

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

**Vorkommen und Charakterisierung von
Modulinen des Zellzyklus in Shiga Toxin-
produzierenden *Escherichia coli***

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von Demin, Marina geb. Fell

aus Barnaul, Russland

2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch -
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. A. Schmidt

ZUSAMMENFASSUNG

Vorkommen und Charakterisierung von Modulinen des Zellzyklus in Shiga
Toxin-produzierenden *Escherichia coli*

Demin, Marina

Die zu den Zellzyklus-Modulinen gehörenden „cytolethal distending toxins“ (CDTs) verursachen eine Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase, eine Zellvergrößerung und den Zelltod. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnten mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer die *cdt*-Gene in 12 von 181 Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC) nachgewiesen werden. Die *cdt*-gentragenden STEC-Stämme gehörten zu den Serotypen O73:H18, O91:H21, O113:H21, O153:H18, und O157:H7. Diese Stämme wurden aus Stuhlproben von Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom oder von Patienten mit Diarrhoe isoliert. Die weitere Charakterisierung zeigte, dass mit Ausnahme von *E. coli* O157:H7, allen *cdt*-positiven Stämmen das Intimin-kodierende *eae*-Gen fehlt. Die PCR-Analysen zum Nachweis von *cdt-I*, *cdt-II* und *cdt-IV* waren bei allen 181 *E. coli*-Stämmen negativ. Die 12 *cdt*-gentragenden *E. coli* besaßen entweder *cdt-III*- oder *cdt-V*-Gene. Die Produktion eines biologisch aktiven CDT durch diese Stämme wurde mittels eines Zellkulturtests mit CHO (Chinese hamster ovary)-Zellen nachgewiesen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden von vier STEC-Stämmen unterschiedlicher Serovaren (O91:H21, O113:H21, O157:H7) die kompletten *cdt-V*-Gene sequenziert. Hierbei zeigte sich in allen Fällen eine hohe Homologie (> 99%) zu dem *cdt-V* des *E. coli* O157:H7-Stammes 493/89. Das Vorkommen von homologen *cdt*-Genen in phylogenetisch heterogenen STEC könnte darauf hindeuten, dass diese Virulenzgene erst in jüngster Zeit erworben wurden.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2006

Für meinen Ehemann und meine Tochter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Material	6
2.1.1. Laboreinrichtungen und Geräte	6
2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	6
2.1.3. Bakterienstämme	7
2.1.4. Synthetische Oligonucleotide	9
2.2. Methoden	10
2.2.1. Anzucht der Bakterien	10
2.2.2. Extraktion chromosomaler DNA	10
2.2.3. Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von <i>cdtA</i> -, <i>cdtB</i> -, <i>cdtC</i> - und <i>eae</i> -Genen	10
2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	15
2.2.5. Färbung der DNA	15
2.2.6. Aufreinigung der PCR-Produkten	15
2.2.7. Herstellung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	15
2.2.8. Sequenzierung	16
2.2.9. Auswertung der Sequenzdaten	16
2.2.10. Zellkulturtest für die Überprüfung der CDT-Produktion	16
3. Ergebnisse	17
3.1. Vorkommen des <i>cdt</i> -Gens bei klinischen STEC-Isolaten	17
3.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität der <i>cdt</i> -getragenden STEC-Stämmen	17
3.3. Assoziation der CDT-Produktion mit dem Krankheitsbild	21
3.4. Nachweis des <i>eae</i> -Gens bei nicht-O157 STEC-Stämmen	21
3.5. Analyse der <i>cdt</i> -Sequenzen	21
4. Diskussion	25
5. Literatur	28
6. Abkürzungsverzeichnis	39
7. Danksagung	40
8. Lebenslauf	41

1. Einleitung

Escherichia coli ist ein Bewohner des menschlichen und tierischen Darms. Diese fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien spielen eine wichtige Rolle in den symbiotischen Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora.

E. coli-Stämme zeichnen sich durch eine hohe Variabilität aus (49). Diese Tatsache könnte mit einer bereits sehr langen Periode der Koadaptation zwischen *E. coli* und Primaten zusammenhängen. Neben apathogenen *E. coli* gehören auch die fakultativ pathogenen *E. coli* zur Normalflora des Kolons. Insbesondere die fakultativ pathogenen *E. coli* verursachen endogene Infektionen (Harnwege, Wunden, Blutbahn). Allerdings kennt man bei dieser Bakterienspezies auch ein breites Spektrum von darmpathogenen Wirktypen: enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) (1, 38, 44, 49). Diese Stämme können mittels spezifischer Adhäsine, Toxine und anderer Virulenzfaktoren den Darm schädigen (38, 44, 49).

EHEC gehören in Deutschland neben Salmonellen, *Campylobacter*-Spezies und Yersinien zu den häufigsten Erregern bakterieller Enteritiden (33, 34). Im Jahre 2004 wurden in Deutschland gemäß den Falldefinitionen des Robert-Koch-Institutes insgesamt 1137 EHEC-Erkrankungen gemeldet (62). Die EHEC-Bakterien besitzen im Gegensatz zu Salmonellen und Shigellen keine invasiven Eigenschaften und werden deshalb nur extrem selten in Blutkulturen nachgewiesen (31). Die enterale Infektion wird durch die hohe Säureresistenz der EHEC begünstigt (32). Sie können beim Menschen auch extraintestinale Komplikationen, wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) oder Gerinnungsstörungen ohne Nierenbeteiligung hervorrufen (31, 70). Das typische Vollbild eines HUS umfasst akutes Nierenversagen, intravasale Hämolyse mit fragmentierten Erythrozyten, die als Fragmentozyten bezeichnet werden und einer Thrombozytopenie (72). Zusätzlich sind neurologische Komplikationen

nicht selten (17). Die Behandlung der EHEC–Infektion kann nur symptomatisch durchgeführt werden und erfordert bei HUS Intensivtherapie und Dialyse (18, 30, 33, 67, 68). Impfstoffe zur Prävention einer EHEC-Infektion befinden sich derzeit in klinischer Erprobung. Die Gabe von Antibiotika ist wegen der vermehrten Produktion und Freisetzung der Shiga Toxine (Stx) kontraindiziert (72). Neben der Infektionsmöglichkeit über kontaminierte Lebensmittel (18, 31, 32), hat die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch eine große Bedeutung (61).

Neben dem am häufigsten isolierten Serotyp O157:H7 (31, 32, 47, 67) sind eine ganze Anzahl weiterer Serotypen identifiziert worden, die ebensolche Krankheitssymptome zur Folge haben können. Unter den sogenannten nicht-O157:H7 sind O157:H-, O111:H8, O26:H11 und O103:H2 am weitesten verbreitet (13, 15, 17, 31). Das bislang einzig bekannte gemeinsame Merkmal aller EHEC ist die Bildung der Stx (31, 51). Aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung auf Verozellen (transformierte Affennierenepithelzellen) werden diese Toxine auch als „Verotoxine“ bezeichnet (36, 37, 39). Bei den Stx handelt es sich um potente Inhibitoren der Proteinbiosynthese eukaryotischer Zellen. Sie wirken als rRNA-N-Glykosidasen und bestehen aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten. Mittels ihrer B-Untereinheiten binden diese Toxine an Zellen, die Glykosphingolipid-Rezeptoren exprimieren. Die A-Untereinheit stellt die toxisch wirksame Komponente dar, die nach ihrer Translokation in die eukaryotische Zelle die Proteinbiosynthese inhibiert (4, 21, 31). Bei den Stx lassen sich serologisch zwei Hauptgruppen unterscheiden, die als Stx1 und Stx2 bezeichnet werden (31). Zur Stx2–Familie zählen das klassische Stx2 sowie die als Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f und Stx2g bezeichneten Varianten (16, 25, 43, 48, 60, 64). Auch Varianten des Stx1 wurden beschrieben (8, 13, 40). EHEC Stämme können mehr als einen Toxintyp beherbergen (13, 14, 16). Die für Stx-kodierende Gene liegen im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen (20).

Neben Stx spielen auch Adhäsionsfaktoren (7, 23, 55, 69, 74), Hämolysine (63) und bestimmte Proteasen (6, 65) im Pathogenitätsmechanismus von STEC eine Rolle.

Ein weiteres Merkmal zahlreicher STEC-Stämme ist die Bildung so genannter „Attaching and Effacing“-Läsionen an Enterozyten (49). Hierbei verlieren die Epithelzellen ihren Mikrovillibesatz und bilden becherartige Ausstülpungen aus, auf denen die Bakterien in engem Kontakt angeheftet sind. Die gesamte genetische Information, die für die Bildung dieser Läsionen verantwortlich ist, liegt auf einer als LEE (Locus of Enterocyte Effacement) bezeichneten Pathogenitätsinsel im EHEC-Chromosom (29, 49). Eine für die Pathogenese der EHEC-Erkrankungen besondere Bedeutung hat das Intimin, ein Protein der äußeren Membran. Intimin wird vom *eae*-Gen kodiert (74), das auch im LEE liegt (29).

Die „cytolethal distending toxins“ (CDTs) sind eine neu entdeckte Familie von bakteriellen Proteintoxinen mit der einzigartigen Fähigkeit in den Zellzyklus einzugreifen, einen irreversiblen Stillstand des Zellzyklus und folglich den Tod der angegriffenen Zellen zu verursachen (12, 59). Sie werden deshalb als Zellzyklus-Moduline bezeichnet (50). Die Interaktion derartiger Moleküle mit dem Zellzyklus zu interferieren, repräsentiert eine neue Strategie bakterieller Erreger (50). CDTs werden durch Endozytose aufgenommen und benötigen einen intakten Golgi-Komplex, um ihre modulierende Wirkung zu entfalten (12). Es zeigte sich, dass die CDT-B-Komponente eine funktionelle Homologie mit der Säugetier-Deoxyribonuklease I (DNase I) besitzt (41) und dass sie die Induktion eines Zellzyklustillstands in Säugetierzellen verursacht (12, 19, 42).

CDT wurde erstmals 1987 in *E. coli* beschrieben (26, 27). Sein Vorkommen ist ebenfalls in *Campylobacter* (28, 58) und *Shigella*-Spezies (52), *Haemophilus ducreyi* (11), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (46) und *Helicobacter*-Spezies (9) dokumentiert. Die CDT-Holotoxine werden durch drei, in einem

Operon lokalisierten Gene (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) kodiert (24, 56, 57, 66). Die CDT-Proteine verschiedener Bakterienspezies besitzen zueinander eine unterschiedliche Nukleotidfolge- und Proteinhomologie. Die größte Ähnlichkeit wurde zwischen CDT-B-Proteinen festgestellt (24, 42, 57). CDT-A- und CDT-C-Proteine weisen eine größere Variabilität zwischen den verschiedenen Bakterienspezies auf (24, 42, 57). Molekularbiologische Studien haben ergeben, dass die Produkte aller drei Gene in dem produzierenden Bakterium nötig sind, um ein zytotoxisches CDT zu erzeugen (42, 57, 73), aber die Funktionen der einzelnen Komponenten sind noch weitgehend unbekannt. Die bisher in *E. coli* identifizierten CDTs werden als CDT-I (66), CDT-II (57), CDT-III (56) und CDT-IV (71) bezeichnet. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe ein weiteres *cdt* entdeckt und als *cdt-V* bezeichnet (24; Abbildung 1). Wir konnten zeigen, dass dieses Gen in 87% der Sorbit-fermentierenden *E. coli* O157:H- vorkommt (24). Weitergehende Versuche zur biologischen Aktivität ergaben, dass CDT-V Endothelzellen in der G2-Phase des Zellzyklus blockiert (3). Zeitabhängige (1 bis 4 Tage) und CDT-Dosis abhängige (CDT-Dosis: 2, 4, 8, 16 CD₅₀) Untersuchungen ergaben, dass die Blockierung in der G2-Phase des Zellzyklus von der Menge an CDT und der Dauer der Zellstimulation abhängig ist. In den ersten 48 Stunden erfolgt ein exponentieller Anstieg einer G2-Zellzyklus Blockierung (82% der Zellen in G2-Phase). Danach (von Tag 2 bis Tag 4) geht der Anstieg in eine stationäre Phase über. Der maximale Messwert der Zellen in der G2-Zellzyklus-Blockade wurde nach der Stimulation der Zellen mit 16 CD₅₀ und nach drei Tagen beobachtet (3).

Bisher war nicht bekannt ob CDT-Proteine auch in STEC-Bakterien vorkommen, die nicht zum Serotyp O157:H7 gehören. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Prävalenz und Struktur von CDT-Proteinen in diesen Krankheitserregern zu ermitteln. Die Produktion des biologisch aktiven CDT durch Stämme, die *cdt*-Gene beherbergen, sollte mittels eines Zellkulturtests mit CHO-Zellen getestet werden. Des Weiteren sollte die Nukleotidsequenz repräsentativer *cdt*-Gene aus unterschiedlichen Serovaren der STEC ermittelt werden.

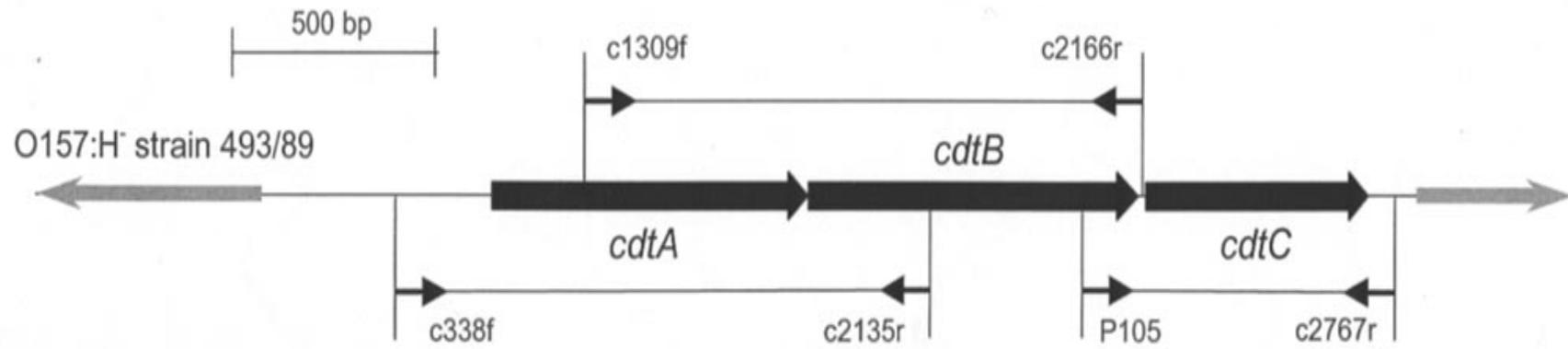


Abbildung 1. Struktur des *cdt-V*-Gens und Positionen der PCR-Primer für die *cdt-V*-Amplifikation

2. Material und Methoden

Material

Laboreinrichtungen und Geräte

ABI Prism 377 Sequencer PE	Applied Biosystems ABI, Weiterstadt
Thermocycler	Biometra, Göttingen
T-Gradient-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseapparatur	Biozym, Oldendorf
Pipette Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Spitzen für die Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitswerkbank	Heraus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5404 R	Eppendorf, Hamburg
Video Copy Processor	Mitsubishi

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

100 bp DNA Ladder	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Fresenius, Bad Homburg
BorSäure	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP	PeqLAB, Erlangen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 96%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Biometra, Göttingen
HPLC-Wasser	Fresenius, Bad Homburg
5 x Reaktionspuffer Y	PeqLAB, Erlangen
Sodium acetat	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Set	PeqLAB, Erlangen

TRIS-hydrochlorid Carl Roth, Karlsruhe
TBE- Puffer (Tris- HCL, EDTA) Biometra, Göttingen
QIAquick-PCR- purification- Kit Qiagen, Hilden

Bakterienstämme

Die 181 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Stämme wurden im Zeitraum von Januar 1996 bis Juni 2002 im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, im Institut für Hygiene des Universitätsklinikum Münster und im Robert-Koch-Institut Wernigerode aus Stuhlproben von Patienten oder von asymptomatischen Ausscheidern isoliert (Tabelle 1). Zum Vergleich haben wir einen STEC O157:H7 Stamm (5791/99) analysiert. Dieser Stamm wurde bereits in unserem Labor charakterisiert (24).

Tabelle 1. Charakterisierung der verwendeten *E. coli*-Stämmen und deren Assoziation mit Krankheitsbildern

Serotyp	Zahl der untersuchten Stämme	Klinik		
		HUS	Durchfall	Asymptomatisch
O73:H18	1	0	1	0
O75:H8/H-	2	0	0	2
O76:H19	8	0	8	0
O78:H-	3	0	1	2
O91: H14/H21/H-	15	2	9	4
O103:H2/H18/H-	20	6	14	0
O111:H8/H-	15	8	7	0
O113:H4/H6/H21	12	0	7	5
O115:H10/H20	2	0	2	0

Fortsetzung Tabelle 1

Serotyp	Zahl der untersuchten Stämme	Klinik		
		HUS	Durchfall	Asymptomatisch
O118:H-	2	1	0	1
O128:H2/H-	12	0	5	7
O145:H25/H28/H-	23	16	7	0
O146:H21/H28	9	0	6	3
O153:H18	3	0	3	0
O157:H7	1	1	0	0
O174:H8/H-	8	0	4	4
O178:H19/H-	6	0	4	2
O181:H16	4	0	4	0
ONT:H2/H8/H21/H-	7	0	2	5
Orauf: H11/H25/HNT/H-	10	1	3	6
Andere ¹⁾	18	2	6	10

¹⁾ Andere:

O8:H19/H- (2), O16:H48 (1), O25:H- (1), O62:H- (2), O77:H- (1), O84:
H4/HNT/H- (3), O92:H33 (1), O112:H8/H- (2), O129:H- (1), O136:HNT (1),
O152:H4 (1), O176:H- (2).

HNT = H nicht typisierbar;

ONT = O nicht typisierbar;

Orauf = autoagglutinierende Stämme

HUS = hämolytisch-urämisches Syndrom

Synthetische Oligonucleotide

Die für die PCR-Analysen und Nukleotidsequenzierungen verwendeten Primer wurden von der Firma ARK Scientific GmbH Biosystems (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Methoden

Anzucht der Bakterien

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme für die PCR-Analysen erfolgte auf Sorbitol MacConkey Agar. Hierzu wurde eine Einzelkolonie des zu untersuchenden Stammes auf einer Agarplatte ausgestrichen und für 18 Stunden bei 37° C bebrütet.

Extraktion chromosomaler DNA

Das Verfahren diente der DNA-Gewinnung aus *E. coli*-Kulturen.

Eine Bakterienkolonie von jedem Stamm wurde in 50 µl 0,9% NaCl-Lösung gelöst und für 10 Minuten bei 99° gelassen.

Polymerase Kettenreaktion zum Nachweis von *cdtA*-, *cdtB*-, *cdtC*- und *eae*-Genen

Für die PCR wurden 25 µl eines Reaktionsgemisches benötigt, das sich aus 2,5 µl Bakteriensuspension, 12,35 µl H₂O, 2,5 µl Puffer, 5 µl Enhancer, 0,75 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTP, 0,5 µl 30 pmol Primer und 0,4 µl verdünnte 1:5 Taq-DNA-Polymerase zusammensetzte.

Die zum Nachweis von *cdt*-Genen verwendeten PCR-Primer, Zielsequenzen und die Größe der Amplifikate in Basenpaaren (bp) sowie die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Angabe „f“ und „r“ stehen für „forward“ und „reverse“. Als Positivkontrolle diente DNA des *E. coli* Stammes 493/89 (24), als Negativkontrolle DNA des Laborstammes C600.

Die Positionen der Primer, die für den Nachweis des *cdt-V*-Gens verwendet wurden, sind in Abbildung 1 gezeigt.

Tabelle 2. PCR-Primer und Bedingungen zum Nachweis von *cdt*-Genen

Primer	Sequenz (5´- 3´)	Zielgen	PCR-Bedingungen			PCR-Produkt (bp)	Positivkontrolle (Referenz)
			Denaturierung	Annealing	Extension		
cdtI-f cdtI-r	TGG TGA GAA TCG GAA CTG GAT TCC ATC AGG TTT GTC	<i>cdt-IA</i>	94°C, 30s	51°C, 60s	72°C, 60s	418	6468/62 (66)
cdtII-f cdtII-r	AAT CCC TAT CCC TGA ACC GTT CTA TTG GCT GTG GTG	<i>cdt-IIA</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 60s	542	9142/88 (57)
cdtIII-f cdtIII-r	AAACAGGACGGTAATAATGACTAATA GTGATCTCCTTCCATGAAAATATAGT	<i>cdt-IIIA, B, C</i>	94°C, 30s	54°C, 60s	72°C, 180s	2230	1404 (56)
CDT-IVs CDT-IVas	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC TTGCTCCAGAATCTATACCT	<i>cdt-IVB</i>	94°C, 60s	55°C, 60s	72°C, 60se	350	28c (71)
c338f c2135r	AGC ATT AAA TAA AAG CAC GA TAC TTG CTG TGG TCT GCT AT	<i>cdt-VA</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 60s	1329	493/89 (24)
c1309f c2166r	AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA AGC CTC TTT TAT CGT CTG GA	<i>cdt-VB</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 60s	1363	493/89 (24)
P105 c2767r	GTC AAC GAA CAT TAG ATT AT ATG GTC ATG CTT TGT TAT AT	<i>cdt-VC</i>	94°C, 30s	49°C, 60s	72°C, 60s	748	493/89 (24)

Fortsetzung Tabelle 2

Primer	Sequenz (5' - 3')	Zielgen	PCR-Bedingungen			PCR - Produkt (bp)	Positiv- kontrolle (Referenz)
			Denaturierung	Annealing	Extension		
c338f c2767r	AGC ATT AAA TAA AAG CAC CA ATG GTZ ATG CTT TGT TAT AT'	<i>cdt-VA, B, C</i>	94°C, 30s	51°C, 60s	72°C, 180s	2449	493/89 (24)
SK1 SK2	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTCG	<i>eae</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 60s	863	EDL933 (51)

Für alle PCRs: 1. Schritt: Denaturierung (94°C, 5 Minuten);
 2. Schritt: 30 Zyklen (siehe Tabelle);
 3. Schritt: Finale Extension (72°C, 5 Minuten)

Tabelle 3. PCR- und „walking-Primer“ sowie PCR-Bedingungen zur Herstellung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Primer	Sequenz (5´- 3´)	Zielgen	PCR-Bedingungen			Zyklen	Lange des PCR - Produktes (bp)
			Denaturie- rung	Annealing	Extension		
c338f c2166r	AGC ATT AAA TAA AAG CAC GA AGC CTC TTT TAT CGT CTG GA	<i>cdtA+cdtB</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 120s	30	1848
c1309f c2767r	AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA ATG GTC ATG CTT TGT TAT AT	<i>cdtB+cdtC</i>	94°C, 30s	51°C, 60s	72°C, 120s	30	1965
P102	TCG TAT TTG GTC TGG TTC CG	<i>cdtA+cdtB</i> <i>cdtB+cdtC</i>	96°C, 10s	55°C, 15s	60°C, 240s	25	
P103	CTG GTG AAA ATG CCG TAG AT	<i>cdtA+cdtB</i> <i>cdtB+cdtC</i>	96°C, 10s	53°C, 15s	60°C, 240s	25	
P104	GTG TAT TTA TTA GCC ATT AT	<i>cdtA+cdtB</i>	96°C, 10s	45°C, 15s	60°C, 240s	25	
P105	GTC AAC GAA CAT TAG ATT AT	<i>cdtA+cdtB</i> <i>cdtB+cdtC</i>	96°C, 10s	47°C, 15s	60°C, 240s	25	

Fortsetzung Tabelle 3

Primer	Sequenz (5' - 3')	Zielgen	PCR-Bedingungen			Zyklen	Länge des PCR-Produktes (bp)
			Denaturierung	Annealing	Extension		
c2135r	TAC TTG CTG TGG TCT GCT AT	<i>cdtA+cdtB</i> <i>cdtB+cdtC</i>	96°C, 10s	53°C, 15s	60°C, 240s	25	
1264r	GCT GGC CTT AAT GGT TCG CT	<i>cdtA+cdtB</i> <i>cdtB+cdtC</i>	96°C, 10s	57°C, 15s	60°C, 240s	25	

Für alle PCRs

1. Schritt: Denaturierung (94°C, 5 Minuten)
2. Schritt: 30 Zyklen oder 25 (siehe Tabelle)
3. Schritt: Final Extension (72°C, 5 Minuten)

Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen analysiert. Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurden 1,5%-ige Agarosegele verwendet.

Färbung der DNA

Nach dem Erreichen der gewünschten Wanderungsstrecken, die anhand mitwandernder Farbstoffe des Ladepuffers abgeschätzt wurden, wurde das Gel entnommen und für 30 Minuten in eine Färbelösung (Ethidiumbromid) gelegt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen in Aqua dest. für 15 Minuten entfernt. Anschließend wurden die entstandenen Komplexe aus Ethidiumbromid und DNA als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Aufreinigung der PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels des QIAquick-PCR-Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Herstellung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Die *cdtA*-, *cdtB*- und *cdtC*-Gene der *E. coli*-Stämme 3332/99, 9282/01 (beide O91:H21), 5249/01 (O113:H21) und des O157:H7 Stammes 5791/99 wurden mit Hilfe der Primer c338f und c2166r (*cdtA*-/*cdtB*-Gene) und c1309f und c2767r (*cdtB*-/*cdtC*-Gene) amplifiziert (Abbildung 1). Als walking-Primer wurden P102, P103, P104, P105, 1264r und c2135r (*cdtA*-/*cdtB*-Gene) und P102, P103, P105, 1264r und c2135r (*cdtB*-/*cdtC*-Gene) verwendet. Für die PCR-Analysen wurden 40 µl eines Reaktionsgemisches benötigt, das sich aus PCR-Produkt, 1,5 µl 5 x Puffer, 1 µl Premix, 1 µl Primer und HPLC-Wasser zusammensetzte. Die verwendeten PCR-Primer, Zielsequenzen und die Größe

der Amplifikate in Basenpaaren (bp) sowie PCR-Bedingungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Für die Aufreinigung von jeweils 10 µl der PCR-Produkten wurden 40 µl eines Reaktionsgemisches benötigt, das sich aus 1,5 µl 3M Natriumacetat, 31,25 µl 96% Ethanollösung und 7,25 µl HPLC-Wasser zusammensetzte. Nach der Zentrifugation der Proben für 20 Minuten bei 14000 rpm/min wurde die Flüssigkeit von der Gegenseite komplett abgezogen und 125 µl 70% Ethanollösung zugegeben. Danach wurden die Proben wieder für 5 Minuten zentrifugiert und getrocknet.

Sequenzierung

Die Sequenzanalyse wurde auf einem Sequenzgerät (ABI Prism 377) der Fa. Applied Biosystems durchgeführt. Die benötigten Reagenzien stammen aus dem *Taq* Prism Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Die Methodik des weitgehend automatisierten Verfahrens richtete sich nach den Herstellerangaben.

Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten wurde mit Hilfe des DNASIS-Programms und der EMBL GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) durchgeführt. Die ermittelten Basensequenzen der *cdt*-Genen von Stämmen 9282/01 (O91:H21) mit "accession number" AY365042 und 5249/01 (O113:H21) mit "accession number" AY365043 wurden in der EMBL GenBank hinterlegt.

Zellkulturtest für die Überprüfung der CDT-Produktion

Die Produktion des biologisch aktiven CDT durch die Stämme, die die *cdt*-Gene beherbergen haben, wurde mittels eines Zellkulturtests mit CHO-Zellen getestet (2).

3. Ergebnisse

3.1. Vorkommen des *cdt*-Gens bei klinischen STEC-Isolaten

Zur Ermittlung der *cdt*-Prävalenz wurden zunächst 181 STEC-Stämme mittels PCR überprüft. Hierzu wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Primer und PCR-Bedingungen verwendet. Insgesamt 12 STEC-Stämme waren in der PCR positiv (Tabelle 4). Abbildung 2 zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate von repräsentativen STEC-Stämmen. Die *cdt*-positiven Stämme gehören zu den Serotypen O73:H18, O91:H21, O113:H21, O153:H18 und O157:H7 (Tabelle 4). Die Feintypisierung der *cdt*-Gene ergab, dass drei Stämme (Serotyp O153:H18) *cdt-III*- und neun Stämme (Serotypen O157:H7, O73:H18, O91:H21, O113:H21) *cdt-V*-Gene beherbergten (Tabelle 4).

3.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität der *cdt*-gentragenden STEC-Stämmen

Um die Fähigkeit zur Expression von biologisch aktivem CDT zu überprüfen, wurden Überstände von Übernachtkulturen der *cdt*-positiven STEC in einem CHO-Assay getestet. Die CHO-Zellen wurden anschließend täglich mikroskopisch inspiziert um Veränderungen in der Zellmorphologie zu erfassen. Abbildung 3 zeigt die typische Morphologie der CHO-Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit Kulturüberständen *cdt*-positiver Stämme. Wir konnten zeigen, dass alle 12 *cdt*-gentragenden *E. coli*-Stämme biologisch aktive Toxine produzierten, die eine charakteristische Zelldistension verursachen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Charakterisierung der *cdt*-getragenden *E. coli* und deren Assoziation mit Krankheitsbildern

Stamm No.	Serotyp	Klinik	<i>cdt</i> -Allele	CDT-Produktion	<i>eae</i> -Gen
5791/99	O157:H7	HUS	<i>cdt-V</i>	Positiv	Positiv
2996/90	O73:H18	Durchfall	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
3332/99	O91:H21	HUS	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
2596/02	O91:H21	HUS	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
9282/01	O91:H21	Durchfall	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
9108/01	O91:H21	Durchfall	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
4292/00	O91:H21	Durchfall	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
5249/01	O113:H21	Durchfall	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
2896/01	O113:H21	Durchfall	<i>cdt-V</i>	Positiv	Negativ
9063/02	O153:H18	Durchfall	<i>cdt-III</i>	Positiv	Negativ
7272/02	O153:H18	Durchfall	<i>cdt-III</i>	Positiv	Negativ
5107/00	O153:H18	Durchfall	<i>cdt-III</i>	Positiv	Negativ

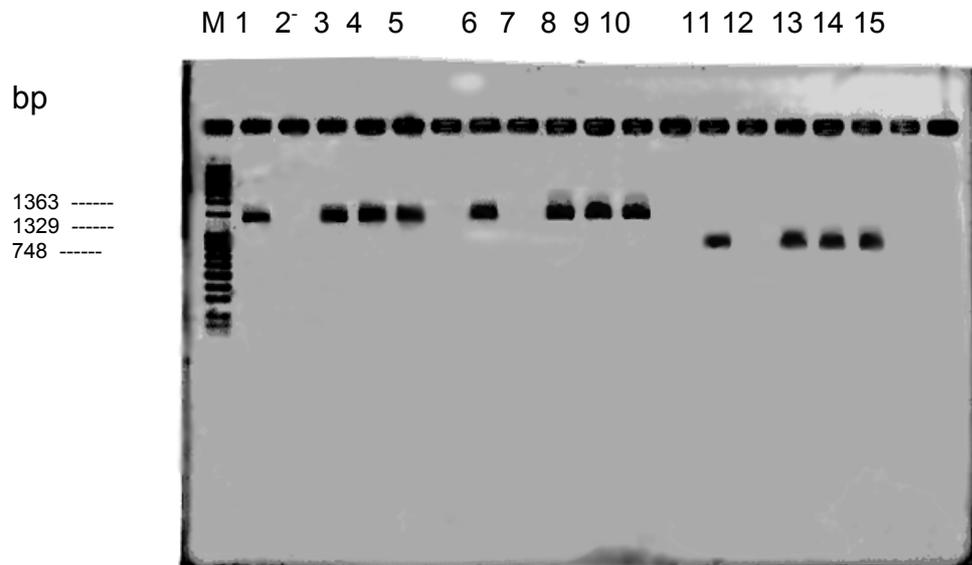


Abbildung 2. Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte *cdtA* (Spur 1-5), *cdtB* (Spur 6-10) und *cdtC* (Spur 11-15). Spur 1, 6,11: Positivkontrollen; Spur 2, 7, 12: Negativkontrollen; Spur 3, 8, 13: Stamm 5791/99 (O157:H7); Spur 4, 9, 14: Stamm 9282/01 O91:H21; Spur 5, 10, 15: Stamm 5249/01 (O113:H21). M = Molekular Marker (1 kb).

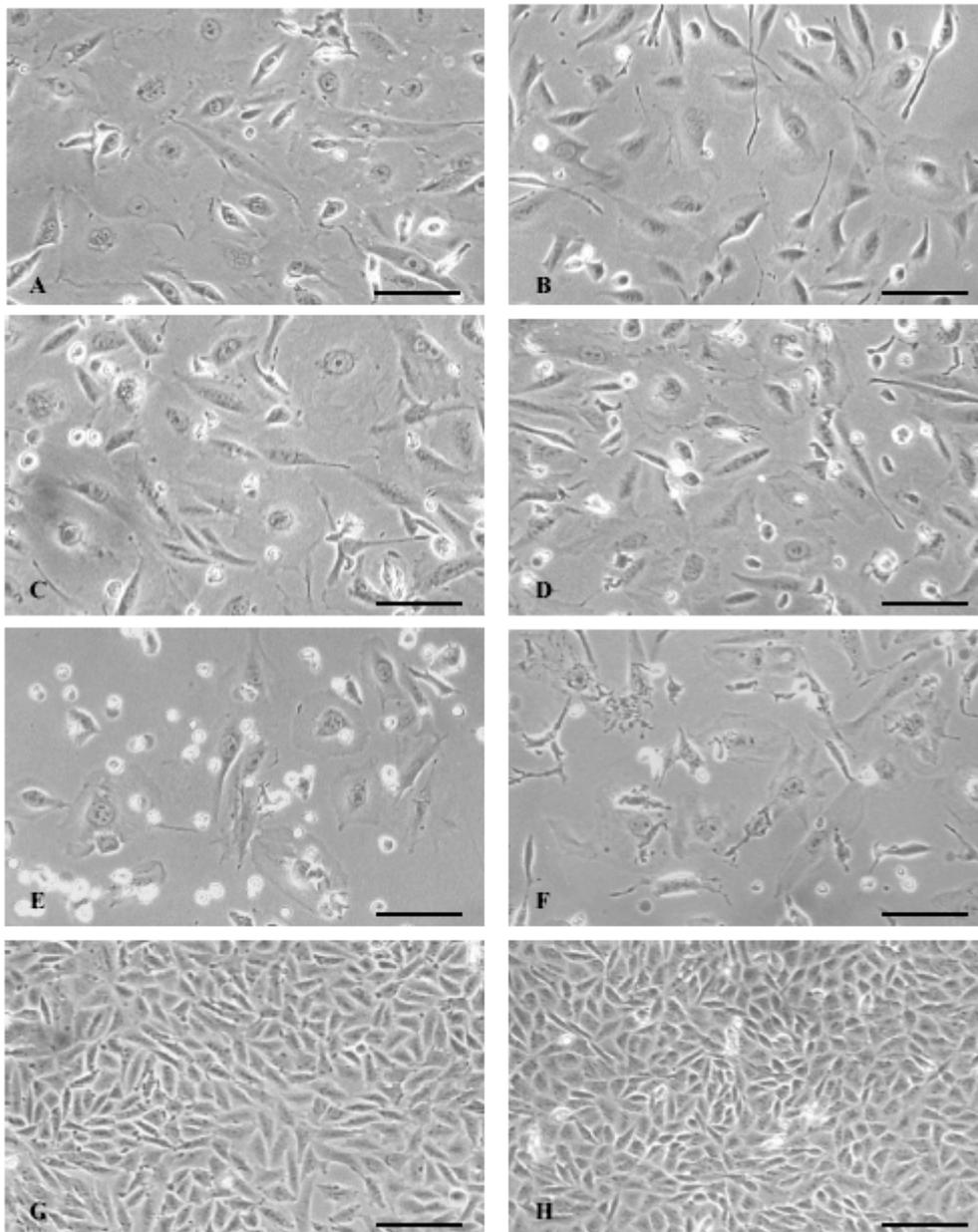


Abbildung 3. Mikrophotos von CHO-Zellen fünf Tage nach der Toxinbeigabe von *cdt-V*-positiven STEC-Stämmen: 493/89, Positivkontrolle (A); 2996/96, O73:H18 (B); 9282/01, O91:H21 (C); 5249/01, O113:H21 (D); 9063/02, O153:H18 (E); 5791/99, O157:H7 (F). *E. coli* Stamm C600 (G) und Ham's F12 Zellkultur medium (H) gelten als Negativkontrollen. Der Maßstab: bar =200 µm

3.3. Assoziation der CDT-Produktion mit dem Krankheitsbild

Insgesamt drei der CDT-produzierenden STEC-Stämme waren mit einem HUS assoziiert. Die übrigen neun CDT-positiven STEC-Stämme wurden aus Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe isoliert (Tabelle 4).

3.4. Nachweis des *eae*-Gens bei nicht-O157 STEC-Stämmen

Um zu überprüfen, wie häufig das *eae*-Gen bei den 181 untersuchten *E. coli*-Stämmen vorkommt, wurde eine PCR mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern durchgeführt. Das *eae*-Gen wurde in 71 von 181 STEC-Stämmen nachgewiesen. Alle nicht-O157 *cdt*-gentragenden STEC-Stämme waren *eae*-negativ (Tabelle 4). Allerdings konnte bei dem STEC O157:H7 Stamm 5791/99 das *eae*-Gen nachgewiesen werden (Tabelle 4). Das fast fehlende Vorkommen des *cdt*-Gens in *eae*-positiven STEC-Stämmen (1 von 71; 1,4 % *cdt*-positiv) zeigte eine hohe Prävalenz des *cdt*-Gens in *eae*-negativen STEC-Stämmen (11 von 110; 10 % *cdt*-positiv).

3.5. Analyse der *cdt*-Sequenzen

Von vier *E. coli*-Stämmen (5791/99, 3332/99, 9282/01 und 5249/01) wurden die Nukleotidsequenzen der *cdt*-Gene ermittelt. Bei allen vier Stämmen konnten jeweils drei getrennte 777 bp (*cdtA*), 810 bp (*cdtB*) und 546 bp (*cdtC*) offene Leserahmen nachgewiesen werden, die eine hohe Homologie zu dem *cdt-V* des Stammes 493/879 aufwiesen (Tabelle 5). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in der Abbildung 4 dargestellt.

Die *cdt*-Sequenzen der STEC O91:H21 Stämme 3332/99 und 9282/01 (GenBank "accession number" AY365042) und des STEC O113:H21 Stammes 5249/01 (GenBank "accession number" AY365043) waren 100% identisch in den Aminosäuresequenzen ihren CDT-A, CDT-B und CDT-C Untereinheiten (Abbildung 4). Beim Vergleich der Sequenzen CDT-A, CDT-B

und CDT-C von STEC O157:H7 Stamm 5791/99 mit STEC O91:H21 und O113:H21 ergab sich in den CDT-A und CDT-B eine Homologie von 100% und in CDT-C eine Homologie von 99,2% (Abbildung 4).

Tabelle 5. Vergleich von Nukleotidsequenzen der *cdt-V*-Gene von STEC-Stämmen der Serovare O157:H7, O91:H21 und O113:H2 mit der Nukleotidsequenz des *cdt-V*-Referenzstammes 493/89

Stamm-No.	Serotyp	Nukleotidsequenzhomologie zu den <i>cdt</i> -Genen des <i>E. coli</i> O157:H- Stammes 493/89		
		<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
3332/99	O91:H21	100%	99.6%	99.2%
9282/01	O91:H21	100%	99.6%	99.2%
5249/01	O113:H21	100%	99.6%	99.2%
5971/99	O157:H7	100%	100%	100%

Fortsetzung Abbildung 4

CDT-C

	1	30	60	90					
5791/99	MKRLIIIVTM	LLISGCSSSQ	EAVNNQIDEL	GKENNSLFTF	RNLQSGLMLH	NRLDLHGREGI	TGWEVVPVK	TPAEALVTDQ	SGWIMIRTPNT
3332/99	-----								
9282/01	-----								
5249/01	-----								
		120	150	180					
5791/99	DQCLGTPDGK	NLLKMTCNP	TDKKTFLSLIP	STTGAVQIKS	VLSGLCFLDS	KNSGLSFETG	KCIADFKKPF	EVVPQSHLWM	LNPLNTESPI
3332/99	-----F-----V								
9282/01	-----F-----V								
5249/01	-----F-----V								
	181								
5791/99	I*								
3332/99	-*								
9282/01	-*								
5249/01	-*	2	99.2%						

4. Diskussion

STEC-Stämme können eine hämorrhagische Kolitis und das sich extraintestinal manifestierende HUS hervorrufen (5, 31, 35, 67). Das HUS, welches bei 10 - 15% der Erkrankten auftritt, ist die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter (30, 31). Insgesamt zeigen sich bei HUS-Patienten in bis zu 50% der Fälle Langzeitschäden (30, 31). Neben dem genannten terminalen Nierenversagen können sich Proteinurie, arterieller Bluthochdruck oder neurologische Ausfälle entwickeln (17, 30, 31). Dem pathogenetischen Geschehen liegt nach der derzeit gängigen Vorstellung eine Schädigung des Endothels durch die Shiga Toxine zugrunde, wobei die schwersten Veränderungen im renalen Gefäßendothel gefunden werden (31). Obwohl die Shiga Toxine im Zentrum der Untersuchungen zur Pathogenese der hämorrhagischen Kolitis und des HUS stehen, ist nicht geklärt, inwieweit auch andere Determinanten am Krankheitsgeschehen beteiligt sind.

Mit den Methoden der vergleichenden Genomanalysen wurden in den letzten Jahren in STEC zahlreiche neue Genombereiche mit Pathogenitätsfunktion identifiziert (6, 23, 24, 69). Hierzu gehören auch die im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetisch charakterisierten CDTs. Die toxische Wirkung der CDTs beruht auf einer Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase (3, 42). Neuere Ergebnisse lassen vermuten, dass Zellzyklus-Module aus der Familie der CDT auch eine Rolle in der Pathogenese der durch STEC verursachten Erkrankungen spielen könnten. So konnten Janka et al. (24) ein neues CDT (CDT-V) bei 87% der hochvirulenten Sorbitol-fermentierenden STEC O157:H- nachgewiesen. Bielaszewska et al. (3) zeigten, dass CDT-V in Endothelzellen einen irreversiblen Stillstand des Zellzyklus und den Tod der angegriffenen Zellen verursachte.

Bisher wurden die Prävalenz und die Charakteristik von CDT vor allem in STEC der Serogruppe O157 gezeigt (24). Über das Vermögen der STEC, die

nicht zur Serogruppe O157 gehören, war bisher wenig bekannt. Die hier vorgelegten Ergebnisse haben gezeigt, dass zwei Varianten des CDT bei STEC der Serotypen O91:H21, O113:H21, O153:H18 und O73:H18 vorkommen. Die STEC-Stämme produzierten entweder CDT-III oder CDT-V (vgl. Tabelle 4). Von *cdt-III*- und *cdt-V*-getragenden STEC-Stämmen wurde die Nukleotidsequenz der *cdt*-Gene ermittelt. Aus den vorliegenden Sequenzen ergaben sich bei jedem Stamm drei getrennte offene Leserahmen. Es ist daher wahrscheinlich, dass CDT auch in diesen Stämmen als Komplex aus drei Untereinheiten toxisch aktiv ist.

Insgesamt drei der *cdt*-positiven STEC sind von Patienten mit einem enteropathischen HUS isoliert worden. Neun STEC-Stämme wurden aus Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe isoliert. Die Stämme der Serotypen O91:H21, O113:H21 und O73:H18 besitzen die *cdt-V*-Gene. Jedoch im Gegensatz zu *cdt-V*-getragenden STEC O157, die das Intimin-kodierende *eae*-Gen tragen (24 und Tabelle 4), sind nicht-O157 *E. coli*-Stämme *eae*-Gen negativ. Die übrigen drei Stämme von Serotyp O153:H18 tragen *cdt-III*. Bisher wurde das häufige Vorkommen des *cdt-III*-Gens nur in bovinen *E. coli*-Isolaten beschrieben (10, 45). Deshalb rechtfertigt unserer Nachweis von *cdt-III* in STEC-Stämmen, die aus Stuhlproben von Patienten mit Diarrhoe isoliert wurden, eine weitere Nachforschung zur Ermittlung von Epidemiologie und pathogenetischer Bedeutung dieser Krankheitserreger.

Die Assoziation der CDT-Produktion in *eae*-negativen STEC der Serotypen O91:H21 und O113:H21, die beim Menschen ein HUS verursachen können (vgl. Tabelle 4) oder als Ursachen von HUS in der Literatur beschrieben wurden (22, 27, 36, 54, 55), lässt die Vermutung zu, dass CDT zu der Pathogenese der durch diese Stämme verursachten Erkrankungen eine Rolle spielen könnte. Allerdings ist die Genausstattung dieser STEC noch unzureichend erforscht und deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass

noch weitere Pathogenitätsdeterminanten ursächlich verantwortlich sind. Tierversuchen zeigen, dass CDT ein virulenter Faktor *in vivo* sein könnte (53).

Beim Vergleich der Sequenzen von CDT-V aus phylogenetisch unterschiedlichen STEC ergab sich im Falle von CDT-A und CDT-B eine Homologie von 100% und in CDT-C eine Homologie von 99,2% (vgl. Abbildung 4). Das Vorkommen von identischen oder nahezu identischen CDT-Toxinen in phylogenetisch unterschiedlichen STEC deutet darauf hin, dass die CDT-Proteine erst in jüngster Zeit von STEC erworben wurden. Offensichtlich verändern STEC ihr Genom in kurzen Intervallen durch die Aufnahme von fremder DNA durch horizontalen Gentransfer. Bei extraintestinalen und intestinalen *E. coli*-Stämmen konnte man zeigen, dass zahlreiche Gene, deren Produkte für die Toxinbildung, Adhärenz oder Invasivität verantwortlich sind, durch einen Gentransfer erworben wurden (20). Plasmide, Pathogenitätsinseln und Bakteriophagen dienen als wichtige mobile Träger von Virulenz-assoziierten Genen (7, 20, 56, 65). STEC verfügen zudem über effiziente Mechanismen des horizontalen Gentransfers mittels Transduktion, Konjugation oder Transformation (20). Diese genetische Eigenschaft führt zur Selektion von Varianten, häufig mit großen genomischen Insertionen, die den STEC-Bakterien neue pathogenetische Eigenschaften verleihen. Auch das CDT-V-Operon ist in STEC O157:H- von Phagengenen flankiert (24). Zukünftige Untersuchungen sollten klären, ob auch die in nicht zur Serogruppe O157 vorhandenen *cdt*-Gene von Phagengenen flankiert sind.

5. Literatur

1. Albert MJ, Faruque SM, Faruque ASG, Bettelheim KA, Neogi PKB, Bhuiyan NA, Kaper JB (1996) Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* 34: 717-719
2. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA, Karch, H (2003) Characterization of the Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of non-O157 Serogroups. *J Clin Microbiol* 10: 211-230
3. Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T, Karch H (2005) Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun* 73: 552-562
4. Bitzan MM, Wang Y, Lin J, Marsden PA (1998) 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* 101: 372-382
5. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson BJ, Gyles CL (1999) Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37: 497-503
6. Brunder W, Schmidt H, Karch H (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24: 767-778

7. Brunder W, Salam Khan A, Hacker J, Karch H (2001) A novel fimbrial gene cluster encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. Infect Immun 69: 4447-4457
8. Bürk C, Dietrich R, Acar G, Moravek M, Bulte M, Martlbauer E (2003) Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. J Clin Microbiol 41: 2106-2112
9. Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG (2000) Identification of *cdtB* homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. J Med Microbiol 49: 525-534
10. Clark CG, Johnson ST, Easy RH, Campbell JL, Rodgers FG (2002) PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. J Clin Microbiol 40: 2671-2674
11. Cope LD, Lumbley S, Latimer JL, Klesney-Tait J, Stevens MK, Johnson LS, Purven M, Munson RS, Hansen EJ (1997) A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducrey*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4056-4061
12. Cortes-Bratti X, Frisan T, Thelestam M (2001) The cytolethal distending toxins induce DNA damage and cell cycle arrest. Toxicol 39: 1729-1736
13. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis 185: 74-84
14. Friedrich A W, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschape H, Karch, H (2003) Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and

- genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol* 41: 2448-2453
15. Fruth A, Prager R, Friedrich A, Kuczius T, Roggentin P, Karch H, Ammon A, Bockemühl J, Tschäpe H (2002) Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998 bis 2001. *Bundesgesundheitsbl* 45: 715-721
 16. Fürst S, Scheef J, Bielaszewska M, Russmann H, Schmidt H, Karch H (2000) Identification and characterisation of *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. *J Med Microbiol* 49: 383-386
 17. Gerber A, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB (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
 18. Griffin PM, Tauxe RV (1991) Epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enteropathogenic *E coli*, and the associated hämolytic-uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13: 60-98
 19. Hassane DC, Lee RB, Pickett CL (2003) *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect Immun* 71: 541-545
 20. Herold S, Karch H, Schmidt H (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 294: 115-121

21. Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW (2001) Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* 69: 6148-6155
22. Ito H, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Nishibuchi M (1990) Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog* 8: 47-60
23. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Karch H (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* 92: 207-214
24. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H (2003) The cytolethal distending toxin (*cdt*) gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 71: 3634-3638
25. Jelacic J K, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD, Tarr PI (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* 188: 719-729
26. Johnson WM, Lior H (1987) Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol Lett* 43: 19-23

27. Johnson WM, Lior H (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog* 4: 103-113
28. Johnson WM, Lior, H (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* 4: 115-126
29. Kaper JB, Elliott S, Sperandio V, Perna NT, Mayhew GF, Blattner FR (1998) Attaching and effacing intestinal histopathology and the focus of enterocyte effacement. p 163-182 In Kaper J B, O'Brien AD (eds), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. American Society for Microb, Washington, DC
30. Kaplan BS (1998) The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9: 1126-1133
31. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 405-418
32. Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H (1999) Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34: 229-243
33. Karch H, Bockemühl J, Huppertz HI (2000) Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Deutsches Ärzteblatt* 36 A: 2314-2318
34. Karch H, Huppertz HI, Bockemühl J, Schmidt H, Schwarzkopf A, Lissner R (1997) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *J Food Prot* 11: 1454-1457

35. Karch H, Wiss R, Gloning H, Emmrich P, Aleksic S, Bockemühl J (1990) Hamolytisch-uramisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*. Dtsch Med Wochenschr 115: 489-495
36. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H (1985) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis 151: 775-782
37. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 1: 619-620
38. Karmali MA (2003) The medical significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. An overview. Methods Mol Med 73: 1-7
39. Konowalchuk JJ, Speirs I, Stavric S (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 18: 775-779
40. Kuczius T, Bielaszewska M, Friedrich A, Zhang WA (2004) A rapid method 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: 515-521
41. Lara-Tejero M, Galan JE (2000) A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. Science 290: 354-357
42. Lara-Tejero M, Galan JE (2001) CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. Infect Immun 69: 4358-4365

43. Leung PHM, Peiris JSM, Ng WWS, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69: 7549-7553
44. Levine MM (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohämorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-389
45. Mainil JG, Jacquemin E, Oswald E (2003) Prevalence and identity of *cdt*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 94: 159-165
46. Mayer MP, Bueno L, Hansen EJ, DiRienzo JM (1999) Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 67: 1227-1237
47. Mead PS, Griffin PM (1998) *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352: 1207-1212
48. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD (1996) Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* 64: 1569-1576
49. Nataro J, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201

50. Nougayrede JP, Taieb F, Rycke JDe, Oswald E (2005) Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol* 13: 103-110
51. O'Brien AO, Lively TA, Chen M E, Rothman SW, Formal SB (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
52. Okuda J, Kurasono H, Takeda Y (1995) Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb Pathol* 18: 167-172
53. Okuda J, Fukumoto M, Takeda Y, Nishibuchi M (1997) Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* gene from *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* 65: 428-433
54. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC (1999) Molecular characterization of a Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 37: 335-3361
55. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 69: 6999-7009
56. Peres SP, Marches O, Daigle F, Nougayrede JP, Herault F, Tasca C, DeRycke J, Oswald E (1997) A new cytolethal distending toxin (CDT) from

- Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. Mol Microbiol 24: 1095-1107
57. Pickett CL, Cottle DL, Pesci EC, Bikah G (1994) Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. Infect Immun 62: 1046-1051
58. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H (1996) Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp cdtB gene. Infect Immun 64: 2070-2078
59. Pickett CL, Whitehouse CA (1999) The cytolethal distending toxin family. Trends Microbiol 7: 292-297
60. Pierard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol 36: 3317-3322
61. Reida P, Wolff M, Pohls HW, Kuhlmann W, Lehrmacher A, Aleksic S, Karch H, Bockemühl J (1994) An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 281: 534-543
62. Robert-Koch Institut Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004 (2005) Mercedes-Druk, Berlin, S 66
63. Schmidt H, Beutin L, Karch H (1995) Molecular analysis of the plasmidencoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun 63: 1055-1061

64. Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* 66: 1205-1208
65. Schmidt H, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, Dobrindt U, Hacker J, Karch H (2001) Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *se/C* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69 :6863-6873
66. Scott DA, Kaper JB (1994) Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* 62: 244-251
67. Tarr PI (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20: 1-8
68. Tarr PI, Neill MA (1996) Perspective: The problem of non-O157 Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 174: 1136-1139
69. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE (2000) Iha: A novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68: 1400-1407
70. Tarr PI, Neill MA (2001) *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterol Clin North Am* 30: 735-751
71. Toth I, Herault F, Beutin L, Oswald E (2003) Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from

- human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). *J Clin Microbiol* 41: 4285-4291
72. Wong CS, Jelacic S, Habeeb R, Watkins S, Tarr PI (2000) The Risk of hämolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 342: 1930-1936
73. Young VB, Chien CC, Knox KA, Taylor NS, Schauer DB, Fox JG (2000) Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. *J Infect Dis* 182: 620-623
74. Yu J, Kaper JB (1992) Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 6: 411-417

6. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
<i>cdt</i>	Cytolethal distending toxin-Gen
CDT	Cytolethal distending toxin
CHO	Chinese hamster ovary-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
kb	Kilobasen
M	molar, mol/l
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	rotation per minute
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>
<i>stx</i>	Shiga Toxin-Gen
Stx	Shiga Toxin
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA -Polymerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
(w/v)	Gewicht pro Volumen

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H Karch danke ich für das Überlassen der Arbeit und die stets aufbauende Unterstützung.

Ich danke ganz besonders meiner Betreuerin Dr. Martina Bielaszewska für die viele Unterstützung und die unglaubliche Geduld, mit der sie mich jeden Tag unterstützt hat.

Weiterhin danke ich Andreas Janka, Dr. Anne-Katharine Sonntag und dem ganzen Team für die sehr gute Betreuung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann und meinen Eltern für die ausdauernde Ermunterung zur Fertigstellung der Arbeit bedanken.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Demin, Marina (geb. Fell)
Geburtsdatum:	20.11.1978
Geburtsort:	Barnaul, Russland
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

09/1985 – 08/1995	Mittelschule in Novoaltajsk, Russland Abschluss: Abitur (Hochschulzugangsberechtigung)
-------------------	--

Berufsausbildung

09/1995 – 08/1999	Studium an der Staatlichen medizinischen Universität in Barnaul
08/1999 – 12/2000	nach der Umsiedlung in der BRD: Einbürgerungsverfahren, deutscher Sprachkurs und Vorbereitung auf weiteres Studium in Deutschland
04/2001 – 11/2005	Studium an der WWU Münster Fachbereich Humanmedizin
09/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2005	Approbation als Ärztin

Essen, den 14.01.2006