. Active genetic elements present in the locus of enterocyte effacement in *Escherichia coli* O26 and their role in mobility. Infect. Immun. 74: 4190–9.
- Nataro, J. P., J. Seriwatana, A. Fasano, D. R. Maneval, L. D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M. M. Levine, and J. G. Morris. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. Infect. Immun. 63:4721-8.
- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev.

11:142-201.

- Nicholls, L., T. H. Grant, and R. M. Robins-Browne. 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. Mol. Microbiol. **35:**275-88.
- O'Brien, A. O., T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman, and S. B. Formal. 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. Lancet **1**:702.
- O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A.
 A. Lindberg, and G. T. Keusch. 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180:65-94.
- O'Brien, S. J., G. K. Adak, and C. Gilham. 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. Emerg. Infect. Dis. **7**:1049-51.
- Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J. Bacteriol. **157:**690-3.
- Olsen, S. J., G. Miller, M. Kennedy, C. Higgins, J. Walford, G. McKee, K. Fox, W. Bibb, and P. Mead. 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. Emerg. Infect. Dis. 8:370-5.
- Parkhill, J., B. W. Wren, N. R. Thomson, R. W. Titball, M. T. G. Holden, M. B. Prentice, M. Sebaihia, K. D. James, C. Churcher, K. L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S. D. Bentley, K. Brooks, A. M. Cerdeno-Tarraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R. M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, A. V. Karlyshev, S. Moule, P. C. F. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature 413:523-7.
- Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Clin. Microbiol. Rev. 11:450-79.
- Payne, C. J., M. Petrovic, R. J. Roberts, A. Paul, E. Linnane, M. Walker, D. Kirby, A. Burgess, R. M. Smith, T. Cheasty, G. Willshaw, and R. L. Salmon. 2003. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 gastroenteritis in farm visitors, North

Wales. Emerg. Infect. Dis. 9:526-30.

- Pearson, G. R., K. J. Bazeley, J. R. Jones, R. F. Gunning, M. J. Green, A. Cookson, and
 M. J. Woodward. 1999. Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animals with dysentery. Vet. Rec. 145:370-6.
- Perna, N. T., G. Plunkett III, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew,
 P. S. Evans, J. Gregor, H. Kirkpatrick, G. Posfal, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin,
 Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D.
 Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R.
 A. Welch, and F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature 409:529-33.
- Piérard, D., G. Muyldermas, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. J. Clin. Microbiol. **36:**3317-22.
- Prager, R., A. Liesegang, W. Voigt, W. Rabsch, A. Fruth, and H. Tschäpe. 2002. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H- in Germany. Infect. Genet. Evol. 1:265-75.
- Pritchard, G. C., S. Williamson, T. Carson, J. R. Bailey, L. Warner, G. Willshaw, and T. Cheasty. 2001. Wild rabbits: a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. Vet. Rec. 149:567.
- Pulkkinen, W. S., and S. I. Miller. 1991. A Salmonella typhimurium virulence protein is similar to a Yersinia enterocolitica invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. J. Bacteriol. 173:86-93.
- Raleigh, E. A., N. E. Murray, H. Revel, R. M. Blumenthal, D. Westaway, A. D. Reith, P. W.
 Rigby, J. Elhai, and D. Hanahan. 1988. McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. Nucleic. Acids. Res. 16:1563-75.
- Read, T., R. Brunham, C. Shen, S. Gill, J. Heidelberg, O. White, E. Hickey, J. Peterson,
 T. Utterback, K. Berry, S. Bass, K. Linher, J. Weidman, H. Khouri, B. Craven, C.
 Bowman, R. Dodson, M. Gwinn, W. Nelson, R. DeBoy, J. Kolonay, G. McClarty,
 S. Salzberg, J. Eisen, and C. Fraser. 2000. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. Nucleic. Acids. Res. 28:1397-406.

- **Reischl, U.** 1996. Application of molecular biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases. Front. Biosci. **1**:72-7.
- Richter, H., H. Klie, M. Timm, p. Gallien, H. Steinrück, K. W. Perlberg, and D. Protz. 1997. Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110:121-7.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Herbert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. **308**:681-5.
- Rivero, F., A. Kuspa, R. Brokamp, M. Matzner, and A. A. Noegel. 1998. Interaptin, an actin-binding protein of the alpha-actinin superfamily in *Dictyostelium discoideum*, is developmentally and cAMP-regulated and associates with intracellular membrane compartments. J. Cell. Biol. **142**:735-50.
- Robert Koch-Institut. 2004. Epidemiol. Bull. 50:434-9.
- Robert Koch-Institut. 2005. Epidemiol. Bull. 1:1-3.
- Robert Koch-Institut. 2006. Epidemiol. Bull. 41:353-5.
- Roe, A. J., and D. L. Gally. 2000. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and diarrhoea. Curr. Opin. Infect. Dis. **13:**511-7.
- Rumer, L., J. Jores, P. Kirsch, Y. Cavignac, K. Zehmke, and L. H. Wieler. 2003. Dissemination of pheU- and pheV-located genomic islands among enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli* and their possible role in the horizontal transfer of the locus of enterocyte effacement (LEE). Int. J. Med. Microbiol. 292:463-75.
- **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sandhu, K. S., R. C. Clarke, K. McFadden, A. Brouwer, M. Louie, J. Wilson, H. Lior, and
 C. L. Gyles. 1996. Prevalence of the eaeA gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. Epidemiol. Infect. 116:1-7.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-7.
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht. 1996. Attachment of a noninvasive enteric

pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. Infect. Immun. **64:**4480-7.

- Schmidt, H., C. Geit, P. I. Tarr, M. Frosch, and H. Karch. 1999. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for colanlity. J. Infect. Dis. **179:**115-23.
- Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. Wieler, and H. Karch. 2000. A new Shiga Toxin variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl. Environ. Microbiol. 66:1205-8.
- Schmitt, C. K., M. L. McKnee, and A. D. O'Brien. 1991. Two copies of Shiga-like Toxin II related genes common in enterohaemorrhagic *E. coli* strains are responsible for the antigenetic heterogenicity of the O157:H- strain E32511. Infect. Immun. **59:**1065-73.
- Shaikh, N., and P. I. Tarr. 2003. Escherichia coli O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. J. Bacteriol. 185:3596-605.
- Shao, F., P. M. Merritt, Z. Bao, R. W. Innes, and J. E. Dixon. 2002. A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. Cell. 109:575-88.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, and J. V. Maizel, Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28:815-20.
- Shaw, R. K., J. Cleary, G. Frankel, and S. Knutton. 2005. Enteropathogenic Escherichia coli interaction with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. Infect. Immun. 73:1243– 51.
- Shinagawa, K., M. Kanehira, K. Omoe, I. Matsuda, D. Hu, and S. Widiashi Dan Sugii. 2000. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle at a breeding farm and at a slaughterhouse in Japan. Vet. Microbiol. **76:**305-9.
- Slutsker, L., A. A. Ries, K. D. Greene, J. G. Wells, L. Hutwagner, and P. M. Griffin. 1997. Escherichia coli O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. Ann. Intern. Med. 126:505-13.
- Smith, D. G., S. W. Naylor, and D. L. Gally. 2002. Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle. Int. J. Med. Microbiol. 292:169-83.

- Sonntag, A. K., R. Prager, M. Bielaszewska, W. Zhang, A. Furth, H. Tschäpe, and H. Karch. 2004. Phenotypic and genotypic analyses of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. J. Clin. Microbiol. 42:654-96.
- Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III gene transcription and protein secretion in enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:15196-201.
- Stevens, M. P., O. Marches, J. Campbell, V. Huter, G. Frankel, A. D. Phillips, E. Oswald, and T. S. Wallis. 2002 a. Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. Infect. Immun. **70**:945-52.
- Stevens, M. P., P. M. van Diemen, G. Frankel, A. D. Phillips, and T. S. Wallis. 2002 b. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin- producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. Infect. Immun. **70:**5158-66.
- Stevens, M. P., A. J. Roe, I. Vlisidou, P. M. van Diemen, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, D. L. Gally, and T. S. Wallis. 2004. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of the locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. Infect. Immun. **72:**5402-11.
- Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189:**113-30.
- Szalo, I.M., F. Goffaux, V. Pirson, D. Pierard, H. Ball, and J. Mainil. 2002. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strain. Res. Microbiol. 153:653-8.
- Tarr, P. I., C. A. Gordon, and W. L. Chandler. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet **365**:1073-86.
- Tatsuno, I., H. Kimura, A. Okutani, K. Kanamaru, H. Abe, S. Nagai, K. Makino, H. Shinagawa, M. Yoshida, K. Sato, J. Nakamoto, T. Tobe, and C. Sasakawa. 2000. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells. Infect. Immun. 68:5943-52.

- Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya,
 T. Hayashi, and C. Sasakawa. 2001. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic
 Escherichia coli O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype.
 Infect. Immun. 69:6660-9.
- Tauschek, M. R., R. A. Strugnell, and R. Robins-Brown. 2002. Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific stains of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 44:1533-50.
- Toma, C., E. M. Espinosa, T. Song, E. Miliwebsky, I. Chinen, S. Iyoda, M. Iwanaga, and
 M. Rivas. 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 42:4937-46.
- Tomson, F. L., V. K. Viswanathan, K. J. Kanack, R. P. Kanteti, K. V. Straub, M. Menet, J.
 B. Kaper, and G. Hecht. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. Mol. Microbiol. 56:447-64.
- Torres, A. G., and J. Kaper. 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. Infect. Immun. 71:4985-95.
- Torres, A. G., R. C. Vazquez-Juarez, C. B. Tutt, and J. G. Garcia-Gallegos. 2005. Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. Infect. Immun. **73**:4766-76.
- Torres, A. G., X. Zhou, and J. Kaper. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strain to epithelial cells. Infect. Immun. **73:**18-29.
- Tozzi, A. E., A. Caprioli, F. Minelli, A. Gianviti, L. De Petris, A. Edefonti, G. Montini, A. Ferretti, T. De Palo, M. Gaido, and G. Rizzoni. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy 1988-2000. Emerg. Infect. Dis. 9:106-8.
- Tozzoli, R., A. Caprioli, and S. Morabito. 2005. Detection of *toxB*, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. J. Clin. Microbiol. 43: 4052-6.
- Trevena, W. B., R. S. Hooper, C. Wray, G. A. Willshaw, T. Cheasty, and G. Domingue. 1996. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. Vet. Rec. **138:**400.

- Urdahl, A. M., L. Beutin, E. Skjerve, S. Zimmermann, and Y. Wasteson. 2003. Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. J. Appl. Microbiol. 95:92-101.
- van Diemen, P. M., F. Dziva, A. Abu-Median, T. S. Wallis, H. van den Bosch, G. Dougan,
 N. Chanter, G. Frankel, and M. P. Stevens. 2007. Subunit vaccines based on intimin and Efa-1 polypeptides induce humoral immunity in cattle but do not protect against intestinal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 or O26:H-. Vet. Immunol. Immunopathol. 116:47-58.
- Vaz, T. M. I., K. Irino, M. A. M. F. Kato, A. M. G. Dias, T. A. T. Gomes, M. I. C. Medeiros,
 M. M. Rocha, and B. E. C. Guth. 2004. Virulence properties and characteristics of
 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999.
 J. Clin. Microbiol. 42:903-5.
- Vial, P. A., R. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D. Maneval,
 A. Elsadey, and M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis. 158:70-9.
- von Eichel-Streiber, C., P. Boquet, M. Sauerborn, and M. Thelestam. 1996. Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. Trends Microbiol. 4:375-82.
- Wagner, M., F. Allerberger, M. Manafi, G. Lindner, A. W. Friedrich, A. Sonntag, and H. Foissy. 2004. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from humans in Austria: phenotypes, toxin gene types and epidemiology. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 51:288-92.
- Wallace, J. S., T. Cheasty, and B. Rowe. 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. J. Appl. Microbiol. 82:399-404.
- Weber, A., H. Klie, H. Richter, P. Gallien, M. Timm, and K. W. Perlberg. 1997. Über die derzeitigen Probleme zum Auffinden von Infektionsquellen und Infektketten beim Enterohämorrhagischen E. coli (EHEC). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110:211-3.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, j. E. Samuel, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1998. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. J. Bacteriol. **170**:4223-30.
- Wells, J. G., L. D. Shipmann, K. D. Greene, E. G. Sowers, J. H. Green, D. N. Cameron, F.
 P. Downes, M. L. Martin, P. M. Griffin, and S. M. Ostroff. 1991. Isolation of

Escherichia coli serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. J. Clin. Microbiol. **29:**985-9.

- Whittam, T. S., M. L. Wolfe, I. K. Wachsmuth, F. Orskov, I. Orskov, and R. A. Wilson. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect. Immun. **61**:1619-29.
- Wickham, M. E., C. Lupp, M. Mascarenhas, A. Vazquez, B. K. Coombes, N. F. Brown, B. A. Coburn, W. Deng, J. L. Puente, M. A. Karmali, and B. B. Finlay. 2006. Bacterial genetic determinats of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrom after infection. J. Inf. Dis. 194:819-27.
- Wickham, M. E., C. Lupp, A. Vazquez, M. Mascarenhas, B. Coburn, B. K. Coombes, M.
 A. Karmali, J. L. Puente, W. Deng, and B. B. Finlay. 2007. *Citrobacter rodentium* virulence in mice associates with bacterial load and the type III effector NIeE. Microbes Infect. 9:400-7.
- Wieler, L. H., R. Bauerfeind, and G. Baljer. 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves withand without diarrhoea. Zentralbl. Bakteriol. 276:243-53.
- Wieler, L. H., E. Vieler, C. Erpenstein, T. Schlapp, H. Steinruck, R. Bauerfeind, A. Byomi, and G. Baljer. 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. J. Clin. Microbiol. 34:2980-4.
- Wieler, L. H. 1997 a. Bestimmung von Virulenzfaktoren boviner Shiga Toxin-bildender *Escherichia coli*-(STEC-) Stämme als Bewertungsgrundlage ihrer klinischen Bedeutung für Rind und Mensch. Shaker Verlag.
- Wieler, L. H., T. K. McDaniel, T. S. Whittam, and J. B. Kaper. 1997 b. Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemmorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. FEMS Microbiol. Lett. **156:**49-53.
- Wieler, L. H., A. Schwanitz, E. Vieler, B. Busse, H. Steinruck, J. B. Kaper, and G. Baljer. 1998. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. J. Clin. Microbiol. 36:1604-7.

- Wieler, L. H., B. Busse, H. Steinruck, L. Beutin, A. Weber, H. Karch, and G. Baljer. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains of serogroup O118 display three distinctive clonal groups of EHEC pathogens. J. Clin. Microbiol. 38:2162-9.
- Wieler, L. H., G. Sobjinski, T. Schlapp, K. Failing, R. Weiss, C. Menge, and G. Baljer. 2007. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **120**:296-306.
- Wilson, L. A., and P. M. Sharp. 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. Mol. Biol. Evol. 23:1156-68.
- Woodward, M. J., D. Gavier-Widen, I. M. McLaren, C. Wray, M. Sozmen, and G. R. Pearson 1999. Infection of gnotobiotic calves with *Escherichia coli* O157:H7 strain A84. Vet. Rec. 144:466-70.
- World Health Organization Scientific Working Group. 1998. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), 23-26 June 1998, Berlin, Germany, p.1-30.
 W.H.O./CSR/APH/98.8. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch. 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga Toxin 1 gene variant (*stx*1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. Clin. Microbiol. **40**:1441-6.
- Zhu, C., T. S. Agin, S. Elliot, L. A. Johnson, T. Thate, J. B. Kaper, and E. C. Boedeker. 2001. Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. Infect. Immun. 69:2107-15.

Danksagung

Danken möchte ich allen, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die Überlassung der Arbeit. Seine freundliche Unterstützung und wertvolle Kritik waren mir bei der Fertigstellung der Arbeit eine große Hilfe.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. J. Jores für die professionelle und kritische Betreuung sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin, die mich in unterschiedlichster Weise unterstützt haben. Besonderer Dank gilt Sabine Kießling für die unverzichtbare Unterstützung im Labor, Dr. Heike Kasper für ihre fachlichen Anregungen, Dr. Marcel Nordhoff für die kompetente Hilfe bezüglich der Mikroskopie sowie Peter Schwerk für die Lösung aller Computerprobleme.

Schließlich und ganz besonders möchte ich meiner Familie danken und zwar meinem Mann Anders für das Korrekturlesen der Arbeit und seine unendliche Geduld sowie meinem Sohn Jonas und meiner Tochter Charlotte die mir jeden Tag aufs Neue gezeigt haben, dass diese Arbeit zwar wichtig, aber nicht alles im Leben ist.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Sylke Behrend

Berlin, den 15.11.2007