

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch-

Molekularbiologischer Nachweis von
Markergenen für die Virulenz
in *Escherichia coli*

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Strobelt, Stefan

aus Aachen

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Alexander W. Friedrich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christof von Eiff

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.07

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch-
Referent: PD Dr. med. Alexander W. Friedrich
Koreferent: Prof. Dr. med. Christof von Eiff

ZUSAMMENFASSUNG

Molekularbiologischer Nachweis von Markergenen für die Virulenz in *Escherichia coli*

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind weltweit eine bekannte Ursache für Diarrhoe und der häufigste Grund für das besonders für Kinder gefährliche hämolytisch-urämische Syndrom (HUS). Hierbei ist besonders der Serotyp O157:H7 von großer Bedeutung. Zusätzlich sind mittlerweile bis zu 20% der HUS-assoziierten EHEC in Deutschland durch Sorbitol-fermentierende (SF) EHEC O157:H⁻ verursacht. Die frühzeitige stationäre Versorgung ist für die Prognose der Erkrankung von größter Bedeutung und in diesem Rahmen ist es wichtig, eine schnelle und spezifische mikrobiologische Diagnostik bei Vorliegen einer Infektion zu ermöglichen.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit werden spezifische molekularbiologische Marker für die Viulenz von *Escherichia coli* und die Differenzierung zwischen EHEC O157:H7 und O157:H⁻ ermöglicht. Anhand von Gendatenbanken wurden 5 spezifische Genabschnitte, sogenannte O-Islands (OI 09, OI 28, OI 130, OI 154 und OI 172) ausgewählt und ihr Vorhandensein in repräsentativen *E. coli* Stämmen untersucht.

Während sich bei den OI 28 und OI 130 ein sehr variables Verteilungsbild innerhalb der *E. coli* Population zeigte, erbrachten OI 09 und OI 154 ein fast ausschließliches Auftreten in den Serotypen O55:H7, O157:H7 und O157:H⁻. Der Genabschnitt OI 172 konnte vorwiegend in O157:H7 Stämmen gefunden werden. Durch den fehlenden Nachweis in O157:H⁻ Stämmen konnte mit OI 172 eine Unterscheidung zwischen EHEC O157:H7 und den SF EHEC O157:H⁻ Stämmen erfolgen.

Die vorliegenden Daten fügen sich in das bekannte Evolutionsmodell von EHEC O157. Mit Hilfe des Gensabschnitts OI 172 lässt sich dieses Modell sogar um wichtige genomische Ereignisse, die den Serotypen O157:H⁻ betreffen, erweitern.

Auch im Hinblick auf die klinische Bedeutung einiger Genregionen lassen die Ergebnisse Rückschlüsse zu. Die Gene der O-Islands sind assoziiert mit schwerem Krankheitsbild und Virulenz.

Eine Erleichterung für die diagnostische Differenzierung von EHEC Infektionen erbringt das Gen der O-Island 172. Es ermöglicht eine Differenzierung zwischen O157:H7 und dem hochpathogenen SF EHEC O157:H⁻.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

1. Einleitung	1
1.1 Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC)	1
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Übertragungswege	3
1.4 Klinik	3
1.5 Therapie	4
1.6 Pathogenitätsfaktoren	4
1.6.1 Toxine	4
1.6.2 Adhäsionsfaktoren	5
1.6.3 Plasmid kodierte Faktoren	6
1.7 Phylogenetische Bedeutung	7
1.8 Diagnostik	7
1.9 Zielsetzung der Arbeit	8
2. Materialien und Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.1.1 Laboreinrichtungen und Geräte	9
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3 Gebrauchslösungen	11
2.1.4 Nährmedien	11
2.1.5 Software	11
2.1.6 Synthetische Oligonukleotide	12
2.1.7 Bakterienstämme	13
2.2 Methoden	13
2.2.1 Genortauswahl	13
2.2.2 Bakterienanzucht	13
2.2.3 Amplifikation und Detektion	14
2.2.4 Sequenzierung der Amplifikationsprodukte	15
3. Ergebnisse	19
4. Diskussion	25
4.1 Evolutionsspezifische Beurteilung der O-Islands	25
4.2 Klinische Beurteilung der O-Island Analyseergebnisse	27
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	34
7. Abkürzungsverzeichnis	46
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	48
9. Lebenslauf	49
10. Danksagung	50
Anhang	50

1. Einleitung

Escherichia coli gehört zu den Hauptvertretern der nicht pathogenen Keime der menschlichen permanenten Schleimhautflora. Trotzdem haben einige der *E. coli* Stämme die Fähigkeit entwickelt, das Gastrointestinal-, das Urinwegs- und sogar das Nervensystem des Menschen zu infizieren [51]. Die darmpathogenen *E. coli* gehören somit zu den Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei Durchfallerkrankungen. In den Entwicklungsländern sterben jährlich ca. 2,5 Millionen Menschen an den Infektionen und ihren Folgen [36]. Derzeit lassen sich die obligat pathogenen *E. coli* Gruppen in mindestens sechs verschiedene Kategorien einteilen. Diese sind enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* [14] (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC oder EaggEC), diffus-adhärenente *E. coli* (DAEC), Cytolethal Distending Toxin produzierende *E. coli* (CDT) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) [11]. Besonders die EHEC Stämme erhalten seit ihrer Entdeckung 1982 zunehmend Bedeutung [61]. Sie verursachen besonders schwerwiegende Erkrankungen wie hämorrhagische Kolitis und das hämolytisch – urämische Syndrom (HUS) [5]. Da zurzeit noch keine kausal kurative Therapie einer EHEC Infektion möglich ist, erlangte der Erreger vor allem in Industriestaaten eine große Bedeutung für die medizinische Forschung (siehe Tabelle 1, Seite 2).

1.1 Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* sind definiert als Untergruppe von Shiga Toxin produzierende *E. coli* (STEC), die sowohl Durchfälle, hämorrhagische Kolitis und/oder HUS auslösen können [74].

Infektionen mit EHEC, welche zumeist erst nach Auftreten eines HUS erst als solche identifiziert werden, sind seit 4 Jahren nach § 6 und § 7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) in Deutschland meldepflichtig [1].

Tabelle 1: Klinische und epidemiologische Fakten und Virulenzfaktoren verschiedener pathogener *E. coli* Stämme nach Blaser und Musser

Pathogener <i>E. coli</i> Stamm	Klinisches Erscheinungsbild	Epidemiologische Faktoren	Virulenzfaktoren
enteropathogener <i>E. coli</i>	wässrige Durchfälle und Übelkeit mit Erbrechen	betroffen sind zumeist Kinder in Entwicklungsländern	gruppenformende Pili und attaching and effacing (EAE)
enterotoxische <i>E. coli</i>	wässrige Durchfälle	kindliche Durchfälle in Entwicklungsländern, häufiger Erreger der Reisekrankheit	Pili, hitzestabile und -labile Enterotoxine
enteroinvasive <i>E. coli</i>	Dysenterie, wässrige Durchfälle	Nahrungsmittel bedingte Ausbrüche	zelluläre Invasion, intrazelluläre Motilität
enteroaggregative <i>E. coli</i>	schleimige Durchfälle	kindliche Durchfälle	Pili, Cytotoxine
diffus-ahärente <i>E. coli</i>	kaum beschrieben	ältere Kinder	unbekannt
enterohämorrhagische <i>E. coli</i>	wässrige Durchfälle, hämorrhagische Kolitis, HUS assoziiert (siehe Kapitel 1.4)	Lebensmittel und Wasser assoziierte Übertragung (siehe Kapitel 1.2 und 1.3)	Shigatoxine, EAE, (siehe Kapitel 1.6)
uropathogener <i>E. coli</i>	Cystitis, Pyelonephritis	sexuell aktive Frauen	Typ I und P Fimbrien, Hämolysin, Pathogenitätsinseln
Menigitis assoziierter <i>E. coli</i>	akute Meningitis	Neugeborene	K1 Kapsel, S Fimbrien, zelluläre Invasion

1.2 Epidemiologie

1982 wurde in den USA erstmals der *E. coli* Serotyp O157:H7 als Auslöser zweier Ausbrüche von hämorrhagischer Kolitis [84] ermittelt. Bis heute wurden weitere Stämme (O26:H11/H⁻, O103:H2, O111:H⁻ etc.) als EHEC Serovare ermittelt [58], [85].

Weltweit sind eine Vielzahl von Ausbrüchen mit EHEC Infektionen beschrieben: Missouri, USA: [72], Washington State, Argentinien: [62], Schottland: [12], Schweden: [92], Kinshasa: [37]. Der größte bisher beschriebene Ausbruch war 1996 in Osaka, Japan, und umfasste 12.000 Erkrankungen [24].

Auch wenn in Deutschland seit der Einführung der Meldepflicht für EHEC Infektionen 2001 mit jährlich 1000 gemeldeten Erkrankungen (dabei ca.100 HUS Fälle) die Inzidenz ziemlich gleich bleibend ist [64], wird die Zahl der tatsächlichen Infektionen

auf etwa 10.000 jährlich eingeschätzt [57]. Das RKI berichtet ferner über eine verstärkte Infektionshäufung in den Sommermonaten. Betroffen seien besonders Kinder vor dem fünften Lebensjahr.

1.3 Übertragungswege

Das natürliche Reservoir der EHEC – Bakterien sind Wiederkäuer, wie Rinder, Schafe und Ziegen. Zusätzlich wurden EHEC – Bakterien im Kot von Pferden, Hunden und Vögeln gefunden. Die Übertragung auf den Menschen findet dann über kontaminierte Lebensmittel oder Wasser statt [93, 46]. Eine weitere Verbreitungsmöglichkeit stellt die direkte Kontaktinfektion dar. Besonders in Kindergärten und Altenheimen ist hier ein erhöhtes Risiko beschrieben. Der dritte bewiesene Übertragungsweg ist die direkte Übertragung von Tieren auf den Menschen [82, 55, 13]. Da die Großzahl aller EHEC Infektionen allerdings sporadisch ist, kann eine absolute Bestimmung des Infektionsweges nicht gemacht werden.

Wichtig ist allerdings zu bemerken, dass die Infektionsdosis u.a. aufgrund der Säuretoleranz [42] der EHEC – Bakterien mit weniger als 50 Keimen extrem niedrig liegt [78, 81].

1.4 Klinik

Das klinische Erscheinungsbild von EHEC Infektionen reicht von Symptomlosigkeit bis zu Krankheitsbildern mit Todesfolge. Wässrige Durchfälle, Übelkeit und Erbrechen sind bei nahezu allen Erkrankten zu finden [26]. Bei vielen Patienten wird zusätzlich oft nur kurzzeitiges Fieber angegeben. In einigen Fällen gehen die wässrigen Durchfälle nach ein bis drei Tagen in blutige über. Auch wenn die meisten Infektionen nach 6 bis 9 Tagen folgenlos abklingen, kann es zu schwerwiegenden Komplikationen kommen. Diese sind besonders die hämorrhagische Kolitis, welche chronifizieren kann [32], und in fünf bis zehn Prozent der Fälle das HUS. Letzteres ist mit einer Mortalität von zwei bis sieben Prozent [26] besonders gefährlich, da es neben der Ursprungstrias (hämolytische Anämie, akutes Nierenversagen und Thrombozytopenie) eine Vielzahl weiterer Komplikationen (z.B. neurologische oder pulmonale) mit sich bringen kann [60, 90]. Für die Entwicklung eines HUS sind viele verschiedene Risikofaktoren wie

Alter (jünger als fünf oder älter als 65 Jahre), Medikamente und Infektionen mit bestimmten Stämmen beschrieben [22, 4, 17]. Besonders charakteristisch für ein HUS ist außerdem, dass etwa die Hälfte der Patienten einen Folgeschaden davonträgt [75, 25, 90].

1.5 Therapie

Zurzeit ist noch keine spezifische Therapie für eine EHEC Infektion bekannt. Somit beschränken sich die Maßnahmen auf ein symptomatisches Vorgehen.

Die Antibiotikagabe ist in der Literatur hart umstritten. Während einige einen nicht negativen Effekt [29, 66] behaupten, wird die Gabe in Deutschland aufgrund eines höheren HUS Risikos eher abgelehnt [63]. Die wichtigste Maßnahme besteht somit in der aggressiven Flüssigkeitssubstitution besonders zum Schutz der Niere [75]. Bei Auftreten eines HUS ist oft eine Dialyse mit substituierender Therapie der Anämie und Thrombozytopenie angezeigt. Die WHO bemüht sich seit einiger Zeit einen Impfstoff zu entwickeln [88].

Die wichtigsten Maßnahmen bestehen somit noch immer in der Prävention der Erkrankungen durch Hygienemaßnahmen, Verordnungen zum Ausbruchmanagement und Umgang mit potentiellen weiteren Infektionsquellen.

1.6 Pathogenitätsfaktoren

Es gibt viele Virulenzfaktoren, die für die Pathogenität der EHEC – Bakterien verantwortlich sind. Vor allem Toxine, Adhäsionsfaktoren und Faktoren, die auf einem Virulenzplasmid lokalisiert sind, spielen eine wichtige Rolle. Gemeinsam ist allen, dass sie auf mobilen genetischen Einheiten liegen.

1.6.1 Toxine

Der wohl wichtigste Pathogenitätsfaktor ist das Shiga Toxin (Stx). Dieses gliedert sich in 2 Untereinheiten, das Stx₁, welches zu 98 % identisch mit dem Stx des Namen gebenden Bakteriums *Shigella dysenteriae* ist, und das Stx₂. Außer dem klassischen Stx₁ existieren 2 weitere Toxinvarianten: Stx_{1c} und Stx_{2d} [91]. Die Stx₂-Gruppe ist mit 5 Varianten heterogener: Stx_{2c} [70], Stx_{2d} [56], Stx_{2e} [83], Stx_{2a}, Stx_{2f} [69] und Stx_{2g} [41].

Beide Toxingruppen bilden sich aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit, der rRNA-N-Glycosidase, und fünf B-Untereinheiten.

Der Pathomechanismus funktioniert, indem das Toxin an einen membranständigen Glykosphingolipid-Rezeptor, dem Globotriaosylceramidrezeptor (Gb3), der sowohl in Niere, Darm als auch dem Gehirn exprimiert wird, bindet. Anschließend kommt es zur Endocytose und Eindringen in den Blutkreislauf [59]. Zur Apoptose der Zielzelle kann es durch Spaltung von Adenosinresten in der rRNA [54] und damit verbundener Inhibierung der Proteinsynthese kommen.

Weitere Auswirkungen auf den Wirtsorganismus kommen durch eine Steigerung der Expression vieler Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren zu stande [6, 77, 49].

Die Auswirkungen des Stx₂ auf die Genregulation bzw. -expression der geschädigten Zellen sind erheblich größer als die des Stx₁, wodurch die epidemiologischen Erkenntnisse über die hohe Inzidenz der schweren Krankheitsverläufe durch stx₂ produzierende EHEC bestätigt werden [44].

Ein weiteres Toxin der EHEC Bakterien ist das Cytholethal Distending Toxin, welches auf einem Phagen codiert ist [30]. Hierbei ist die wirkliche Pathogenität noch nicht absolut gesichert.

Die phänotypisch enterohämolytische EHEC Variante wird durch das Zytotoxin EHEC-Hämolysin geschaffen [87].

Ein weiteres Enterotoxin der EHEC - Bakterien, welches ursprünglich in entero-aggressiven *E. coli* Bakterien vorkommt, ist das EAST1. Es wird mit den anfänglichen, wässrigen Durchfällen in Verbindung gebracht [52].

1.6.2 Adhäsionsfaktoren

In der Literatur sind zahlreiche Faktoren beschrieben, die für die Adhäsion der EHEC Bakterien an das Darmepithel verantwortlich sein sollen. Besonders das Produkt des „locus enterocyte effacement“ (LEE) spielt hierbei eine wichtige Rolle [45]. Es verursacht mittels mehrerer Genprodukte „attaching and effacing (A/E) Läsionen“ und ermöglicht so eine Erregeradhärenz [27, 48].

Weiterhin sind in der Literatur viele andere Adhäsionsfaktoren beschrieben, welche aber noch weniger gut erforscht sind. Beispiele sind „long polar fimbria“ [16, 80], das

„cah protein“, ein Calcium bindendes Antigenhomologon [80], Shiga Toxin (*stx*), welches mit einer Aggregation an HEp-2 Zellen assoziiert ist [47], und Sfp, ein Fimbrienfaktor kodiert auf dem Plasmid von sobitolfermentierenden EHEC Bakterien [8].

1.6.3 Plasmid kodierte Faktoren

Der Hauptvertreter der enterohämorrhagischen *E. coli* der Serotyp O157:H7 besitzt zu 99% ein 93,6 kb bis 104 kb großes Virulenzplasmid. Auch in etwa 77% aller O26:H11 Serovare und insgesamt 81% der nonO157:H7 Stämme ist dieses Plasmid zu finden [51].

Unter anderem codiert dieses Plasmid für den Pathogenitätsfaktor EHEC-Hämolysin (E-Hämolysin), ein porenbildendes Zytolysin [68]. Das hierfür codierende Gen E-hlyA liegt auf dem Sal I Plasmidfragment pEO40-1 [68].

Das E-Hämolysin gehört zur RTX-Toxinfamilie, welches von uropathogenen Keimen wie *Pasteurella haemolytica* produziert wird. Das E-hlyA Gen wiederum ist zu 60% identisch mit dem für alpha Hämolysin codierenden hlyA Gen dieser uropathogenen *E. coli* [28, 51].

Im Unterschied zur Funktion der Shigatoxine ist die Rolle des E-Hämolysins im Bezug auf die Virulenz noch relativ unerforscht. Es ist lediglich sicher bekannt, dass aus der Lyse der Erythrozyten eine erhöhte Konzentration an Häm und Hämoglobin gebildet wird und somit das Wachstum der enterohämorrhagischen *E. coli* verbessert wird.

Weiterhin sind für das alpha Hämolysin und das E-Hämolysin synergetische Effekte mit dem Shigatoxin beschrieben [71, 35]. Besonders unterstützt wird die klinische Bedeutung dieser Synergie durch die Assoziierung des EHEC – Hämolysins mit einer erhöhten Interleukin β Produktion im Zielorganismus bei *stx* positiven HUS Patienten [68].

Des weiteren sind auf dem Plasmid viele weitere mögliche Virulenzfaktoren lokalisiert. Hierzu gehören unter anderen das in Abschnitt 1.6.2 erwähnte Sfp, eine Katalase/Peroxidase [9] und ein C1-Esterase-Inhibitor [40, 38].

1.7 Phylogenetische Bedeutung

Durch die starke horizontale Mobilität der Pathogenitätsgene der EHEC Bakterien gibt es eine Vielzahl von EHEC Serovaren, welche somit entwicklungsgeschichtlich zusammenhängen, aber ein sehr weites Spektrum umfassen [58, 73].

Für den häufigsten Serovar, den O157:H7, allerdings existiert ein weit reichendes Evolutionsmodell. 1993 wurde erstmalig der EPEC Stamm O55:H7 aufgrund seines Elektrophoresemusters (MLEE) als Vorfahr des O157:H7 vermutet [86]. Feng et al erweiterten 1998 diese Vermutung mittels weiteren MLEE und Mutationsanalysedaten zu einem Evolutionsmodell [19]. Das Modell erklärt in einem Stufensystem die Evolutionsschritte mit Hilfe des Verlusts bzw. Erwerbs verschiedener Eigenschaften wie Virulenzfaktoren, Motilität und Sorbitolfermentierung. Bis heute wurde das Modell durch Verlust/Erwerb weiterer Gene und Faktoren erweitert und somit verstärkt bestätigt [39, 23]. Eine erweiterte Darstellung des Modells siehe Abbildung III im Abschnitt 4.2.4.

1.8 Diagnostik

Lediglich für den meist verbreiteten EHEC Stamm O157:H7, welcher nicht sorbitolfermentierend ist und einen Verlust der β -Glukoronidaseaktivität aufweist, besteht die Möglichkeit einer direkten Diagnostik mittels eines Selektivnährmediums wie dem sorbitol MacConkey Aggar (SMAC) [43].

Zur Diagnostik von anderen EHEC Bakterien wird ein Drei-Stufen-Modell verwendet. Diese bestehen aus einem Selektivmedienscreening mit Enzymimmunoassay (Stufe1), bei bestehendem Verdacht einer anschließenden Isolierung und Charakterisierung mit Toxinnachweis (Stufe2) und aus epidemiologischen Gründen einer genauen Typisierung [21].

Aufgrund der schwierigen Nachweisbarkeit von EHEC Bakterien bei progredienten Infektionen wurden für die Diagnostik Verfahren wie eine Anreicherung durch immunomagnetische Separation [34] oder Antikörpernachweise [33] etabliert.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Nach wie vor ist es extrem aufwendig, einen EHEC als Erreger einer Durchfallerkrankung zu diagnostizieren. Da das Drei-Stufen-Verfahren (siehe oben) mehrere Tage in Anspruch nimmt, um den Durchfallerreger als EHEC zu bestimmen und zu beschreiben, gibt es ein großes Bestreben für die Diagnostik einen Schnelltest zu entwickeln. Um aber ein phänotypisches Schnellverfahren zu entwickeln, besteht der erste Schritt darin eine genetische Grundlage zu finden und sie anschließend genauer auf Sequenz und Lage im Genom zu typisieren.

Mit Hilfe dieser Arbeit soll versucht werden, eine Antwort auf die Frage, was EHEC spezifische Gene sein könnten, zu finden. Orientierungspunkt sollen hierbei die Unterschiede zwischen dem sequenzierten EHEC Stamm EDL 933 und dem apathogenen Stamm C600 als Vergleich sein.

Genetic Analyzer 2001

Power-Supply 2301 Macrodrive LKB, Bromma

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Natriumchlorid 0,9%	Delta Pharm, Pfullingen
Safe Lock Tubes (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Einmalimpfeschlingen: 1µl und 10µl loops	Nunc, Roskilde (DN)
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
dNTPs (10mM) 1000µl	Eppendorf, Hamburg
BMA SeaKem LE-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Trisborat-EDTA-Puffer (TBE) 10x	Roth, Karlsruhe
Aqua bidestillata	Eigenherstellung
MultiScreen 96-well Filtration Plates	Millipore, Schwallbach
96er-Mikrotiterplatten	AlphaPlast
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsstandard	
1-kbp-ladder (1µg/µl)	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
100-bp-ladder	
Ethidiumbromid 10 mg/ml	BioRad, Herkules (CA/USA)
ABI Prism Big Dye™ Terminator Reaction Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Pipettenspitzen, verschiedene Größen (teils gestopft)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Tubes 0,2ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Adhesive PCRFilm (sealing sheet)	ABgene House, Surrey (UK)
Tris Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt
HPLC Wasser Li Chrosoly	Merck, Darmstadt
InstaGene™ Matrix	Bio Rad, Herkules (CA,USA)
MultiScreen Column Loader 45 µl	Millipore, Schwallbach
Salzsäure HCl 32%	Merck, Darmstadt

Sephadex G50 Superfine Kunstharz	AmershamPharmaciaBiotech, Uppsala (S)
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ μ l)	USB Amersham, Cleveland (OH,USA)
Exonuklease I <i>E.coli</i> 20000 U/ml	New England Biolabs, Beverly (MA,USA)
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5U/ μ l)	Applied Biosystems, Weiterstadt
10x PCR Puffer (100mM HCl, pH 8,3/25°C, 500mM KCl, autoklaviert)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Magnesiumchlorid Pufferlösung (25mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.1.3 Gebrauchslösungen

TBE-Puffer 0,5x	950ml Aqua bidestillata, 50ml 10x TBE-Puffer
TE-Puffer	121,44mg Tris, 3,72mg EDTA, 100ml HPLC Wasser, 32% HCl auf pH 7,5 (ca 80 μ l)
Probenpuffer (Gelelektrophorese)	125 mg Bromphenolblau, 17 ml Glycerin, 33 ml Aqua bidestillata
Ethidiumbromidbad	1l Aqua bidestillata, 50 μ l Ethidiumbromid (10mg/ml)
ABI Puffer	400 μ l Stammlösung A (12,1g Tris, 80 μ l HPLC Wasser, 32% HCl auf pH 9 (ca. 1,5ml), ad 100ml HPLC Wasser, autoklaviert) 10 μ l Stammlösung B (20,3mg MgCl ₂ in 100ml HPLCWasser) 590 μ l HPLC Wasser

2.1.4 Nährmedien

Sorbit-MacConkey-Agar (SMAC)	Institut für medizinische Mikrobiologie, Münster Pepton 15,5g, Protease Pepton 3g, d-Sorbitol 10g, Gallensalz 1,5g, NaCl 5g, Neutralrot 0,03g, Kristallviolett 0,001g, Agar 15g, Aqua destillata 1l, pH = 7,2 \pm 0,2
------------------------------	--

2.1.5 Software

OligonukleotidAuswahl:	
Primer Select Power Macintosh 3.04a und Edit Seq	DNA Star, Madison (WI/USA) R. Kalendar
Fast PCR © 1998-2004 v.3.3	http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm

PCR-Dokumentation:

Quantity One 1-D-Analysis Software BioRad, Herkules (CA/USA)

Sequenzanalysesoftware:

BLAST algorithm <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 RidomTraceEdit-1.0 Ridom GmbH, Würzburg
<http://www.ridom.de>

Sequence Navigator Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt

Sequenzierungssoftware:

3100 Avant Data Collection Software Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt

Statistik:

OpenStat3 Vers.3.5.7 W.G. Miller
<http://www.statpages.org/miller/openstat/OS3.html>

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Genosys, Steinheim, gekauft und in TE-Puffer gelöst (Konzentrationen: 30µmol/l). Zur Auswahl der Primer wird auf Fast-PCR und auf das Kapitel 2.2.3.2 verwiesen.

Tabelle 2: Primer, die den O-Islands entsprechend entworfen wurden

Primer	Target	Sequenz	Design
OI09fwd OI09rev	<i>OI 09</i>	5'- aca agc att gtc ccg aat gc -3' 5'- atg gac tgt cgg tct gtg ac -3'	Fast-PCR
OI28fwd OI28rev	<i>OI 28</i>	5'- gct gag cct ggc aac gcc aca c -3' 5'- cgt tta gcg taa cgg tga gtt c -3'	Fast-PCR
OI130fwd OI130rev	<i>OI 130</i>	5'- cat ccg gag tta ttc gat ggt g -3' 5'- gca gac caa taa cta cgg ctc c -3'	Fast-PCR
OI1543fwd OI1543rev	<i>OI 154</i>	5'- tgc aat cgc ctc acc acg ggt c -3' 5'- cag acc ctg ctc ccg gta tgg t -3'	Fast-PCR
OI172fwd OI172rev	<i>OI 172</i>	5'- teg atc ccg tgg ctt tgg -3' 5'- ctt ata gag gca atc agc ctc -3'	Fast-PCR

2.1.7 Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden der Stammsammlung von Herrn Prof. Dr. Karch, Institut für Hygiene, Münster, entnommen. Es wurden die ECOR- und DEC-Stammauswahlen nach Thomas Whittam verwendet [86]. Weiterhin wurden 5 nicht Sorbitol fermentierende *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ und 5 Sorbitol fermentierende *E. coli* O157:H⁻ Stämme aus den Jahren 1988 bis 2003 ausgewählt, um eine Widerspiegelung klinischer Isolate zu erhalten. Zusätzlich wurden 9 Stuhlausstriche zur Genbestimmung bei klinischen Mischstämmen zu erhalten. Eine Tabelle der ausgewählten Stämme mit den besagten Merkmalen und Ergebnissen dieser Arbeit findet sich im Anhang (Tabelle A und Tabelle B).

2.2 Methoden

2.2.1 Genortauswahl

Auf Grundlage der von Perna et al. [51] bestimmten O-Islands des EHEC Stamms EDL 933, welcher zusammen mit dem Sakaistamm die einzigen komplett sequenzierten EHEC Stämme sind, wurden Genorte ermittelt, die in keinem anderen bereits sequenzierten *Escherichia coli* Stamm vorkamen. Hierzu wurde die Sequenz mittels BLAST algorithm verglichen (Blastergebnisse siehe Tabelle IV, Seite 20, und Anhang Tabelle III) und die geeigneten O-Islands 09, 28, 130, 154 und 172 als Targets gewählt.

2.2.2 Bakterienanzucht

Die *Escherichia coli* Stämme wurden auf Sorbitol-MacConkey Agar (SMAC) kultiviert und alle zehn Tage durch Überimpfen in neuen Kulturen angelegt. Bebrütet wurden die Kulturen für 24h bei 36°C und dann bei 4°C gelagert.

2.2.3 Amplifikation und Detektion

2.2.3.1 DNA Präparation

Ein bis zwei Bakterienkolonien wurden in 50µl 0,9% Natriumchloridlösung suspendiert und für 10 min bei 100°C im Blockthermostat gekocht. Pro PCR Ansatz wurden 5µl dieser Suspension verwendet.

2.2.3.2 PCR

Zur Amplifikation der jeweiligen Genabschnitte der bakteriellen DNA diente die Polymerase-Chain-Reaction. Zur ausführlichen Darstellung kann auf [50] verwiesen werden. Entsprechend der Längen der Primer und deren Basenzusammensetzung wurden die in Tabelle 2 aufgeführten PCR Bedingungen bestimmt.

Bei der PCR wurden pro Reaktionsansatz 5µl DNA-Suspension, 34µl Aqua ad injectabilia, 5µl 10-fach PCR-Puffer, 3µl MgCl₂ (25mM), 1µl dNTPs (10µM), 0,3µl Taq-Polymerase (5U/µl) und je 1µl Primer (30 µM) verwendet. Der *Escherichia coli* Stamm EDL 933 diente als Positivkontrolle für alle Gene. Als Negativkontrolle für die Genloci OI 09, OI 130, OI 154 und OI 172 diente der nicht pathogene Laborstamm *E. coli* C 600 und für den Genlocus OI 28 der ATCC-Stamm 2578.

Tabelle 3: Verwendete PCR-Bedingungen

Primer	PCR – Bedingungen*			Produktlänge in bp
	Denaturierung	Annealing**	Elongation	
OI28-fwd OI28-rev	94° C, 30 s	60,7° C, 60 s	72° C, 60s	445
OI09-fwd OI09-rev	94° C, 30 s	58,7° C, 60 s	72° C, 60s	444
OI130-fwd OI130-rev	94° C, 30 s	58,7° C, 60 s	72° C, 60s	411
OI154-fwd OI154-rev	94° C, 30 s	59,7° C, 60 s	72° C, 60s	341
OI172-fwd OI172-rev	94° C, 30 s	58,7° C, 60 s	72° C, 60s	397

* PCR-Bedingungen Initial 5min bei 94°C, dann 30 Zyklen, finale Elongation bei 5min 72°C
 ** Annealing Temperaturen wurden aus $T[°C]=4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 5$ berechnet

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Fast PCR © 1998-2004 v.3.3 bezüglich des spezifischen Targets (siehe Tabelle 5, Seite 19) ermittelt. Bei dem Genlocus OI 154

konnte bei den ersten Primerpaaren keine Annealing-Temperatur ermittelt werden, bei der nicht viele unspezifische Nebenprodukte auftraten. Erst das dritte Primerpaar lieferte verwendbare Produkte und wurde deshalb für den Nachweis des Genorts verwendet (Fast PCR © 1998-2004 v.3.3).

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung des PCR Produkts wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurden 1050 mg LE-Agarose in 70ml 0,5x TBE Puffer für 30s gekocht und nach fünfminütigem Abkühlen in einen Gießstand mit zwei Kämmen gegossen, so dass nach 30minütiger Polymerisationszeit ein etwa 6-7mm dickes Gel mit zweimal 20 Taschen zur Verfügung stand. Es wurden je 10 μ l eines Ansatzes bestehend aus 4 μ l Probenpuffer und 20 μ l Amplifikationsprodukt in eine Tasche des Gels pipettiert. Zusätzlich zu den PCR Produkten der zu untersuchenden Stämme wurde auf jedem Gel eine Positiv- und Negativkontrolle sowie links und rechts je 5 μ l eines Molekulargewichtsstandards hinzugefügt. Letzterer entstammte einem Ansatz aus 2 μ l Probenpuffer, 7 μ l Aqua bidestillata und 3 μ l 100bp-Molekulargewichtsstandard für den linken Rand des Gels bzw. 2 μ l Probenpuffer, 8 μ l Aqua bidestillata und 2 μ l 1kbp-Molekulargewichtsstandard für den rechten Rand. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 110 Volt durchgeführt und bei einer Laufstrecke von etwa zwei Dritteln (ca. 70min) des Gels beendet. Das Gel wurde für zwanzig Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt und nach 20minütigem Waschen in Aqua destillata mit der Quantity One 1-D-Analysis Software dokumentiert.

2.2.4 Sequenzierung der Amplifikationsprodukte

Zur Belegung der Spezifität der jeweiligen Primer und um die exakte Basenabfolge des PCR-Amplifikats zu bestimmen, wurde bei einer zufälligen Auswahl der positiv getesteten Stämme eine Sequenzierung durchgeführt. Die Auswahl ermittelte die Stämme ECOR37, DEC3B und DEC5E. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der Sequenz des ebenfalls für jedes Gen sequenzierten Referenzstammes EDL 933 auf Homologie hin verglichen. (siehe Anhang Tabelle C)

2.2.4.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit Hilfe der InstaGene™ Matrix, einem kombiniert chemisch-physikalischen Verfahren, extrahiert.

Die so extrahierte DNA wurde für die anschließende PRC in eine 1:10 Verdünnung (mit TE Puffer) gebracht und bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Amplifikation und Produktaufreinigung

Um die Amplifikatmenge und den Primerüberschuss zu limitieren, wurde bei der Amplifizierungs-PCR (siehe 2.2.3.2) HPLC Wasser statt Aqua ad injectabilia eingesetzt und nur 10pmol Primer verwendet.

Anschließend reinigte man mit Hilfe zweier hydrolytischer Enzyme, Exonuclease I (EXO I) und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), das PCR-Produkt auf, um so überschüssige dNTPs und einzelsträngige Oligonukleotide zu degradieren. Hierbei wurde zu 5 μl des PCR-Produkts jeweils 1 μl der beiden Enzyme (1U/ μl) gegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Enzyme für 15min bei 80°C inaktiviert.

2.2.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger [67] durchgeführt. Es werden einem PCR Ansatz zusätzlich 2'-3'-Dideoxynukleotide zugesetzt. Diese werden beliebig in die entstehenden Oligonukleotidketten integriert und induzieren einen Kettenabbruch. Die so entstandenen, unterschiedlich langen Produkte werden nachfolgend elektrophoretisch aufgetrennt und entsprechend ihrer Markierung detektiert.

Mit dem ABI Prism Big Dye™ Terminator Reaction Cycle Sequencing Ready Reaction Mix wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte dNTPs im Rahmen einer PCR Sequenzierung (Cycle Sequencing) verwendet. Hierbei wurden getrennte Ansätze für forward und reverse Primer durchgeführt. Für einen Genamplifikatmix nahm man 2 μl aufgereinigtes PCR Produkt, 1 μl Primer (10 μM), 4,7 μl HPLC Wasser, 1,8 μl 5x ABI-Sequenzierungspuffer und 0,5 μl Big Dye™ Premix (Taq-Polymerase, dNTPs und farbstoffmarkierte ddNTPs).

Für die Genloci wurden die in Tabelle 3 (Seite 14) genannten Cycler Programme verwendet. Die Cycler Programme für die Sequenzierung orientierten sich an den PCR Bedingungen (siehe Tabelle 2, Seite 11), wobei 25 mal ein Zyklus von 10s Denaturierung bei 96°C, 5s Annealing entsprechend der Temperaturen für die jeweiligen Primer und 4 min Elongation bei 60°C durchlaufen wurden.

Tabelle 4: Cycler Programme für die Sequenzierung

Genlocus	Zyklus (25x)		
	<i>Denaturierung</i>	<i>Annealing</i>	<i>Elongation</i>
OI 09	96°C, 10s	58,7°C, 5s	60°C, 4min
OI 28	96°C, 10s	60,7°C, 5s	60°C, 4min
OI 130	96°C, 10s	58,7°C, 5s	60°C, 4min
OI 154	96°C, 10s	59,7°C, 5s	60°C, 4min
OI 172	96°C, 10s	58,7°C, 5s	60°C, 4min

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde zur abschließenden Aufreinigung über Kunstharzsäulen geleitet. Es wurden 45µl Sephadex G 50 Superfine Pulver mit 300µl HPLC Wasser in eine MultiScreen HV Platte gegeben, für drei Stunden bei Raumtemperatur quellen gelassen und das restliche Wasser abzentrifugiert (5min, 2300U/min). Nach einer 150µl HPLC Wasserspülung und anschließender Zentrifugation (5min, 2300U/min) wurden 10µl des Sequenzierungs-PCR-Produkts auf die Säule aufgetragen und durch Zentrifugation (5min, 2300U/min) in eine Mikrotiterplatte eluiert. Diese aufgereinigte DNA wurde in einer Vakuumzentrifuge für 20min bei 45°C getrocknet, in 20µl Formamid gelöst und zur automatischen Sequenzierung gegeben.

2.2.3.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzen der Loci OI 09, OI 154 und OI 172 wurden mit RidomTraceEdit-1.0 analysiert und durch Fast PCR © 1998-2004 v.3.3 in ein einheitliches Format überführt. Aufgrund eines vollständigen Allignments konnte die Sequenz mit Hilfe der Sequence Navigator Software analysiert werden. Abschließend wurde ein Homologievergleich mit der zu erwartenden Sequenz, erstellt durch Fast-PCR, durchgeführt.

Ergebnisse siehe Anhang Tabelle C.

3. Ergebnisse

3.1 Ermittlung der O - Islands

Um mögliche EHEC spezifische Gensequenzen zu ermitteln, wurden unter zu Hilfenahme der O – Island Tabelle [51] passende Genloki des EDL 933 ausgewählt.

Nachdem diese mittels BLAST algorithm mit anderen sequenzierten Bakterien - DNA – Sequenzen verglichen worden waren und hierbei keine *E. coli* Matches gefunden wurden, wurden O – Island 09, 28, 130, 154 und 172 für die Versuchsreihe ausgewählt (siehe Tabelle 4, Seite 17). Für diese DNA – Abschnitte wurden spezifische Primer designed (siehe Methodik).

Tabelle 5: Homologieprüfung der verwendeten Nukleotidsequenzen mit sequenzierten Bakteriengenomen

Nr.	O-Island Nr.	Funktion	Spezifität	Homologie
1	OI 7	RHsG	+	< 10 %
2	OI 9	Porin-Regulator-Gen	+++	0 %
3	OI 25	Strukturproteine	+++	0 %
4	OI 28	RTX Toxin	++	< 1 %
5	OI 40	Sulfatasestrukturgen	++	< 1 %
6	OI 47	Adhesingen	++	< 1 %
7	OI 51	CP-933C	+	< 10 %
8	OI 62	Poringen	+	< 10 %
9	OI 76	CP-933T	+	< 10 %
10	OI 95	Gene zur aromatischen Gradation	+	< 10 %
11	OI 102	Phage P22	+	< 10 %
12	OI 115	SPA Typ 3 Sekretionsgen	+	< 10 %
13	OI 130	Bakterioferritingen	++	< 1 %
14	OI 154	“long polar fimbria” - Gen	++	< 1 %
15	OI 167	Ribosetransporter gen regulator	++	< 1 %
16	OI 172	Helicase	++	< 1 %

- +++ keine Übereinstimmung mit anderer Bakterien DNA
- ++ geringe Übereinstimmung mit nicht *E. coli* Bakterien
- + geringe Überschneidung (<10 %) mit anderen *E. coli* Bakterien

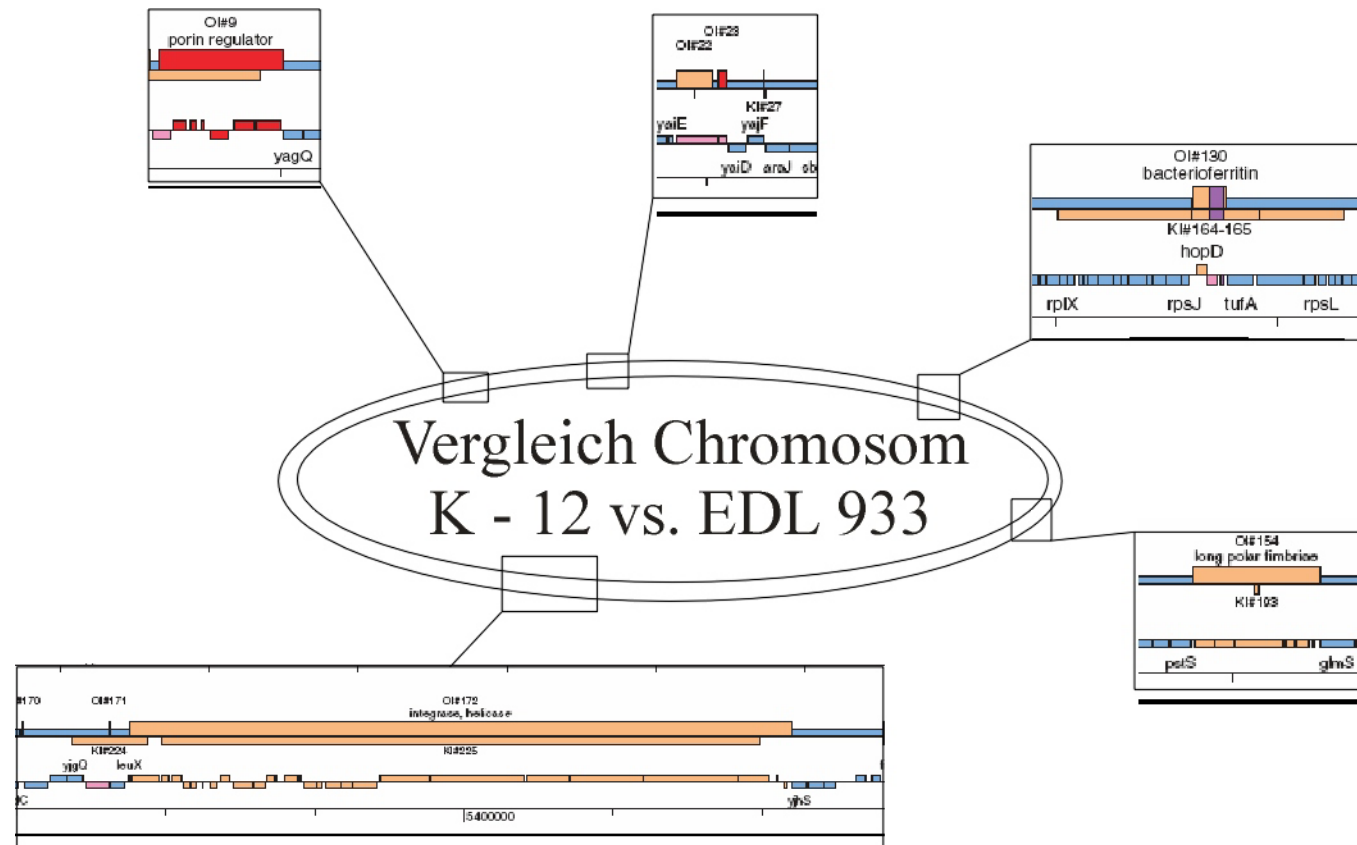


Abbildung I: Vergleich zwischen zwischen K – 12 chromosomaler DNA und EDL 933 chomosomaler DNA modifiziert nach Perna et al.

Die in den Vergrößerungen dick dargestellten Abschnitte stellen DNA Sequenzabweichungen zwischen dem K – 12 *E. coli* Stamm und dem EDL 933 EHEC Stamm dar. In der mittleren Leiste sind zusätzlich Unterschiede zum Sakai Stamm abgebildet.

3.2 Genverteilung innerhalb der Referenzstammsammlung ECOR/DEC

Der Referenzstamm EDL 933 wurde als Positivkontrolle verwendet und somit auf alle untersuchten Genloki PCR positiv. Der *E. coli* K-12 Laborstamm C600 konnte bei den Genabschnitten OI (O-Island) 09, 130, 154 und 172 ebenso wie der ATCC Stamm 2578 bei OI 28 als Negativkontrolle bestätigt werden.

Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 5 und Abbildung II zum Ausdruck gebracht. Eine genaue Übersichtstabelle ist im Anhang I und II zu finden.

Tabelle 6: Merkmalsausprägungen der untersuchten Bakterienstämme

Isolate	O	H	OI 09	OI 28	OI 130	OI 154	OI 172
DEC3B	157	7	+	+	+	+	+
DEC3C	157	7	+	+	+	+	+
DEC3D	157	7	+	+	+	+	+
DEC3E	157	7	-	-	-	-	-
493/89	157	nm	+	+	+	+	-
DEC4A	157	7	+	+	+	+	+
DEC4B	157	7	+	-	+	+	+
DEC4C	157	7	+	+	+	+	+
DEC4D	157	7	+	+	+	+	+
DEC4E	157	7	+	+	+	+	+
EDL-933	157	7	+	+	+	+	+
DEC5A	55	7	+	+	+	+	-
DEC5B	55	7	+	+	+	+	-
DEC5C	55	7	+	+	+	+	-
DEC5D	55	7	+	+	+	+	-
DEC5E	55	7	+	+	+	+	+
ECOR-17	106	nm	-	-	-	-	+
ECOR-37	nm	nm	+	+	+	+	-
ECOR-43	nm	nm	+	+	+	-	+

+ Merkmal vorhanden
 - Merkmal nicht vorhanden
 nm keine Mobilität

Wie oben dargestellt waren alle Genabschnitte PCR positiv für die meisten O157:H7 Stämme. Lediglich der DEC3E Stamm bildete eine Ausnahme. Der Sorbitol fermentierende O157:H- Stamm 493/98 war außer für OI 172 ebenfalls auf alle Genloki PCR positiv. Für die O55:H7 Stämme schließlich ergab sich ebenfalls ein komplett PCR positives Bild, wobei die OI 172 lediglich im DEC5E nachgewiesen wurde. Abgesehen von der insgesamt unspezifisch in allen DEC und ECOR Stämmen verteilten OI 130 konnten die untersuchten Genloki in keinem anderen DEC Stamm nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung auf Prävalenz der Gene in der ECOR Serie ergab sich für OI 28 und OI 130 ein unspezifisches Verteilungsmuster. Die OI 09 (ECOR-24,-31,-37 und -43), OI 154 (ECOR-37) und OI 172 (ECOR-17 und -43) hingegen wurden nur vereinzelt gefunden.

Abbildung II: Gelelektrophoresebilder mit PCR-Produkten jeweils eines Primerpaars

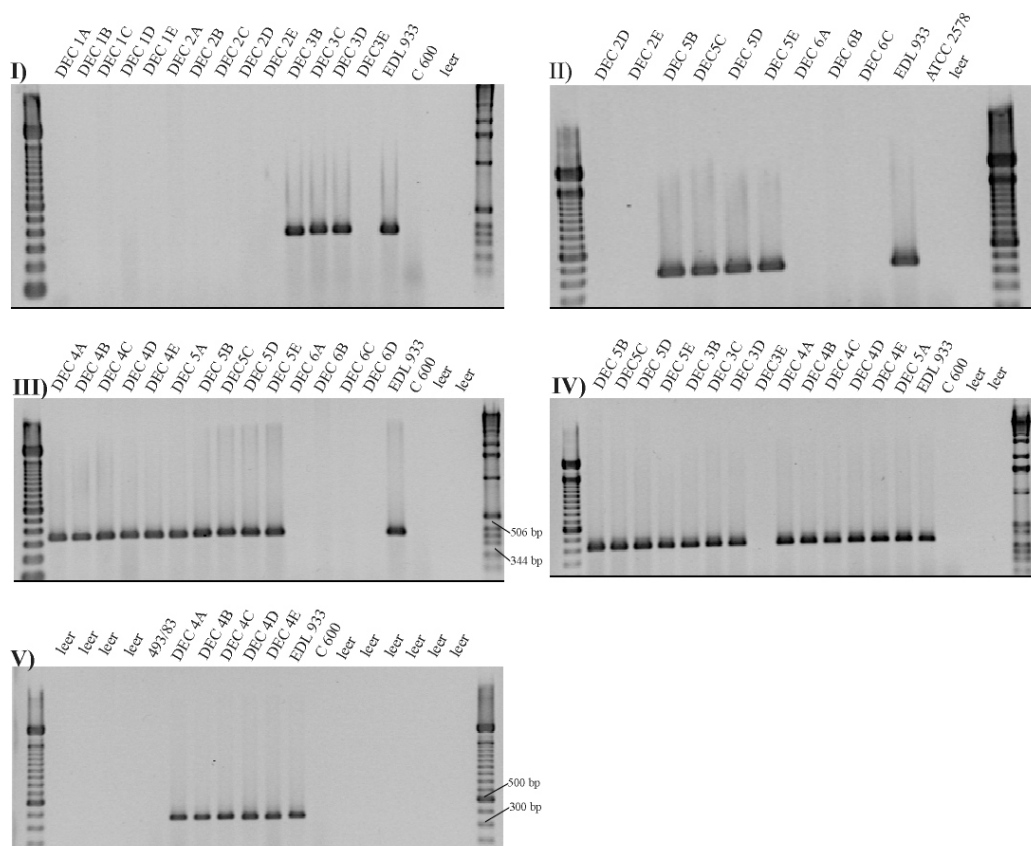


Bild I: OI 09 mit Primerpaar OI09fwd und OI09rev
 Bild II: OI 28 mit Primerpaar OI28fwd und OI28rev
 Bild III: OI 130 mit Primerpaar OI130fwd und OI130rev
 Bild IV: OI 154 mit Primerpaar OI1543fwd und OI1543rev
 Bild V: OI 172 mit Primerpaar OI172fwd und OI172rev

3.3 Übersichtsanalyse Klinische Stämme

Um einen Überblick für die diagnostische Relevanz der untersuchten Gene für die Klinik zu erhalten, wurden die klinischen Stämme und die Stuhlabschwemmungskeime untersucht. Die Ergebnisse bestätigen (Tabelle 6, Seite 21) eine Unspezifität des Genlokus OI 130. Mit Hilfe der PCR-Produkte zum Nachweis der Genabschnitte von OI 09, OI 28 und OI 154 konnten spezifisch die O157 Stämme erkannt werden. Im Unterschied zu diesen Befunden gelang der Nachweis des OI 172 Gens lediglich bei den O157:H7 Stämmen. Die sobitolfermentierenden O157: H⁻ Stämme waren ausschließlich PCR negativ.

Tabelle 7: Verteilung der O-Island Regionen in den klinischen Stämmen

	SF – Stämme O157:H ⁻					nSF Stämme O157:H7				
	0493/ 89	221/ 95	3072/ 96	2584/ 99	0817/ 02	93-36/ 89	Wü365 8/93	439 1/96	1867/ 99	0144 /03
OI 09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OI 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OI 130	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OI 154	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OI 172	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Tabelle 8: Verteilung der O-Island Regionen in den *stx* negativen EHEC Stämmen

Name	Typisierung	OI 09	OI 28	OI 130	OI 154	OI 172
6702/96	O157:H7	+	+	+	+	+
817-36/90	O157: H ⁻	+	+	+	+	-
H629/91	O157: H ⁻	+	+	+	+	-

Tabelle 9: Verteilung der O-Island Regionen in den aus dem Stuhl isolierten Stämmen

	EHEC Positiv						EHEC Negativ		
	E40/001	E40/527	E40/583	E40/753	E40/754	E40/846	E40/1041	E40/1890	E40/1921
OI 09	+	-	-	-	-	-	+	-	-
OI 28	+	-	-	-	-	-	+	-	-
OI 130	+	+	-	+	+	+	+	+	-
OI 154	+	-	-	-	-	-	+	-	-
OI172	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Test PCR	<i>stx1</i> + <i>stx2</i> + <i>eae</i> +	<i>stx1</i> + <i>eae</i> +	<i>stx1</i> + <i>eae</i> -	<i>stx1</i> + <i>stx2</i> + <i>eae</i> -	<i>stx2</i> + <i>eae</i> -	<i>stx2</i> + <i>eae</i> -	<i>stx2</i> + <i>eae</i> +	entfällt	entfällt
O157	+	non	non	non	non	non	+ (Sorbitol ferm.)		

4. Diskussion

Der *E. coli* O157:H7 repräsentiert den Prototypen der enterohämorrhagischen *E. coli* [74] und ist weltweit mit den meisten HUS – Ausbrüchen assoziiert. Somit besteht großes Interesse darin, seine Evolution zu klären. Mit Hilfe ausreichender Kenntnisse der genomischen Struktur des O157:H7 bzw. der anderen EHEC Stämme wäre es dann möglich eine phänotypische Schnelltestung zu entwickeln, die die bisher aufwendige und zeitintensive klinische Diagnostik enorm vereinfachen würde.

4.1 Evolutionsspezifische Beurteilung der O-Islands

Seit der Komplettssequenzierung des EDL 933 EHEC Bakteriums durch Perna et al. [51] ist der Sequenzvergleich mit dem C600 *E. coli* Stamm möglich. Die anhand der Aminosäurefolgeunterschiede bestimmten additiven DNA-Regionen, die O-Islands, stellen somit sicherlich eine gute Grundlage zur Suche nach spezifischen Genen dar (siehe auch Abbildung I, Seite 20). Insgesamt existieren 177 O-Islands. Von ca. 33% dieser Gene ist die Funktion unbekannt und bei den meisten anderen wurde eine Funktion durch Homologie mit bekannten Virulenzfaktoren vermutet. Jedoch ist ihre Pathogenität nicht bewiesen.

Meine Ergebnisse ermöglichen nun durch das Screening der ECOR- und DEC- Stämme die Erstellung eines Verteilungsmusters innerhalb des *E. coli* bzw. EHEC Genpools.

Das sehr unspezifische Verteilungsmuster der OI 28 und der OI 130 zeigt hierbei, dass diese Genabschnitte in sämtlichen *E. coli* Bakterien vorkommen können und somit für eine klinische oder evolutionstheoretische Analyse nicht verwendet werden können. Dadurch dass beide O-Islands trotz der unregelmäßigen Gesamtaufteilung innerhalb der Bakterienstämme in allen O157:H7 und O55:H7 Stämmen enthalten sind, kann das junge phylogenetische Zusammenhängen dieser Bakterien hervorgehoben werden.

Die OI 09 zeigt eine wichtige Verbindung zu bereits entwickelten Evolutionsmodellen. Nach Fengs Stufenmodell von 1998 [19] existiert eine Evolutionsstufenreihe vom ECOR-37 über die EPEC Stämme O55:H7 zum O157:H7. Ebenfalls der vom O157:H7

abstammende Sorbitol fermentierende O157: H⁻ EHEC Stamm gehört in diesen Entwicklungsstrang. Die spezifische Verteilung der O-Island 09 untermauert diese These.

Außer dem DEC 4E Stamm, welcher bei keinem der PCR Läufe positiv war und dessen Ergebnis somit durch einen eventuellen labortechnischen Fehler durchweg negativ ist, bestätigen alle Ergebnisse die Stufenpyramide nach Feng et al.

Im Hinblick auf die Phylogenie bestätigen die Ergebnisse des Stammscreenings im Bezug auf die O-Island 154 ebenso wie die OI 09 die Entwicklungstheorie nach Feng et al. Eine enge Verwandtschaft zwischen dem EHEC Stamm O157:H7 und dem EPEC Stamm O55:H7 und deren vermuteten Vorfahr ECOR37 lässt sich annehmen.

Der O-Island 172 schließlich kommt eine besondere Bedeutung zu. Ihr Vorhandensein beschränkt sich in der DEC-Reihe auf die O157:H7 Stämme und den DEC 5 E, ein O55:H7 EPEC Bakterium. Da der in der DEC Serie enthaltene O157:H⁻ Stamm negativ auf dieses Target und auch alle klinischen O157:H⁻ Stämme negativ getestet wurden, wurde die Blind-PCR-Reihe aus den Stuhlabschwemmungen durchgeführt. Bei dieser konnte erwartungsgemäß eine Differenzierung zwischen einem O157:H7 und einem O157:H⁻ EHEC erfolgen.

Das Vorhandensein von OI 172 lässt somit generell die Existenz eines O157:H7 Bakteriums und das Nicht-Vorliegen eines H⁻ Stammes vermuten. Um es als Beweis etablieren zu können, sind sicherlich noch weitere Untersuchungen vonnöten. Für einen möglichen Evolutionsstammbaum der O157:H7 Bakterien ermöglichen diese Ergebnisse allerdings ganz neue Diskussionsansätze. Nach dem Modell von Feng et al. und dessen Modifikationen hat sich der O157:H7 aus dem EPEC Stamm O55:H7 entwickelt. Im Rahmen der Entstehung des O157: H⁻ verlor der *E. coli* Stamm seine Motilität. Gleichzeitig fand möglicherweise auch der Verlust des genetischen Materials der OI 172 statt. Im Hinblick auf die klinische Bedeutung der Verlustes von OI 172 (siehe Abschnitt 4.2.5. Abbildung IV) verdeutlicht eine Einbeziehung dieser Ergebnisse mit der Theorie von Feng et al.

Ein weiterer phylogenetisch interessanter Punkt ist das Vorhandensein der OI 172 in dem EPEC Stamm O55:H7, DEC 5E. Es sind 2 Möglichkeiten zur Erklärung dieses Ergebnisses möglich. Zum einen könnte der Stamm einen „missing link“ zwischen den

O55:H7 Vorfahren und dem O157:H7 Vorfahren bilden. Um diese Theorie abzusichern, müssten allerdings mehrere weitere Vergleichsuntersuchungen durchgeführt werden. Zum anderen ist es möglich, dass die O-Island 172 in einer Region mit hoher Mobilität liegt und es somit vermehrt zu mehrzeitigen Geneintritten und -austritten kommt. Auch zur Bestätigung dieser Theorie wäre eine umfassende Genanalyse der umliegenden Genregionen nötig.

4.2 Klinische Beurteilung der O-Island Analyseergebnisse

Es existieren verschiedene Pathogenitätsfaktoren der *E. coli* Bakterien. Eine Erforschung dieser Faktoren auch auf genetischer Ebene würde nicht nur eine enorme Erleichterung beim Verständnis der Pathomechanismen z.B. der EHEC Bakterien liefern, sondern auch eine klinische Testung vereinfachen und beschleunigen.

Die erste in dieser Arbeit kodierte Genregion, O-Island 09, ist verantwortlich für die Bildung eines Porinregulators. Auch wenn zu diesem speziellen Genabschnitt zum derzeitigen Punkt der Forschung noch keine weiteren Erkenntnisse vorhanden sind, ist es allgemein akzeptiert, dass solche Regulatoren eine wichtige pathogene Bedeutung haben können.

So sind zum Beispiel das Zweikomponentensystem gebildet durch die Produkte der Genregionen OmpR (der Regulator) und EnvZ (der Sensor) wichtig für die Osmolaritätskontrolle der *E. coli* Bakterien [76, 20, 65]. Um die Bedeutung des Produktes von O-Island 09 für die O55:H7 und O157:H7 Bakterien einschätzen zu können, sind allerdings noch weitere Analysen notwendig.

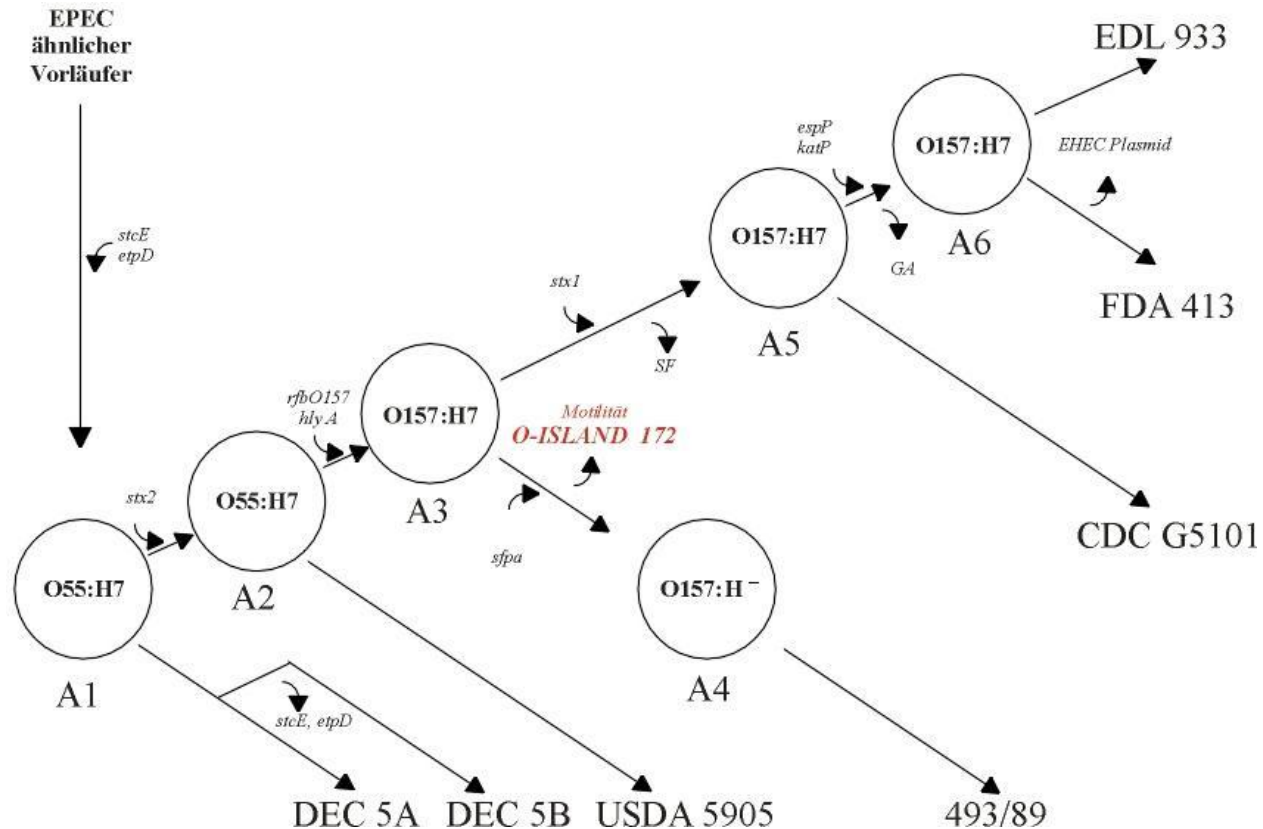


Abbildung III: Evolutionsmodell des EHEC Bakteriums O157:H7, modifiziert nach Feng et al. (1998), Lathem (2003) und Friedrich (2004). Erweitert um die Theorie dieser Arbeit.

Radienpfeile zeigen den Erwerb bzw. den Verlust von Eigenschaften (gemischt geno- und phänotypisch). Die Stämme am Ende der geraden Pfeile stellen für diese Gruppe repräsentative Stämme dar.

GA: β -Glucuronidaseaktivität;

SF: Sorbitol Fermentation;

A1 bis A6: von Feng et al. beschriebene Urstämme

Die O-Island 28 codiert für das RTX Toxin der *E. coli* Bakterien. Auch wenn anhand der rein genotypischen Analyse keine Aussagen über die Phänotypie der einzelnen Stämme bezüglich des RTX Toxins bestehen, kann man sehen, dass es sich hierbei höchst wahrscheinlich nicht um ein Toxin handelt, welches ausschließlich in pathogenen *E. coli* Bakterien vorkommt. Um weitere Erkenntnisse über seine Pathogenität zu gewinnen, wäre eine phänotypische Expressions- und Wirkungsanalyse möglich.

Über das Genprodukt der O-Island 130 finden sich außer der Vermutung, dass es sich um ein Bakterioferritin handelt, kaum Forschungsergebnisse [51]. Dass Bakterioferritin und anderen Eisen enthaltende Proteine für die *E. coli* Funktion wichtig sind, ist allerdings hinreichend bekannt [31], [89]. Über eine mögliche Pathogenität lässt sich keine Aussage machen.

Mehrere O-Islands innerhalb des EDL 933 Genoms enthalten mögliche Synthesoperons für Fimbrien. Unter anderem gibt es Regionen, denen die Kodierung für LPF (long polar fimbria) zugeschrieben wird. Die O-Island 154 gehört zu diesen Regionen. Des Weiteren werden bei dem O157:H7 Stamm als Lokalisation eines lpf – Gen die O-Island 141 und bei O113 Stämmen der Chromosomenlokus lpf113 genannt [16, 80, 79].

Dem LPF verwandte Typ I Fimbrien wurden erstmals in *Salmonella enterica* serovar *Thyphimurium* gefunden [2]. Diese Fimbrien bilden ausgehend von den Polen der Bakterien 7 bis 8 nm breite und 2 -10 um lange Oberflächenstrukturen und sind mit der Adhäsion an verschiedene Gewebe und Organe, z.B. die Payer Plagues, assoziiert [3]. Auch spielen die LPF eine wichtige Rolle bei der Erlangung von Kreuzimmunitäten der Salmonellen [53].

Im Gegensatz zu der bewiesenen Bedeutung der LPF in Salmonellen ist die Pathogenität in EHEC Bakterien noch nicht geklärt. Jedoch erlaubt die Verteilung des Teils, welcher in der OI 154 verschlüsselt ist, eine Vermutung auf Pathogenität.

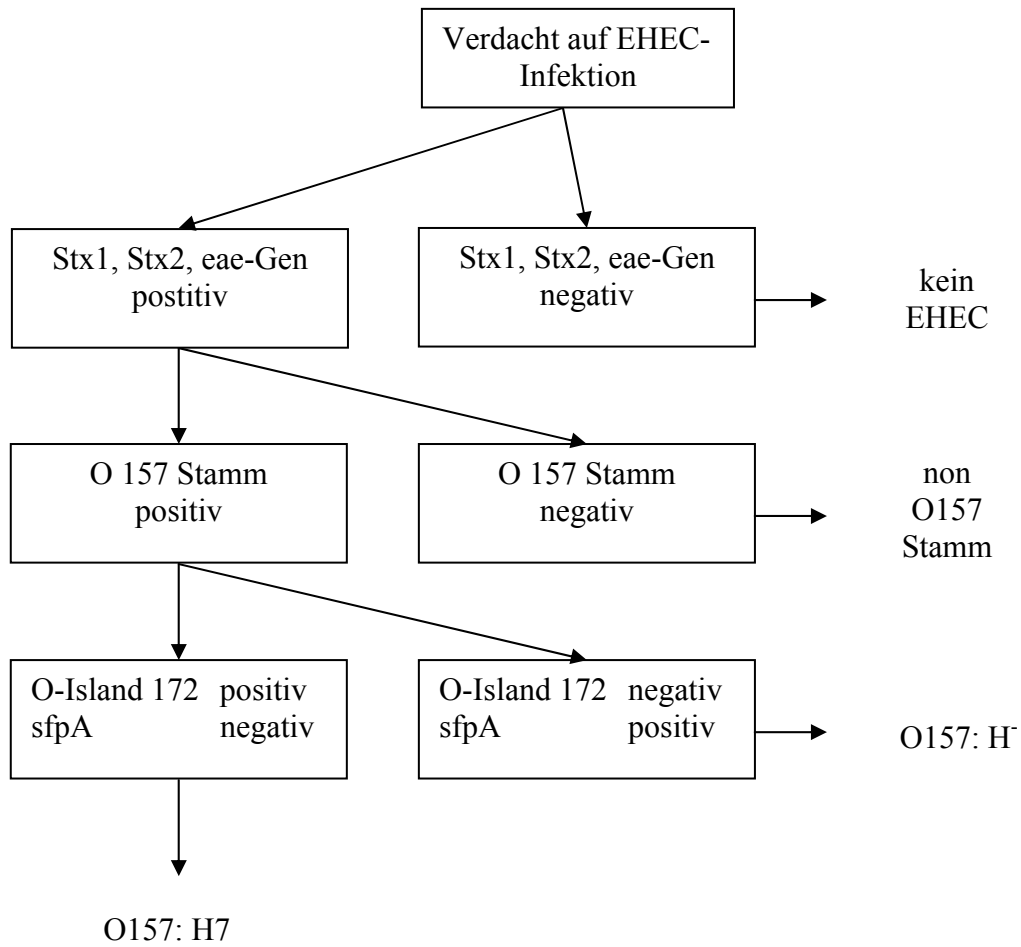
Hinzu kommt, dass es laut der neueren Ergebnisse von Escobar-Páramo et al. [18] eine phylogenetische Einteilung der *E. coli* Bakterien in 6 Gruppen (A, B1, C, E, D und B2) gibt. Der beschriebene Zusammenhang von Phylogenie und Virulenz bei

extraintestinalen Infektionen [7] könnte des weiteren eine Verbindung der Gene in Gruppe D, welche mit den akute Diarhoe auslösenden Stämmen und somit auch den stx positiven EHEC Stämmen in Verbindung stehen [18], mit Virulenzeigenschaften bedeuten. In dieser Phylogenie-Virulenzkette könnte auch die O-Island 154 eine wichtige Rolle spielen. Um allerdings genauere Aussagen hierzu machen zu können, wäre ein weiteres Screening der DEC und ECOR Sammlungen auf die anderen drei LPF Anteile und anschließend eine phänotypische Analyse notwendig.

Die O-Island 172 verschlüsselt den Proteinaufbau einer Helicase. Die genaue Bedeutung dieses Proteins ist zwar noch nicht geklärt, doch die Bedeutung einer Helicase für das *E. coli* Bakterium sowohl im Hinblick auf Replikation als auch für die Reparatur der Erbgutes sind hinlänglich beschrieben und Gegenstand der aktuellen Forschung [15, 10].

Da die Ergebnisse meiner Arbeit vermuten lassen, dass es bei der Entstehung des O157: H ein Verlust der OI 172 aufgetreten ist, muss man sich fragen, welchen Vorteil ein Besitz des Gens für die Helicase bietet. Um eine Antwort auf die Frage zu finden, wäre es sinnvoll eine Expressionsanalyse bezüglich des Genproduktes durchzuführen.

Im Hinblick auf die Diagnostik von EHEC Bakterien bieten die Ergebnisse ebenfalls neue Möglichkeiten. Im Rahmen der in Abschnitt 1.8 beschriebenen Diagnostikreihe nach Friedrich et al. [21] findet als dritter Schritt eine genaue Typisierung des Bakteriums statt. Eine PCR auf das Gen der OI 172 könnte einen Platz finden, indem es zwischen einem O157:H7 und einem O157: H Stamm differenziert. Ein mögliches Schema für die Diagnostikkette siehe Abbildung IV.

Abbildung IV: Stufenschema zur differenzierten O 157 Diagnostik

5. Zusammenfassung

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind weltweit eine bekannte Ursache für Diarrhoe und der häufigste Grund für das besonders für Kinder gefährliche hämolytisch-urämische Syndrom (HUS). Hierbei ist besonders der Serotyp O157:H7 von großer Bedeutung. Zusätzlich sind mittlerweile bis zu 20% der HUS-assoziierten EHEC in Deutschland durch Sorbitol-fermentierende (SF) EHEC O157:H⁻ verursacht. Die frühzeitige stationäre Versorgung ist für die Prognose der Erkrankung von größter Bedeutung und in diesem Rahmen ist es wichtig, eine schnelle und spezifische mikrobiologische Diagnostik bei Vorliegen einer Infektion zu ermöglichen.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit werden spezifische molekularbiologische Marker für die Virulenz von *Escherichia coli* und die Differenzierung zwischen EHEC O157:H7 und O157:H⁻ ermöglicht. Anhand von Gendatenbanken wurden 5 spezifische Genabschnitte, sogenannte O-Islands (OI 09, OI 28, OI 130, OI 154 und OI 172) ausgewählt und ihr Vorhandensein in repräsentativen *E. coli* Stämmen untersucht.

Während sich bei den OI 28 und OI 130 ein sehr variables Verteilungsbild innerhalb der *E. coli* Population zeigte, erbrachten OI 09 und OI 154 ein fast ausschließliches Auftreten in den Serotypen O55:H7, O157:H7 und O157:H⁻. Der Genabschnitt OI 172 konnte vorwiegend in O157:H7 Stämmen gefunden werden. Durch den fehlenden Nachweis in O157:H⁻ Stämmen konnte mit OI 172 eine Unterscheidung zwischen EHEC O157:H7 und den SF EHEC O157:H⁻ Stämmen erfolgen.

Die vorliegenden Daten fügen sich in das bekannte Evolutionsmodell von EHEC O157. Mit Hilfe des Genabschnitts OI 172 lässt sich dieses Modell sogar um wichtige genomische Ereignisse, die den Serotypen O157:H⁻ betreffen, erweitern.

Auch im Hinblick auf die klinische Bedeutung einiger Genregionen lassen die Ergebnisse Rückschlüsse zu. Die Gene der O-Islands sind assoziiert mit schwerem Krankheitsbild und Virulenz.

Eine Erleichterung für die diagnostische Differenzierung von EHEC Infektionen erbringt das Gen der O-Island 172. Es ermöglicht eine Differenzierung zwischen O157:H7 und dem hochpathogenen SF EHEC O157:H⁻.

In the whole world the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are a common reason for diarrhoea and for the haemorrhagic uraemic syndrome (HUS). Because of this it is especially dangerous for children. In causing this syndrome the O157:H7 serovar is the most important one. In addition today 20% of HUS-associated EHEC in Germany are caused by SF EHEC O157:H⁻. In order to improve the patients' health and early support, it is extremely necessary to offer a fast and detailed diagnosis of an infection.

By the help of this work specific molecular-genetic virulence markers are found that allow to separate EHEC O157:H7 and O157:H⁻. 5 possible so called O-Islands (OI 09, OI 28, OI 130, OI 154 and OI 172) could be checked by means of genetical databases and their existence was analysed in representative *E. coli* strains.

While the OI 28 and OI 130 showed a variable distribution in the *E. coli* population, the other DNA target regions OI 09 and OI 154 were only found in O55:H7, O157:H7 and in O157:H⁻ serovars. OI 172' gene could predominantly be proved in O157:H7 strains. A widened search discovered a differentiation between EHEC O157:H7 and SF EHEC O157:H⁻ strains by the help of the OI 172 because of the non existence of OI 172 in SF EHEC O157:H⁻ strains.

The present work concerning the phylogenie could confirm the existing evolution-scheme. By the support of the OI 172 gene, you can even expand this scheme with important genomic changes in the evolution of the O157:H⁻.

It is also possible to draw conclusions from the results concerning the clinical meaning of some gene regions. The OI gens are associated with virulence of the bacteria.

The gene of the O-island 172 could facilitate the diagnostic differentiation of EHEC infections. This could enable a distinction between a O157:H7 strain and the SF EHEC O157:H⁻.

6. Literaturverzeichnis

- [1] **Bales S, Schnitzler N** . "Neues Infektionsschutzgesetz. Melde- und Aufzeichnungspflicht für Krankheiten und Krankheitserreger." *Deutsches Ärzteblatt*, 2000, 97(A), pp. 3501.
- [2] **Baumler, A. J. and Heffron, F.** "Identification and sequence analysis of lpfABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol*, 1995, 177(8), pp. 2087-97.
- [3] **Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S. and Heffron, F.** "The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse." *Infect Immun*, 1996, 64(1), pp. 61-8.
- [4] **Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J. and Wells, J. G.** "A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 - associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience." *JAMA*, 1994, 272(17), pp. 1349-53.
- [5] **Besser, R. E., Griffin, P. M. and Slutsker, L.** "*Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease." *Annu Rev Med*, 1999, 50pp. 355-67.
- [6] **Bitzan, M. M., Wang, Y., Lin, J. and Marsden, P. A.** "Verotoxin and ricin have novel effects on preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (ecNOS) expression and NO production in vascular endothelium." *J Clin Invest*, 1998, 101(2), pp. 372-82.
- [7] **Branger, Catherine, Zamfir, Oana, Geoffroy, Sabine, Laurans, Genevieve, Arlet, Guillaume, Thien, Hoang Vu, Gouriou, Stephanie, Picard, Bertrand and Denamur, Erick.** "Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type." *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(1), pp. 54-61.
- [8] **Brunder, W., Khan, A. S., Hacker, J. and Karch, H.** "Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H." *Infect Immun*, 2001, 69(7), pp. 4447-57.

- [9] **Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H.** "KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Microbiology*, 1996, 142 (Pt 11)pp. 3305-15.
- [10] **Cadman, Chris J. and McGlynn, Peter.** "PriA helicase and SSB interact physically and functionally." *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(21), pp. 6378-87.
- [11] **Clarke, S. C.** "Diarrhoeagenic *Escherichia coli*--an emerging problem?" *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2001, 41(3), pp. 93-8.
- [12] **Cowden, J. M. and Christie, P.** "Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157." *Health Bull (Edinb)*, 1997, 55(1), pp. 9-10.
- [13] **Crump, John A., Sulka, Alana C., Langer, Adam J., Schaben, Chad, Crielly, Anita S., Gage, Robert, Baysinger, Michael, Moll, Maria, Withers, Gisela, Toney, Denise M., Hunter, Susan B., Hoekstra, R. Michael, Wong, Stephanie K., Griffin, Patricia M. and Van Gi, .** "An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm." *N Engl J Med*, 2002, 347(8), pp. 555-60.
- [14] **Davidson, Geoffrey, Barnes, Graeme, Bass, Dorsey, Cohen, Mitchell, Fasano, Alessio, Fontaine, Olivier and Guandalini, Stefano.** "Infectious diarrhea in children: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002, 35 Suppl 2pp. S143-50.
- [15] **Dermic, D., Halupecki, E., Zahradka, D. and Petranovic, M.** "RecBCD enzyme overproduction impairs DNA repair and homologous recombination in *Escherichia coli*." *Res Microbiol*, 2005, 156(3), pp. 304-311.
- [16] **Doughty, Stephen, Sloan, Joan, Bennett-Wood, Vicki, Robertson, Marcus, Robins-Browne, Roy M. and Hartland, Elizabeth L.** "Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Infect Immun*, 2002, 70(12), pp. 6761-9.
- [17] **Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K. and Hutchinson, S. J.** "The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients." *Clin Infect Dis*, 2001, 33(7), pp. 923-31.

- [18] **Escobar-Paramo, Patricia, Grenet, Karine, Le Menac'h, Arnaud, Rode, Luc, Salgado, Emmanuelle, Amorin, Christine, Gouriou, Stephanie, Picard, Bertrand, Rahimy, Mohamed Cherif, Andreumont, Antoine, Denamur, Erick and Ruimy, Raymond.** "Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates." *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(9), pp. 5698-700.
- [19] **Feng, P., Lampel, K. A., Karch, H. and Whittam, T. S.** "Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7." *J Infect Dis*, 1998, 177(6), pp. 1750-3.
- [20] **Ferrario, M., Ernsting, B. R., Borst, D. W., Wiese, D. E. 2nd, Blumenthal, R. M. and Matthews, R. G.** "The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*." *J Bacteriol*, 1995, 177(1), pp. 103-13.
- [21] **Friedrich A, Bielaszewska M, Karch H.** "Diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections." *J Lab Med*, 2002, 26pp. 183-190.
- [22] **Friedrich, Alexander W., Bielaszewska, Martina, Zhang, Wen-Lan, Pulz, Matthias, Kuczius, Thorsten, Ammon, Andrea and Karch, Helge.** "*Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms." *J Infect Dis*, 2002, 185(1), pp. 74-84.
- [23] **Friedrich, Alexander W., Nierhoff, Katja V., Bielaszewska, Martina, Mellmann, Alexander and Karch, Helge.** "Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H" *J Clin Microbiol*, 2004, 42(10), pp. 4697-701.
- [24] **Fukushima, H., Hashizume, T., Morita, Y., Tanaka, J., Azuma, K., Mizumoto, Y., Kaneno, M., Matsuura, M., Konma, K. and Kitani, T.** "Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996." *Pediatr Int*, 1999, 41(2), pp. 213-7.

- [25] **Garg, Amit X., Suri, Rita S., Barrowman, Nick, Rehman, Faisal, Matsell, Doug, Rosas-Arellano, M. Patricia, Salvadori, Marina, Haynes, R. Brian and Clark, William F.** "Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression." *JAMA*, 2003, 290(10), pp. 1360-70.
- [26] **Gerber, Angela, Karch, Helge, Allerberger, Franz, Verweyen, Hege M. and Zimmerhackl, Lothar B.** "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*, 2002, 186(4), pp. 493-500.
- [27] **Gruenheid, Samantha, Sekirov, Inna, Thomas, Nikhil A., Deng, Wanyin, O'Donnell, Paul, Goode, David, Li, Yuling, Frey, Elizabeth A., Brown, Nathaniel F., Metalnikov, Pavel, Pawson, Tony, Ashman, Keith and Finlay, B. Brett.** "Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Mol Microbiol*, 2004, 51(5), pp. 1233-49.
- [28] **Himmel, M. E., Yates, M. D., Lauerman, L. H. and Squire, P. G.** "Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*." *Am J Vet Res*, 1982, 43(5), pp. 764-7.
- [29] **Isogai, E., Isogai, H., Hayashi, S., Kubota, T., Kimura, K., Fujii, N., Ohtani, T. and Sato, K.** "Effect of antibiotics, levofloxacin and fosfomycin, on a mouse model with *Escherichia coli* O157 infection." *Microbiol Immunol*, 2000, 44(2), pp. 89-95.
- [30] **Janka, Andreas, Bielaszewska, Martina, Dobrindt, Ulrich, Greune, Lilo, Schmidt, M. Alexander and Karch, Helge.** "Cytotoxic distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ and O157:H7: characterization and evolutionary considerations." *Infect Immun*, 2003, 71(6), pp. 3634-8.
- [31] **Jung, Y., Kwak, J. and Lee, Y.** "High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(2), pp. 187-91.

- [32] **Karch, H. and Kohler, B.** "Neue Erkenntnisse zur Molekularbiologie der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157." *Gesundheitswesen*, 1999, 61 Spec No 1pp. S46-51.
- [33] **Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M. and Schmidt, H.** "Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections." *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 34(3), pp. 229-43.
- [34] **Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S. and Datz, M.** "Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture." *J Clin Microbiol*, 1996, 34(3), pp. 516-9.
- [35] **Kaye, S. A., Louise, C. B., Boyd, B., Lingwood, C. A. and Obrig, T. G.** "Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro." *Infect Immun*, 1993, 61(9), pp. 3886-91.
- [36] **Kosek, Margaret, Bern, Caryn and Guerrant, Richard L.** "The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000." *Bull World Health Organ*, 2003, 81(3), pp. 197-204.
- [37] **Koyange, Louis, Ollivier, Gaelle, Muyembe, Jean-Jacques, Kebela, Benoit, Gouali, Malika and Germani, Yves.** "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Kinshasa." *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(5), pp. 968-9.
- [38] **Lathem, Wyndham W., Bergsbaken, Tessa and Welch, Rodney A.** "Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7." *J Exp Med*, 2004, 199(8), pp. 1077-87.
- [39] **Lathem, Wyndham W., Bergsbaken, Tessa, Witowski, Sarah E., Perna, Nicole T. and Welch, Rodney A.** "Acquisition of stcE, a C1 esterase inhibitor-specific metalloprotease, during the evolution of *Escherichia coli* O157:H7." *J Infect Dis*, 2003, 187(12), pp. 1907-14.
- [40] **Lathem, Wyndham W., Gryns, Thomas E., Witowski, Sarah E., Torres, Alfredo G., Kaper, James B., Tarr, Phillip I. and Welch, Rodney A.** "StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor." *Mol Microbiol*, 2002, 45(2), pp. 277-88.

- [41] **Leung, P. H. M., Peiris, J. S. M., Ng, W. W. S., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A. and Yam, W. C.** "A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12), pp. 7549-53.
- [42] **Lin, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N. and Foster, J. W.** "Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(9), pp. 3094-100.
- [43] **March, S. B. and Ratnam, S.** "Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis." *J Clin Microbiol*, 1986, 23(5), pp. 869-72.
- [44] **Matussek, Andreas, Lauber, Joerg, Bergau, Anna, Hansen, Wiebke, Rohde, Manfred, Dittmar, Kurt E. J., Gunzer, Matthias, Mengel, Michael, Gatzlaff, Patricia, Hartmann, Maike, Buer, Jan and Gunzer, Florian.** "Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells." *Blood*, 2003, 102(4), pp. 1323-32.
- [45] **McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. and Kaper, J. B.** "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(5), pp. 1664-8.
- [46] **Mead, P. S. and Griffin, P. M.** "*Escherichia coli* O157:H7." *Lancet*, 1998, 352(9135), pp. 1207-12.
- [47] **Morabito, S., Karch, H., Schmidt, H., Minelli, F., Mariani-Kurkdjian, P., Allerberger, F., Bettelheim, K. A. and Caprioli, A.** "Molecular characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serogroup O111 from different countries." *J Med Microbiol*, 1999, 48(10), pp. 891-6.
- [48] **Morabito, Stefano, Tozzoli, Rosangela, Oswald, Eric and Caprioli, Alfredo.** "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*, 2003, 71(6), pp. 3343-8.
- [49] **Morigi, M., Galbusera, M., Binda, E., Imberti, B., Gastoldi, S., Remuzzi, A., Zoja, C. and Remuzzi, G.** "Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress." *Blood*, 2001, 98(6), pp. 1828-35.

- [50] **Mülhardt C.** *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics, Spektrum, Heidelberg* ., 2003.
- [51] **Nataro, J. P. and Kaper, J. B.** "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(1), pp. 142-201.
- [52] **Nishikawa, Yoshikazu, Zhou, Zhijiang, Hase, Atsushi, Ogasawara, Jun, Kitase, Teruyo, Abe, Niichiro, Nakamura, Hiromi, Wada, Takayuki, Ishii, Eiji and Haruki, Kosuke.** "Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E.coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E.coli*." *Jpn J Infect Dis*, 2002, 55(6), pp. 183-90.
- [53] **Norris, T. L. and Baumler, A. J.** "Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(23), pp. 13393-8.
- [54] **O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A. A. and Keusch, G. T.** "Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 180pp. 65-94.
- [55] **Ochoa, Theresa J. and Cleary, Thomas G.** "Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157." *Curr Opin Infect Dis*, 2003, 16(3), pp. 259-63.
- [56] **Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D. and Lauwers, S.** "Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates." *J Clin Microbiol*, 1998, 36(11), pp. 3317-22.
- [57] **Prager R, Reissbrodt R, Holler H, Gericke B, Aleksic S, Claus H, Wagner H, Tschäpe H.** "Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E.coli* -Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie." *Bundesgesundheitsblatt*, 1998, (41), pp. 6-9.
- [58] **Prager, Rita, Liesegang, Almut, Voigt, W., Rabsch, W., Fruth, Angelika and Tschape, H.** "Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H(-) in Germany." *Infect Genet Evol*, 2002, 1(4), pp. 265-75.

- [59] **Proulx, F., Seidman, E. G. and Karpman, D.** "Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome." *Pediatr Res*, 2001, 50(2), pp. 163-71.
- [60] **Richards, Anna, Goodship, Judith A. and Goodship, Timothy H. J.** "The genetics and pathogenesis of haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura." *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002, 11(4), pp. 431-5.
- [61] **Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L.** "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype." *N Engl J Med*, 1983, 308(12), pp. 681-5.
- [62] **Rivero, Mariana A., Padola, Nora L., Etcheverria, Analia I. and Parma, Alberto E.** "*Escherichia coli* enterohemorrhagica y síndrome uremico hemolítico en Argentina." *Medicina (B Aires)*, 2004, 64(4), pp. 352-6.
- [63] **Robert Koch Institut** . "Risikofaktoren für sporadische STEC-Infektionen: Empfehlungen für die Prävention Epidemiol Bul 2005(1): 1-3." 2005,.
- [64] **Robert Koch Institut**. "Ratgeber Infektionskrankheiten, 2001, 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) <http://www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM?/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM&1> (aufgerufen 8/2004)."
- [65] **Rowbury, R. J., Lazim, Z. and Goodson, M.** "Regulatory aspects of alkali tolerance induction in *Escherichia coli*." *Lett Appl Microbiol*, 1996, 22(6), pp. 429-32.
- [66] **Safdar, Nasia, Said, Adnan, Gangnon, Ronald E. and Maki, Dennis G.** "Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis." *JAMA*, 2002, 288(8), pp. 996-1001.
- [67] **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(12), pp. 5463-7.
- [68] **Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H.** "Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933." *Infect Immun*, 1995, 63(3), pp. 1055-61.

- [69] **Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H. and Karch, H.** "A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons." *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(3), pp. 1205-8.
- [70] **Schmitt, C. K., McKee, M. L. and O'Brien, A. D.** "Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511." *Infect Immun*, 1991, 59(3), pp. 1065-73.
- [71] **Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. and Bhakdi, S.** "Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function." *Infect Immun*, 1990, 58(11), pp. 3796-801.
- [72] **Swerdlow, D. L., Woodruff, B. A., Brady, R. C., Griffin, P. M., Tippen, S., Donnell, H. D. Jr, Geldreich, E., Payne, B. J., Meyer, A. Jr and Wells, J. G.** "A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death." *Ann Intern Med*, 1992, 117(10), pp. 812-9.
- [73] **Tarr, Cheryl L., Large, Teresa M., Moeller, Chris L., Lacher, David W., Tarr, Phillip I., Acheson, David W. and Whittam, Thomas S.** "Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*." *Infect Immun*, 2002, 70(12), pp. 6853-9.
- [74] **Tarr, P. I.** "*Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection." *Clin Infect Dis*, 1995, 20(1), pp. 1-8; quiz 9-10.
- [75] **Tarr, Phillip I., Watkins, Sandra L. and Neill, Marguerite A.** "Risk of hemolytic uremic syndrome from antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 colitis." *JAMA*, 2002, 288(24), pp. 3111-2; author reply 3112.
- [76] **Thomas, A. D. and Booth, I. R.** "The regulation of expression of the porin gene ompC by acid pH." *J Gen Microbiol*, 1992, 138(9), pp. 1829-35.
- [77] **Thorpe, C. M., Smith, W. E., Hurley, B. P. and Acheson, D. W.** "Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression." *Infect Immun*, 2001, 69(10), pp. 6140-7.

- [78] **Tilden, J. Jr, Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B., Hollingsworth, J. and Morris, J. G. Jr.** "A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami." *Am J Public Health*, 1996, 86(8 Pt 1), pp. 1142-5.
- [79] **Torres, Alfredo G., Giron, Jorge A., Perna, Nicole T., Burland, Valerie, Blattner, Fred R., Avelino-Flores, Fabiola and Kaper, James B.** "Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." *Infect Immun*, 2002, 70(10), pp. 5416-27.
- [80] **Torres, Alfredo G., Kanack, Kristen J., Tutt, Christopher B., Popov, Vsevolod and Kaper, James B.** "Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E.coli* strains." *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 238(2), pp. 333-44.
- [81] **Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M. P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R. V. and Griffin, P. M.** "Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties." *Epidemiol Infect*, 1999, 122(2), pp. 185-92.
- [82] **Verweyen, H. M., Karch, H., Brandis, M. and Zimmerhackl, L. B.** "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes." *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(1), pp. 73-83.
- [83] **Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Samuel, J. E., Holmes, R. K. and O'Brien, A. D.** "Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine." *J Bacteriol*, 1988, 170(9), pp. 4223-30.
- [84] **Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokolow, R. and Morris, G. K.** "Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype." *J Clin Microbiol*, 1983, 18(3), pp. 512-20.

- [85] **Werber, Dirk, Fruth, Angelika, Liesegang, Almut, Littmann, Martina, Buchholz, Udo, Prager, Rita, Karch, Helge, Breuer, Thomas, Tschape, Helmut and Ammon, Andrea.** "A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance." *J Infect Dis*, 2002, 186(3), pp. 419-22.
- [86] **Whittam, T. S., Wolfe, M. L., Wachsmuth, I. K., Orskov, F., Orskov, I. and Wilson, R. A.** "Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea." *Infect Immun*, 1993, 61(5), pp. 1619-29.
- [87] **Wieler, L. H., Tigges, M., Ebel, F., Schaferkordt, S., Djafari, S., Schlapp, T., Baljer, G. and Chakraborty, T.** "The enterohemolysin phenotype of bovine Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene." *Vet Microbiol*, 1996, 52(1-2), pp. 153-64.
- [88] **World Health Organization .** "New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E.coli* infections. Part II. Wkly Epidemiol Rec 74(14): 105-111." 1999,.
- [89] **Yang, X., Le Brun, N. E., Thomson, A. J., Moore, G. R. and Chasteen, N. D.** "The iron oxidation and hydrolysis chemistry of *Escherichia coli* bacterioferritin." *Biochemistry*, 2000, 39(16), pp. 4915-23.
- [90] **Yoshioka, K., Yagi, K. and Moriguchi, N.** "Clinical features and treatment of children with hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection: experience of an outbreak in Sakai City, 1996." *Pediatr Int*, 1999, 41(2), pp. 223-7.
- [91] **Zhang, Wenlan, Bielaszewska, Martina, Kuczius, Thorsten and Karch, Helge.** "Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans." *J Clin Microbiol*, 2002, 40(4), pp. 1441-6.
- [92] **Ziese, T., Anderson, Y., De, J. o. n. g., B., Lofdahl, S. and Ramberg, M.** "Outbreak of *Escherichia coli* O157 in Sweden." *Euro Surveill*, 1996, 1(1), pp. 2-3.

-
- [93] **Zschock, M., Hamann, H. P., Kloppert, B. and Wolter, W.** "Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties." *Lett Appl Microbiol*, 2000, 31(3), pp. 203-8.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc. No.	accession number
asmp.	asymptomatisch
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CT-SMAC	Cefixim-Tellurit-Sorbitol-McConkey-Agar
D	Diarrhoe
DEC	diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eae	<i>E.coli</i> attachment effacement, Intimin
ECOR	<i>E.coli</i> standard reference
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
E-Hly	EHEC Hämolysin
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EspP	extracellular serine protease, plasmid-encoded
Etp	EHEC type II secretion pathway
fwd	forward
gal	Galaktose
Gb3	Globotriaosylceramid
glu	Glukose
HC	Hämorrhagische Colitis
HPLC	high pressure liquid chromatographie
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMS	Immunmagnetische Separation
IS	Insertionssequenz
KatP	Katalase/Peroxidase

kbp	Kilobasenpaare
LDH	Laktatdehydrogenase
LEE	locus of enterocyte effacement
LM	Lebensmittel
LPS	Lipopolysaccharid
MLEE	Multilocus-Enzym-Elektrophorese
n.b.	nicht bekannt
ND	not determined
NM	non-motile
NSF	nicht Sorbitol fermentierend
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pO157	Plasmid von EHEC O157:H7
pSFO157	Plasmid von SF EHEC O157:H7
REBASE	Restiction Enzyme Database
r.	redone (wiederholt zu einem späteren Zeitpunkt)
rev	reverse
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SF	Sorbitol fermentierend
Sfp	sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded
SMAC	Sorbitol-MacConkey-Agar
StcE	secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga-Toxin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
ToxB	Toxin B
Tris	Trishydroxyethylaminoethan
tRNA	transfer ribonucleic acid
U/min	Umdrehungen pro Minute

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. I:	Vergleich zwischen K-12 chromosomaler DNA und EDL 933 chromosomaler DNA modifiziert nach Perna et al.	20
Abb. II:	Gelelektrophoresebilder mit PCR-Produkten jeweils eines Primerpaars	22
Abb. III:	Evolutionsmodell des EHEC Bakteriums O157:H7 modifiziert nach Feng et al.	28
Abb. IV:	Stufenschema zur differenzierten O 157 Diagnostik.....	31

Tabellen

Tab. 1:	Klinische und epidemiologische Fakten und Virulenzfaktoren verschiedener pathogener <i>E.coli</i> Stämme nach Blaser und Musser	2
Tab. 2:	Primer, die den O-Islands entsprechend entworfen wurden.....	12
Tab. 3:	Verwendete PCR-Bedingungen.....	14
Tab. 4:	Cycler Programme für die Sequenzierung.....	17
Tab. 5:	Homologieprüfung der verwendeten Nukleotidsequenzen	19
Tab. 6:	Merkmalsausprägungen der untersuchten Bakterienstämme	21
Tab. 7:	Verteilung der O-Island Regionen in den klinischen Stämmen	23
Tab. 8:	Verteilung der O-Island Regionen in den <i>stx</i> negativen EHEC Stämmen ...	23
Tab. 9:	Verteilung der O-Island Regionen in den Stuhl isolierten Stämmen	24

9. Lebenslauf

Name: Stefan Strobelt
Anschrift: Franziskusstr. 24, 52428 Jülich
Geburtsdatum: 17.06.1980 in Aachen
Religion: römisch - katholisch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. rer. nat. Günter Strobelt, Studiendirektor
Katharina Strobelt, Oberstudienrätin

Schulaus- 1986 - 1990 GGS Nord, Jülich
bildung 1990 - 1999 Gymnasium Zitadelle Jülich
Juni 1999 Abitur

Zivildienst 1999 - 2000 Rettungsanitäter beim Malteser Hilfsdienst in Jülich

Studium Okt. 2000 - Sept. 2003 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Sept. 2003 - Feb. 2004 Auslandssemester an der Universiteit Utrecht
März 2004 - Nov. 2006 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

September 2002 Ärztliche Vorprüfung
September 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2006 Approbation als Arzt

10. Danksagung

Zum Abschluss möchte ich noch einmal allen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben und ohne die diese niemals in der jetzigen Form hätte fertig gestellt werden können.

Mein erster Dank gilt Herrn PD Dr. Alexander W. Friedrich und Herrn Prof. Dr. H. Karch, nicht nur für die Unterstützung bei der Findung des Themas und der Ermöglichung zur Nutzung der Mittel und Ausstattung des Institutes, sondern im Besonderen für die vielen Anregungen und Denkanstöße, sowie die gute Betreuung während der gesamten Reifung und Entstehung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Ursula Keckevoet und Andrea Lagemann bedanken, die mich bei meiner Arbeit im Labor in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben. Natürlich gilt der Dank auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich meiner Freundin Nike Hoster, meiner Familie und allen Freunden für die Unterstützung und ständige Motivation bei der Entstehung und Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Anhang

Tabelle A: detaillierte Stammauswahl und Ergebnisse der ECOR-Stämme

Nr.	Stamm –Nr. IMT	Isolate	Original	OI 09	OI 28	OI 130	OI 154	OI 172
1	7857	ECOR-01	RM74A	-	-	-	-	-
2	7858	ECOR-02	STM1	-	-	-	-	-
3	7859	ECOR-03	WIR1(a)	-	-	-	-	-
4	7860	ECOR-04	RM39A	-	-	-	-	-
5	7861	ECOR-05	RM60A	-	-	-	-	-
6	7862	ECOR-06	RM66C	-	-	-	-	-
7	7863	ECOR-07	RM73C	-	-	+	-	-
8	7864	ECOR-08	RM77C	-	-	-	-	-
9	7865	ECOR-09	FN98	-	-	-	-	-
10	7866	ECOR-10	ANI	-	-	-	-	-
11	7867	ECOR-11	C97	-	-	-	-	-
12	7745	ECOR-11/A		-	-	-	-	-
13	7868	ECOR-12	FN59	-	-	-	-	-
14	7869	ECOR-13	FN10	-	-	-	-	-
15	7870	ECOR-14	P62	-	-	-	-	-
16	7871	ECOR-15	FN3	-	-	-	-	-
17	7872	ECOR-16	RM191F	-	-	-	-	-
18	7873	ECOR-17	RM200Q	-	-	-	-	+
19	7875	ECOR-18	RM210F	-	-	-	-	-
20	7874	ECOR-18	RM210J	-	-	-	-	-
21	7746	ECOR-19/A		-	-	-	-	-
22	7876	ECOR-20	RM213I	-	-	-	-	-
23	7877	ECOR-21	RM213K	-	-	-	-	-
24	7878	ECOR-22	RM215C	-	-	-	-	-
25	7879	ECOR-23	RM183E	-	-	-	-	-
26	7880	ECOR-24	FN33	+	-	-	-	-
27	7881	ECOR-25	MS1	-	-	-	-	-
28	7882	ECOR-26	LL	-	-	-	-	-
29	7883	ECOR-27	RM24J	-	-	+	-	-
30	7884	ECOR-28	RM52B	-	-	+	-	-
31	7885	ECOR-29	RM3A	-	-	+	-	-
32	7886	ECOR-30	RM10A	-	-	-	-	-
33	7887	ECOR-31	RM12	+	-	-	-	-
34	7888	ECOR-32	RM28	-	-	+	-	-
35	7747	ECOR-32/B		-	-	+	-	-
36	7889	ECOR-33	RM56C	-	-	+	-	-
37	7890	ECOR-34	WIR2(a)	-	-	+	-	-
38	7891	ECOR-35	RM42B	-	-	+	-	-
39	7892	ECOR-36	RM77B	-	-	+	-	-
40	7749	ECOR-36/D		-	-	+	-	-
41	7893	ECOR-37	RM44B	+	+	+	+	-
42	7894	ECOR-38	RM75A	-	-	+	-	-
43	7895	ECOR-39	FN104	-	+	+	-	-
44	7896	ECOR-40	P60	-	+	+	-	-
45	7897	ECOR-41	T44	-	+	+	-	-
46	7898	ECOR-42	DAR1	-	+	+	-	-
47	7899	ECOR-43	FN36	+	+	+	-	+
48	7900	ECOR-44	RM189I	-	+	+	-	-
49	7901	ECOR-45	RM201C	-	+	+	-	-
50	7902	ECOR-46	RM202F	-	+	-	-	-
51	7903	ECOR-47	RM211C	-	+	+	-	-
52	7750	ECOR-48/D	C90	-	+	-	-	-

53	7905	ECOR-49	FN90	-	+	+	-	-
54	7906	ECOR-50	P97	-	+	+	-	-
55	7907	ECOR-51	DD	-	-	-	-	-
56	7908	ECOR-52	RM73A	-	-	-	-	-
57	7751	ECOR-52/B2		-	-	-	-	-
58	7909	ECOR-53	RM33B	-	-	+	-	-
59	7752	ECOR-53/B2		-	-	-	-	-
60	7910	ECOR-54	RM64A	-	-	-	-	-
61	7911	ECOR-55	FN4	-	-	-	-	-
62	7912	ECOR-56	P106	-	-	-	-	-
63	7913	ECOR-57	RM71B	-	-	-	-	-
64	7914	ECOR-58	RM185S	-	-	-	-	-
65	7915	ECOR-59	SIL8	-	-	-	-	-
66	7916	ECOR-60	C89	-	-	-	-	-
67	7917	ECOR-61	FN83	-	-	-	-	-
68	7918	ECOR-62	P69	-	-	-	-	-
69	7919	ECOR-63	FN21	-	-	-	-	-
70	7920	ECOR-64	C70	-	-	-	-	-
71	7921	ECOR-65	RM202I	-	-	-	-	-
72	7922	ECOR-66	RM209I	-	-	-	-	-
73	7923	ECOR-67	RM217T	-	-	+	-	-
74	7924	ECOR-68	RM224H	-	-	+	-	-
75	7748	ECOR-68/B1		-	-	+	-	-
76	7925	ECOR-69	RM45EM	-	-	+	-	-
77	7926	ECOR-70	RM70B	-	-	-	-	-
78	7927	ECOR-71	ABU84	-	-	-	-	-
79	7928	ECOR-72	P68	-	-	-	-	-

Tabelle B: detaillierte Stammauswahl und Ergebnisse der DEC Stämme

Nr.	Isolate	O	H	OI 09	OI 28	OI 130	OI 154	OI 172
1	DEC1a	55	6	-	-	+	-	-
2	DEC1B	55	6	-	-	+	-	-
3	DEC1C	55	6	-	-	+	-	-
4	F563-55	55	6	-	-	-	-	-
5	DEC1E	55	6	-	-	+	-	-
6	DEC2a	55	6	-	-	+	-	-
7	DEC2B	55	6	-	-	+	-	-
8	DEC2C	55	6	-	-	+	-	-
9	DEC2D	55	6	-	-	+	-	-
10	DEC2E	55	6	-	-	+	-	-
11	DEC3A	157	7	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.
12	DEC3B	157	7	+	+	+	+	+
13	DEC3C	157	7	+	+	+	+	+
14	DEC3D	157	7	+	+	+	+	+
15	DEC3E	157	7	-	-	+	-	-
16	493/89	157	-	+	+	+	+	-
17	DEC4A	157	7	+	+	+	+	+
18	DEC4B	157	7	+	-	+	+	+
19	DEC4C	157	7	+	+	+	+	+
20	DEC4D	157	7	+	+	+	+	+
21	DEC4E	157	7	+	+	+	+	+
22	EDL-933	157	7	+	+	+	+	+

23	DEC5A	55	7	+	+	+	+	-
24	DEC5B	55	7	+	+	+	+	-
25	DEC5C	55	7	+	+	+	+	-
26	DEC5D	55	7	+	+	+	+	-
27	DEC5E	55	7	+	+	+	+	+
28	DEC6A	111	21	-	-	-	-	-
29	C142-54	111	12	-	-	-	-	-
30	DEC6C	111	12	-	-	-	-	-
31	F436-51	111	12	-	-	-	-	-
32	DEC6E	111	NM	-	-	-	-	-
33	DEC7A	157	43	-	-	-	-	-
34	DEC7B	149	NM	-	-	-	-	-
35	DEC7C	157	43	-	-	-	-	-
36	DEC7D	157	43	-	-	-	-	-
37	DEC7E	157	NM	-	-	-	-	-
38	DEC8A	111a	NM	-	-	+	-	-
39	DEC8B	111	8	-	-	+	-	-
40	DEC8C	111	NM	-	-	+	-	-
41	DEC8D	111	11	-	-	+	-	-
42	DEC8E	111	8	-	-	+	-	-
43	DEC9A	26	11	-	-	+	-	-
44	DEC9B	26	N	-	-	+	-	-
45	C240-52	26	N	-	-	+	-	-
46	DEC9D	26	11	-	-	+	-	-
47	45	26	11	-	-	+	-	-
48	H30	26	11	-	-	+	-	-
49	DEC10B	26	11	-	-	+	-	-
50	DEC10C	26	11	-	-	+	-	-
51	C12-52	26	11	-	-	+	-	-
52	DEC10E	26	11	-	-	+	-	-
53	RDEC-1	15	NM	-	-	+	-	-
54	DEC11a	128a	2	-	-	+	-	-
55	DEC11B	128a	2	-	-	+	-	-
56	DEC11C	45	2	-	-	+	-	-
57	DEC11D	128	2	-	-	+	-	-
58	DEC11E	128	2	-	-	+	-	-
59	DEC12a	111	2	-	-	+	-	-
60	DEC12B	111	2	-	-	+	-	-
61	DEC12C	111	NM	-	-	+	-	-
62	DEC12D	111	2	-	-	+	-	-
63	DEC12E	111	N	-	-	+	-	-
64	DEC13A	128	7	-	-	+	-	-
65	DEC13B	128	7	-	-	+	-	-
66	DEC13C	128	7	-	-	+	-	-
67	DEC13D	128	7	-	-	+	-	-
68	DEC13E	128	47	-	-	-	-	-
69	DEC14A	128	21	-	-	+	-	-
70	DEC14B	128	21	-	-	+	-	-
71	DEC14C	128a	21	-	-	+	-	-
72	DEC14D	128	NM	-	-	+	-	-
73	DEC14E	128	21	-	-	+	-	-

74	DEC15A	111	21	-	-	+	-	-
75	DEC15B	111	21	-	-	+	-	-
76	DEC15C	111	21	-	-	+	-	-
77	DEC15D	111	21	-	-	-	-	-
78	DEC15E	111	21	-	-	+	-	-

Tabelle C: Sequenzierungsergebnisse und Vergleich der Ergebnisse mit EDL 933

Sonde	Stamm	amplifizierte bzw. sequenzierte Produktgröße in bp	analysierte Länge in bp (Bereich auf Referenzplasmid)	Homologie zum Referenzstamm
<i>OI 09</i>	DEC 3B	444	370	100%
<i>OI 09</i>	DEC 5E	444	370	100%
<i>OI 09</i>	ECOR – 37	444	370	100%
<i>OI 09</i>	EDL 933	444	370	100%
<i>OI 154</i>	DEC 3B	341	335	100%
<i>OI 154</i>	DEC 5E	341	335	100%
<i>OI 154</i>	ECOR – 37	341	335	100%
<i>OI 154</i>	EDL 933	341	335	100%
<i>OI 172</i>	DEC 3B	397	348	100%
<i>OI 172</i>	DEC 5E	397	348	100%
<i>OI 172</i>	EDL 933	397	348	100%