

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

**Strukturelle Polymorphismen von *espP*-Genen in
Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Marie-Luise Bonn

aus Marburg an der Lahn

2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Helge Karch
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen
Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Direktor: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. H. Karch

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. H. Karch

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

Zusammenfassung

Strukturelle Polymorphismen von *espP*-Genen in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*

Marie-Luise Bonn

Die Symptome von Infektionen mit Shiga Toxin-produzierenden *E. coli*-Stämmen (STEC) reichen von unblutigen Durchfällen bis zu hämorrhagischen Kolitiden und dem hämolytisch-urämischem Syndrom. Die große Spanne der klinischen Ausprägungen deutet darauf hin, dass neben dem Hauptvirulenzfaktor Shiga Toxin (Stx) weitere Determinanten Einfluss auf die Pathogenität der verschiedenen STEC-Stämme haben. Ein potenzieller Virulenzfaktor ist die in hochvirulenten Serogruppen weit verbreitete extrazelluläre Serinprotease EspP, die der Gruppe der bakteriellen Autotransporter angehört.

Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Untersuchung der strukturellen Eigenschaften der *espP*-Gene aus STEC-Stämmen. Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, ob Polymorphismen auf genetischer Ebene zu Änderungen der funktionalen Eigenschaften der entsprechenden EspP-Proteine führen. Hierzu wurde die proteolytische Aktivität und die Sekretion von EspP in entsprechenden Wildtyp-Stämmen ermittelt. Die Untersuchung der strukturellen Eigenschaften erfolgte durch Restriktionsenzymanalysen der *espP*-Gene aus verschiedenen STEC. Die Restriktionsmuster zeigten innerhalb der Serogruppen ein weitgehend homogenes Bild. Jedoch unterschied sich das Schnittmuster der Serogruppen O26 und O111 nach Restriktion mit dem Enzym *AluI* von dem der STEC O157. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die proteolytische Aktivität von EspP geprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mittels Restriktionsenzymanalyse nachgewiesenen genetischen Heterogenitäten keine Auswirkungen auf die Funktionalität von EspP haben.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	2
1.1.1 Klinischer Verlauf, Therapie, Infektionsquellen	2
1.1.2 Pathogenese	3
1.1.3 Virulenzfaktoren	3
1.2 Plasmidkodierte extrazelluläre Serinprotease (EspP)	5
1.3 Bezug zu dieser Arbeit	6
2. Material	7
2.1 Laboreinrichtungen und Geräte	7
2.2 Chemikalien	9
2.2.1 Bioreagenzien	9
2.2.2 Sonstige Chemikalien	9
2.3 Verbrauchsmaterial	12
2.4 Medien und Puffer	13
2.5 Bakterienstämme	16
3. Methoden	17
3.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	17
3.2 PCR des <i>espP</i> -Gens	17
3.3 InstaGene™ Matrix-DNA Extraktion	19
3.4 Restriktion der PCR-Produkte	19
3.5 Proteinaufreinigung	20
3.6 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
3.6.1 Probenvorbereitung	22
3.6.2 Vorbereitung der Polyacrylamidgele	22
3.6.3 Pipettierschema für SDS-Gele	23
3.6.4 Herstellung der Polyacrylamidgele	23
3.6.5 Durchführung der Elektrophorese	24
3.7 Coomassie-Färbung	25

3.8 Western-Blotting (Tank-Blot-Verfahren)	25
3.9 Immundetektion	26
3.10 Funktionale Prüfung von EspP: Überprüfung der proteolytischen Aktivität	27
4. Ergebnisse	29
4.1 Nachweis von <i>espP</i> in klinischen EHEC-Isolaten	29
4.2 Entwicklung einer PCR zum Nachweis von <i>espP</i> -Subtypen	29
4.3 Nachweis struktureller Polymorphismen mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	31
4.4 Prüfung der Funktionalität des Autotransporter-Mechanismus und Messung der enzymatischen Aktivität	34
5. Diskussion	37
6. Abkürzungen	40
7. Literatur	42

1. Einführung

1983 kam es in den USA und in Kanada zu mehreren schweren Krankheitsausbrüchen gastrointestinaler Infektionen, begleitet von hämorrhagischen Diarrhöen und Kolitiden (33, 68). Aus Stuhlproben der Erkrankten wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) des bis dahin selten vorgekommenen Serotyps O157:H7 isoliert. Im Rahmen weiterer Forschungen wurde für diesen Serotyp die Produktion eines Zytotoxins nachgewiesen, das mit dem Auftreten des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) assoziiert werden konnte (42). Aufgrund der ähnlichen Struktur und Wirkungsweise des Toxins mit dem Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 (33, 56) wurden diese Toxine ebenfalls als Shiga Toxine (Stx) bezeichnet. Die Produktion von Shiga Toxinen wurde zudem bei weiteren Serotypen nachgewiesen. Diese Gruppe von *E. coli* wurde als Pathovar anerkannt und unter der Bezeichnung Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) zusammengefasst. Eine pathogenetische Untergruppe der STEC stellen die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) dar. Im Infektionsschutzgesetz (IfSG) sind unter diesem Begriff jene STEC zusammengefasst, die beim Menschen Krankheitserscheinungen auslösen können und somit humanpathogen sind. Häufig sind EHEC-Infektionen mit schweren klinischen Verläufen assoziiert, wie dem Vorkommen von hämolytischen Kolitiden und dem HUS. Neben *E. coli* O157:H7, dem häufigsten Erreger bei menschlichen Infektionen, wurden auch bei anderen Serotypen wie O26:H11/H⁻, O91:H21, O103:H2, O111:H8/H⁻, O113:H21, O145:H25/28/H⁻ und O157:H⁻ humanpathogene Eigenschaften nachgewiesen (4, 10, 19, 23, 31, 32, 41, 62). EHEC besitzen zusätzlich zu Stx meist weitere Virulenzfaktoren, wie z.B. das *eae*-kodierte Intimin (37, 41, 47, 58).

1.1 Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

1.1.1 Klinischer Verlauf, Therapie, Infektionsquellen

Nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen (78) entwickeln infizierte Patienten wässrige Diarrhöen, die häufig begleitet werden von krampfartigen Bauchschmerzen. Fieber wird nur in seltenen Fällen beobachtet. Bei einem Teil der Patienten entwickelt sich nach ein bis zwei Tagen aus der wässrigen Diarrhoe eine hämorrhagische Kolitis (HK) (78), die sich koloskopisch mit Ödemen, Erosionen und/oder Hämorrhagien der Kolonmukosa darstellt (67).

Bei schweren Krankheitsverläufen kommt es im Rahmen der Infektion zu systemischen Komplikationen wie dem HUS. Das Syndrom ist definiert als Trias aus mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und Niereninsuffizienz (22). HUS stellt die häufigste Ursache für akutes Nierenversagen im Kindes- und Jugendalter dar (8). Es führt in circa zwei Drittel der Fälle zur Dialysepflichtigkeit und nimmt in einem bis drei Prozent einen letalen Ausgang (8).

Die Therapiemöglichkeiten einer Infektion sind aktuell auf die Behandlung der Symptome beschränkt. Von einer kausalen Therapie der EHEC-Infektion mit Antibiotika wird abgeraten, da diese möglicherweise zu einer verstärkten Freisetzung von Stx führt (6, 71) und hierdurch die Entstehung von HUS begünstigen könnte (6, 24, 71, 77).

Aufgrund der mangelnden kausalen Therapiemöglichkeiten kommt der Prävention besondere Beachtung zu. Hierzu ist das Wissen über die Infektionswege von Bedeutung. Das Hauptreservoir von EHEC sind landwirtschaftliche Nutztiere (vor allem Rinder) (24). Diese sind meist mit den enterohämorrhagischen *E. coli* kolonisiert, ohne jedoch klinische Symptomatiken aufzuweisen. Bei der Schlachtung und beim Melken kann es zur Fäkalkontamination kommen, die bei Verzehr von rohem, infiziertem Fleisch („Burger disease“) oder anderen tierischen Produkten zur Übertragung auf den

menschlichen Organismus führt. Weitere Infektionswege sind die Tier-zu-Mensch-Übertragung durch fäkal-orale Schmierinfektionen, zum Beispiel bei einem direkten Kontakt zwischen Kind und Tier in Streichelzoos, und die Mensch-zu-Mensch-Übertragung (74).

1.1.2 Pathogenese

Über die beschriebenen Infektionswege gelangen die EHEC-Bakterien in den Darm des Wirtes. Durch Ausbildung einer „Attaching and Effacing“-Läsion (A/E-Läsion) (40, 83), wie sie bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC) beschrieben wurde (52), adhären die Erreger sehr stabil an die Darmmukosazellen. Im Gegensatz zu enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) sind EHEC-Bakterien nicht invasiv und daher nur äußerst selten in Blutkulturen nachweisbar (41). EHEC interagieren mit dem Wirtsorganismus, indem sie verschiedene Virulenzfaktoren freisetzen (z.B. Stx, Intimin, EspP, EHEC-Hämolysin). Stx ist das bislang bestuntersuchte Toxin und wird als Hauptvirulenzfaktor angesehen. Für die Pathogenese von HUS ist vor allem die Entdeckung der toxischen Wirkung auf Kapillar-Endothelzellen speziell im glomerulären Apparat, aber auch auf das Gefäßsystem im zentralen Nervensystem (ZNS), von Bedeutung (24, 57, 79). Es wird angenommen, dass Stx der Hauptverursacher von mikrovaskulären Thromben ist (66). Ein weiterer Trigger des pathogenen Prozesses an den Endothelzellen könnte die Freisetzung von Immunmediatoren wie Interleukin-1 β und TNF- α sein (43, 65, 79).

1.1.3 Virulenzfaktoren

Als Hauptpathogenitätsfaktoren von EHEC werden die zytotoxisch und enterotoxisch wirkenden Stx angesehen (53, 57, 79). Die für die Stx kodierenden Gene sind im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen inseriert (29). Man unterscheidet in Stx1 und Stx2, wobei sich beide Subtypen in weitere Phänotypen mit genotypisch variierenden Sequenzhomologien aufteilen (57). Aus Mangel an adäquaten Tiermodellen kann trotz der molekularen Erkenntnisse keine eindeutige Aussage über den Einfluss von Stx auf die EHEC-Pathogenese gemacht werden. Es gibt Hinweise auf eine

Assoziation zwischen dem Vorkommen von Stx2 und der Schwere der klinischen Ausprägung (21).

Neben dem Hauptpathogenitätsfaktor Stx sind viele weitere Virulenzfaktoren an der Ausprägung der Pathogenese beteiligt. Für die Ausbildung einer A/E-Läsion trägt die chromosomal kodierte Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyte effacement) alle bekannten Virulenzfaktoren (49). Das LEE-Gen *eaeA* kodiert für das Protein Intimin, das für die Ausbildung einer A/E-Läsion obligat ist (18, 48). Zusätzlich kodiert LEE unter anderem für ein TypIII-Sekretionssystem (30) und weitere Proteine, die an der Ausbildung einer A/E-Läsion beteiligt sind (EspA, EspB und EspD) (44, 45). Ein weiterer potenzieller Virulenzfaktor ist das CDT (cytolethal distending toxin). CDT wird von der Wirtszelle internalisiert und unterbricht durch seine DNase Funktion den Zellzyklus, wodurch die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (5, 46, 80). Daher zählt CDT zu der Gruppe der Zyklomodule (60).

Nahezu alle klinisch isolierten EHEC-Stämme besitzen ein circa 90 kb (60 MDa) großes Plasmid, auf dem sich die Gene weiterer potenzieller Pathogenitätsfaktoren befinden (7, 20, 39, 59, 61, 81). Zu den plasmidkodierten Proteinen zählen u.a. die Katalase-Peroxidase (KatP) und das EHEC-Hämolyysin (EHEC-Hly) (12). EHEC-Hly ist ein Vertreter der RTX (repeats in toxin)-Familie von porenbildenden Zytotoxinen, die eine zytotoxische Wirkung auf humane und bovine Zelllinien haben (1, 3, 72, 73).

Die extrazelluläre Serinprotease EspP ist ebenfalls plasmidkodiert (13). Es konnte nachgewiesen werden, dass EspP durch Spaltung des humanen Gerinnungsfaktors V in der Lage ist, in die Gerinnungskaskade einzugreifen (13). Hierdurch könnte EspP eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von hämorrhagischen Diarrhöen und hämorrhagischen Kolitiden zukommen. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die vor allem in hochvirulenten Serogruppen weit verbreitete extrazelluläre Serinprotease EspP eingehend untersucht (12).

1.2 Plasmidkodierte extrazelluläre Serinprotease (EspP)

EspP ist ein Autotransporter-Protein und wird als 141,8 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert. Autotransporter stellen eine Proteingruppe dar (26, 27), die per definitionem innerhalb eines einzelnen Moleküls alle nötigen Komponenten für die Translokation durch das Periplasma und die äußere Membran von gram-negativen Bakterien besitzen (15, 27, 28, 64). Dieser Autotransporter-Sekretionsweg wird auch als Typ V-Sekretionsweg bezeichnet (26). Ein Autotransporter-Protein besteht aus drei funktionalen Domänen: N-terminale Signalsequenz, biologisch aktive Passenger-Domäne und C-terminale beta-Domäne (26). Über den Sec-Mechanismus führt die N-terminale Signalsequenz den Autotransporter durch die innere Membran. Die Sekretion durch die äußere Membran wird durch die C-terminale beta-Domäne vermittelt, deren Struktur kürzlich in einer Studie aufgeklärt werden konnte (2). Sie baut eine als beta-barrel bezeichnete Pore in die äußere Membran ein und ermöglicht somit den Transport der Passenger-Domäne in das extrazelluläre Milieu.

Bei einer Gruppe von Autotransporter-Proteinen, so auch bei EspP, wird das Protein in den Extrazellularraum durch Abspaltung der in der äußeren Membran verbleibenden C-terminalen beta-Domäne freigesetzt. In zahlreichen Studien wurde dieser Mechanismus eingehend charakterisiert (2, 14, 63, 75, 76, 82). So konnte für EspP des Serotyps 0157:H7 *in vitro* nachgewiesen werden, dass es einen autoproteolytischen Prozess zur Abspaltung der Passenger-Domäne durchläuft (14).

Innerhalb der Gruppe der Autotransporter-Proteine wird die Unterfamilie der Serinprotease-Autotransporter (SPATE) unterschieden (13, 27, 28). Neben EspP sind dieser Gruppe weitere Serinproteasen wie EspC aus enteropathogenen *E. coli* (EPEC), Pic aus enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) und das auf der Pathogenitätsinsel LPA kodierte EspI aus enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) (25) zugehörig. Die für den Transport zuständigen Domänen weisen hohe Homogenität auf, während die enzymatisch

aktiven Passenger-Domänen deutliche Heterogenität in der Aminosäuresequenz und der biologischen Funktion zeigen (17). Diese Heterogenität zeichnet sich auf Proteinebene durch unterschiedliche Aktivitäten und Substrataffinitäten aus (8, 14). So zeigt EspP proteolytische Aktivität gegenüber Schweine-Pepsin A und dem humanen Koagulations-Faktor V (13). Substrate anderer SPATE sind außerdem u.a. Mucin und erythroides Spectrin (17).

1.3 Bezug zu dieser Arbeit

Die große Variation der klinischen Ausprägung bei STEC-Infektionen deutet darauf hin, dass Stx nicht der einzige an der Pathogenese beteiligte Virulenzfaktor ist. Es muss davon ausgegangen werden, dass weitere Faktoren ausschlaggebenden Einfluss auf die Pathogenität der Stämme nehmen und somit an der Entwicklung von enterohämorrhagischen Verläufen und systemischen Komplikationen beteiligt sind (1, 40, 50, 72, 83). Ein potenzieller Virulenzfaktor ist die extrazelluläre Serinprotease EspP. EspP ist vor allem unter den hochvirulenten Serogruppen O157 und O26 weit verbreitet (13). *In vitro* konnte für EspP in einem Prototypen-Stamm die proteolytische Spaltung des humanen Gerinnungsfaktors V nachgewiesen werden (13). Bei Wildtyp-Stämmen wurde bisher noch keine ähnliche proteolytische Funktionalität überprüft.

Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Untersuchung der strukturellen Eigenschaften der *espP*-Gene aus Stämmen hochvirulenter STEC-Serotypen. Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, ob Polymorphismen auf genetischer Ebene zu Änderungen der funktionalen Eigenschaften der entsprechenden EspP-Proteine führen. Hierzu wurden die proteolytische Aktivität und die Autotransportaktivität von EspP in entsprechenden Wildtyp-Stämmen analysiert und mit den strukturellen Eigenschaften auf genetischer Ebene korreliert.

2. Material

2.1 Laboreinrichtungen und Geräte

Agarose-Gelkammer	Bioplastics, Landgraaf, NL Comphor Midi und Mini
Auswertungsprogramm	Bio-Rad, München Chemidoc [®] XRS, Photoimager
Blot Apparatur	Bio-Rad, München Mini Trans Blot Cell
Brutschrank	Heraeus, Hanau FUNCTION line
Kühlschränke	Liebherr-International AG, Bulle, CH - Liebherr Comfort - Liebherr Profiline GFL 6485
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main Micromat
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen Tpersonal Tgradient
Photo-Imager	Bio-Rad, München Universal Hood II

Reader für Mikrotiterplatten	Dynex Technologies OpsysMR
Schüttelinkubator	B. Braun Biotech, Melsungen CERTOMAT® IS
SDS-PAGE Apparatur	Bio-Rad, München Mini-Protean II
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg Thermomixer Comfort
Transformator	Biozym, Hess. Oldendorf Consort E 143
Vortexer	Merck, Darmstadt Merck® Eurolab
Waage	OHAUS, Scout II
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg Centrifuge 5415D, Heraeus, Hanau Multifuge 4KR

2.2 Chemikalien

2.2.1 Bioreagenzien

Antikörper

Meerrettich Peroxidase-konju- Dianova, Hamburg
gierter Ziegen anti-
Kaninchen AK

Kaninchen anti-EspP*-His gemäß Werner Brunder
Dissertationsschrift 1997

Enzyme

Taq-DNA-Polymerase peQlab, Erlangen
DraI New England Biolabs, Frankfurt am Main
RsaI New England Biolabs, Frankfurt am Main
AccI New England Biolabs, Frankfurt am Main
SspI New England Biolabs, Frankfurt am Main

Oligonukleotid

Primer espA, espB Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany
Primer espP long F/R Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany

2.2.2 Sonstige Chemikalien

Agarose Roth, Karlsruhe
Agarose NEEQ Ultra Qualität

Ala-Ala-Pro-Leu-pNA Bachem, Weil am Rhein, Deutschland

Ammoniumperoxodisulfat Roth, Karlsruhe

Ammoniumsulfat Merck, Darmstadt
für biochemische Zwecke

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
DNA-Ladder	Invitrogen, 1 kb Invitrogen, 100 bp
dNTP	peQlab, Erlangen
EDTA p.a.	AppliChem, Darmstadt Dinatrium-Dihydrat
Enhancer	peQlab, Erlangen
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München Ethidium Bromide
Glycin, p.a.	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	DIFCO Laboratories, Detroit, USA Yeast Extract
H ₂ O p.a.	Merck, Darmstadt
HEPES	Promega, Mannheim 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- Ethansulfonsäure Natriumsalz
low molecular weight protein marker	Amersham, Biosciences Little Chalfont, Buckinghamshire, England

Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	peQlab, Erlangen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Fluka Buchs, CH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Pepsin	Roche, Mannheim (Schweinepepsin A)
Pepton	Roth, Karlsruhe aus Soja, für die Mikrobiologie
Poly(oxy-1,2-ethandiyl)- monododekansäure- sorbitylester (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl) Aminomethan	Roth, Karlsruhe Tris Ultra

Trypton
Becton, Dickinson and Company, NY, USA
Bacto™ Tryptone

Western Pico Chemi-
lumineszenz-Substrat
Pierce, Rockford, IL, USA

2.3 Verbrauchsmaterial

Filter, steril
Corning, NY, USA
0,2 µm SFCA Membran

FPLC-Säule
GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Hi Trap Benzamidine FF

InstaGene™ Matrix
Bio-Rad, München

Kolbenhubpipetten
Eppendorf, Hamburg
Reference

Mikrotitrationsplatte
Diagonal, Münster
U-Form bzw. F-Form

Nadeln
Becton, Dickinson and Company, NY, USA
Mikrolance™ 3

PCR-tubes
Abgene, Hamburg
0,2 ml Thermo-Strip

Protran Nitrozellulose Membrane	Schleicher&Schuell, Erdmannhausen
Spritzen	Becton, Dickinson and Company, NY, USA Discardit™ II 5 ml
Ultrafilter	Sartorius, Göttingen Vivaspin, 10000 MWCO PES

2.4 Medien und Puffer

Bakterienanzucht:

LB-Agar nach Lennox

Zusammensetzung:

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar Agar	15 g/l

LB-Medium
nach Lennox

Zusammensetzung:

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

DNA-Analyse:

Agarose-Gel Konzentrationen von 0,7% (w/v) bis 2% (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer

10 x Reaktionspuffer
„Bluestop“

peQlab, Erlangen
Reaktionspuffer Y

10 x DNA
Probenpuffer

Zusammensetzung:
Bromphenolblau 0,1% (w/v)
Xylencyanol FF 0,1% (w/v)
EDTA 25 mM
Glycerin 50% (w/v)

TBE-Puffer

Zusammensetzung:
Tris 54 g
Borsäure 27,2 g
EDTA 0,5 M 20 ml
H₂O 1 l

NEB 2 Puffer New England Biolabs, Frankfurt am Main

NEB 4 Puffer New England Biolabs, Frankfurt am Main

Sspl Puffer New England Biolabs, Frankfurt am Main

Protein-Analyse:

HEPES Puffer

Zusammensetzung:
10 mM HEPES
150 mM NaCl, pH 7,4

Elutionspuffer

Zusammensetzung:
0,05 M Glycin
pH 3

Bindepuffer

Zusammensetzung:
0,05 M Tris-HCL
0,5 M NaCl
pH 7,4

Tris-Puffer

Zusammensetzung:

0,75 M Tris

pH 8,8

2.5 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme der Serogruppen O111, O26, O157

Serotyp	Stammbezeichnung	Serotyp	Stammbezeichnung
O111:H ⁻	4791/97	O157:H7	3984/00
O111:H ⁻	4794/97	O157:H7	4510/00
O111:H ⁻	4796/97	O157:H7	4301/00
O26:H ⁻	4166/94	O157:H7	4589/00
O26:H11	144/91	O157:H7	4712/00
O26:H11	5236/96	O157:H7	4851/00
O26:H ⁻	2150/98	O157:H7	4805/00
O26:H ⁻	3901/97	O157:H7	2540/1
O26:H ⁻	7661/96	O157:H7	4644/99
O26:H11	1448/97	O157:H7	2765/99
O26	5631/96	O157:H7	1702/99
O157:H7	4968/00	O157:H7	297/99
O157:H ⁻	2782/99	O157:H7	335/99
O157:H7	3527/00	O157:H7	2539/99
O157:H7	4734/00	O157:H7	4353/00
O157:H7	4789/00	O157:H7	4895/00
O157:H7	3626/00	O157:H7	4933/00
O157:H7	3526/00	O157:H7	4932/00
O157:H7	3718/00		

3. Methoden

3.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Abhängig von der zu erwartenden Basenpaarlänge der DNA-Fragmente wurden Agarose-Gele in den Konzentrationen von 0,7% bis 2% wie folgt angesetzt: Die entsprechende Menge an Agarose in Pulverform wurde unter Erhitzen in 0,5-fach TBE-Puffer gelöst. Die Lösung wurde bei 55°C im Brutschrank gelagert. Zur Anfertigung der Gele wurde die Lösung in den Gießblock gegossen und nach Erstarren in der Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer überschichtet. 10 µl der Probenansätze wurden mit 3 µl 5-fach Probenpuffer versetzt und in die Gelkammern pipettiert. Zur Identifikation der Banden lief je nach Fragmentgröße die 1 kb oder 100 bp DNA-ladder mit. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte im Photoimager im Trans-UV Modus.

3.2 PCR des *espP*-Gens

Für die Durchführung der PCR wurde die mittels InstaGeneTM-Matrix aufgereinigte DNA verwendet. Hierzu wurden zu 5 µl Template-DNA-Lösung folgende Reagenzien pipettiert. Der Gesamtansatz hatte ein Volumen von 50 µl.

Template-DNA-Lösung	5 µl
Reaktionspuffer	5 µl
Enhancer	10 µl
dNTP-Mix	1 µl
Upstream Primer	1 µl
Downstream Primer	1 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,8 µl
H ₂ O p.a.	24,7 µl

PCR(long)

Primer:

espPlong 1: 5'-CGC TGT TTC TGA ATT ATC CGG CA-3'

espPlong 2: 5'-CAA CGG ACA TCA GCA TAC GGC-3'

Programm:

Denaturierung:	94°C	15 s	30 Zyklen	
Hybridisierung	56°C	30 s	30 Zyklen	dt 10°C
Polymerisation	68°C	180 s	30 Zyklen	ab 11. Zykl. dt 5 s
Polymerisation	68°C	420 s	1 Zyklus	

Zur Untersuchung der Amplifikation des gewünschten Genabschnittes wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das zu erwartende PCR-Produkt hatte eine Größe von 3760 bp.

PCR(AB) (17)

Primer:

esp-A: 5'-AAA CAG CAG GCA CTT GAA GC-3'

esp-B: 5'-GGA GTC GTC AGT CAG TAG AT-3'

Programm:

Denaturierung:	94°C	30 s	30 Zyklen	
Hybridisierung	56°C	60 s	30 Zyklen	
Polymerisation	72°C	150 s	30 Zyklen	
Polymerisation	72°C	300 s	1 Zyklus	

Zur Untersuchung der Amplifikation des gewünschten Genabschnittes wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das zu erwartende PCR-Produkt hatte eine Größe von 1830 bp.

3.3 InstaGene™ Matrix-DNA Extraktion

Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die InstaGene™ Matrix bei mittlerer Geschwindigkeit (400 U/min) gemixt. Jeweils 2 bis 3 Bakterienkolonien wurden in 500 µl H₂O p.a. eingerührt, homogenisiert und 1 min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des abpipettierten Überstands wurde das Pellet in 100 µg InstaGene™ Matrix gegeben und unter Durchmischung 20 min bei 56°C inkubiert. Der Ansatz wurde im Vortexer durchmischt und 8 min bei 100°C inkubiert, erneut durchmischt und bei 12.000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der die DNA enthaltende Überstand (ca. 80 µl) wurde in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach der erfolgten Extraktion wurde die DNA bei -20°C gelagert.

3.4 Restriktion der PCR-Produkte

10-15 µl des PCR-Produktes wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in der jeweiligen Pufferlösung versetzt und die Ansätze bei 37°C für 2,5 Stunden im PCR-Cycler inkubiert (siehe Tabelle 2). Abhängig von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden die Produkte des Restriktionsverdau in einem 1,3% bis 2% Agarose-Gel bei einer Spannung von 80 V getrennt. Die Gelbanden wurden im Ethidiumbromidbad für 20 min gefärbt und im Anschluss mittels Photoimager analysiert. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

Tabelle 2: Restriktionsansätze

Restriktion	<i>AluI</i>	<i>SspI</i>	<i>AccI</i> + <i>DraI</i>	<i>RsaI</i>
PCR-Produkt	long 15 µl	long 15 µl	long 10 µl	long 10 µl
Restriktions- enzym	5 Units 0,5 µl	5 Units 1 µl	5 Units 0,5 µl <i>AccI</i> 0,25 µl <i>DraI</i>	5 Units 0,5 µl
Puffer	Puffer 2 1,5 µl	<i>SspI</i> Puffer 2,5 µl	Puffer 4 2,5 µl	Puffer 4 2,5 µl
H ₂ O	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl
Agarose-Gel	1,5%	1,5%	1,5%	2%

3.5 Proteinaufreinigung

Die Stämme wurden über Nacht in 50 ml Luria-Bertani Medium bei 37°C angezchtet und währenddessen im Schüttelinkubator ständig durchmischt. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (6000 x g, 30 min, 4°C) und der Kulturüberstand steril filtriert (Porengröße 0,2 µm). Es folgte die Ausfällung der Proteine durch Aufsättigung mit Ammoniumsulfat auf 55% (1 h, 4°C). Das durch erneute Zentrifugation (6000 x g, 30 min, 4°C) gewonnene Pellet wurde in 500 µl 10 mM HEPES Puffer mit 150 mM NaCl (pH 7,4) gelöst.

Die Ansätze wurden bei -70°C gelagert. Die weitere Reinigung der EspP-Proben erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Hi Trap Benzamidine FF-Säule. Benzamidin ist ein Serinproteasenhemmer, der Serinproteasen aus der Lösung an die Säule binden kann und es somit ermöglicht, weitere Verunreinigungen von der Säule waschen zu können. Zur Wiedergewinnung von EspP wurde im Sauren eluiert.

Die aufgetauten Proben wurden vor der Beladung in einem Gesamtvolumen von 4 ml Bindepuffer aufgenommen. Nach Equilibrierung der Säule wurde diese

mit der Probe beladen und im Folgenden mit 10 ml Bindepuffer gewaschen. Zur Elution von EspP wurde die Säule mit 5 ml Elutionspuffer behandelt. Alle Schritte wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min an der Säule durchgeführt.

Zur Aufkonzentrierung und zum Wechsel des Puffers wurden die Proben zweimal mittels Mikrofiltertubes auf ein Volumen von 200 µl reduziert und in HEPES Puffer überführt.

Sämtliche Fraktionen der Reinigung wurden aufgefangen und im SDS-Gel auf ihren Proteingehalt analysiert. Der Vergleich der Bandenmuster von nicht gereinigtem und säulengereinigtem EspP zeigte einen deutlichen Reinigungseffekt (Kap. 4.4, Abb. 5).

3.6 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinaufarbeitungen des Kulturüberstandes wurden mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt (Kapitel 3.6). Zur Detektion von EspP wurde nach erfolgter Elektrophorese entweder mit Coomassie Blau gefärbt (Kapitel 3.7) oder zur weiteren Untersuchung im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (Kapitel 3.8) und mittels EspP-Antikörpern nachgewiesen (Kapitel 3.9).

3.6.1 Probenvorbereitung

5x Probenpuffer:

15,6 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8

5 g SDS

25 ml Glycerin

12,5 ml Mercaptoethanol

1 Spatelspitze Bromphenolblau

Gesamtvolumen: 53,1 ml

In Aliquoten Lagerung bei -20°C

15 µl der zu untersuchenden Proteinprobe wurden mit 5 µl 5x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99°C im Thermomixer erhitzt. Danach wurde die Probe kurz zentrifugiert.

3.6.2 Vorbereitung der Polyacrylamidgele

Reagenzien-Lösungen für SDS-Gele

0,75 M Tris-HCl

45,43 g Tris in

ca. 400 ml A. bidest. lösen, pH 8,8 einstellen und

ad. 500 ml A. bidest. auffüllen, bei 4°C lagern

0,25 M Tris-HCl

6,06 g Tris in

ca. 150 ml A. bidest. lösen, pH 6,8 einstellen und

ad. 200 ml A. bidest. auffüllen, bei 4°C lagern

10% SDS

1 g SDS in

10 ml A. dest. lösen, bei Raumtemperatur lagern.

10% Ammoniumperoxodisulfat

1 g Ammoniumperoxodisulfat in 10 ml A. bidest. lösen und in maximal 1 ml Portionen bei -20°C lagern.

3.6.3 Pipettierschema für SDS-Gel

11,5%iges Trenngel (für 2 Gele)

7 ml 0,75 M Tris-HCl pH 8,

1,15 ml Aqua. dest.

280 µl 10% SDS

5,1 ml Rotiphorese Gel 30

35,5 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

28 µl TEMED

6,4%iges Sammelgel (für 2 Gele)

5 ml 0,25 M Tris-HCl pH 6,8

3,3 ml Aqua dest.

100 µl 10% SDS

2,2 ml Rotiphorese Gel 30

25 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

20 µl TEMED

3.6.4 Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Reagenzienlösungen zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels wurden jeweils in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und vorsichtig durchmischt. Der Start der Polymerisationsreaktion durch APS erfolgte erst direkt vor dem Befüllen der Gelkammern. Die Lösung für das Trenngel wurde in der Gelkammer mit Isopropanol überschichtet und für mind. 30 min zur Polymerisation stehen gelassen. Zum Überschichten des Trenngels mit dem Sammelgel wurde nach Erstarren des Trenngels der Isopropanol-Überstand abgegossen und die mit APS versetzte Sammelgel-Lösung in die Kammer pipettiert. Die Probenkämme wurden in die noch flüssige Sammelgel-Lösung

eingesteckt und die Gelkammern zur Polymerisation für mind. 30 min stehen gelassen.

3.6.5 Durchführung der Elektrophorese

Elektrophoresepuffer (gebrauchsfertig)

2 g SDS (Endkonzentration 0,1%)

6 g Tris (Endkonzentration 25 mM)

29 g Glycin (Endkonzentration 192 mM)

ad 2 l A. bidest. pH 8,2

Nach dem Aushärten der Gele wurden die Gelkammern gemäß Herstellerangaben in den Geltank eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Die Kämme wurden entfernt und jeweils max. 20 µl der entsprechend vorbereiteten Proben in die Probentaschen des Gels eingefüllt. Die Proben wurden bei einer Stromstärke von 15 mA elektrophoretisch getrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront die Unterkante des Trenngels erreicht hatte.

3.7 Coomassie-Färbung

Färbelösung

0,7 g Coomassie Brilliantblau R250

23 ml Essigsäure 96%

110 ml Methanol p.a.

110 ml Aqua dest.

Entfärbelösung

60 ml Essigsäure 96%

180 ml Methanol p.a.

760 ml Aqua dest.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele gemäß Herstellerangaben aus der Kammer entnommen und in einer Färbeschale (15 cm x 15 cm) auf der Reagenzienwippe unter Schwenken für ca. 20 min inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend abgegossen und die Gele mit Entfärbelösung überschichtet und auf der Reagenzienwippe bis zur Entfärbung des Gelhintergrundes geschwenkt.

3.8 Western-Blotting (Tank-Blot-Verfahren)

Pufferlösungen

5-fach Blotpuffer:

15 g Tris

72 g Glycin

ad. 1 l A. bidest.

gebrauchsfertige Lösung:

200 ml 5-fach Blotpuffer

200 ml Methanol

600 ml A. bidest.

Zum Western-Blot der Proteinproben wurde das Acrylamid-Gel nach Beendigung der Elektrophorese mittels Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierzu wurden angefeuchtetes Blotpapier, Nitrozellulose-Membran, Gel und eine weitere Lage Blotpapier luftblasenfrei aufeinander geschichtet und in die Halterung einer Mini-Trans-Blot-Zelle so eingebaut, dass sich die Blotmembran auf der Anodenseite befand. Der Transfer erfolgte bei konstantem Strom von 20 mA für 2 h.

3.9 Immundetektion

TBS (10-fach konzentriert)

24,2 g Tris (Endkonzentration 200 mM)

87,6 g NaCl (Endkonzentration 1500 mM)

ad 1 l A. dest; pH 7,5

TBS-Tween (TBST)

TBS (1-fach; Konzentrationen: Tris 20 mM, NaCl 150 mM)

0,05% Tween 20

Blockierungslösung

TBST (1-fach)

Zur Immunodetektion von EspP wurde die Nitrozellulose-Membran zur Blockierung zunächst mind. 1 h mit TBST auf der Reagenzienwippe bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit TBST gewaschen. Die Blotmembran wurde anschließend mit dem anti-EspP Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 über Nacht auf der Reagenzienwippe inkubiert und nach Beendigung der Inkubation dreimal mit TBST gewaschen. Die Inkubation des anti-rabbit-POD Zweitantikörpers (1:40.000 verdünnt) erfolgte anschließend für max. 120 min auf der Reagenzienwippe. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen und anschließend mit jeweils 1 ml Chemilumineszenz-Substrat für 5 min im Dunkeln entwickelt. Die Dokumentation des Blots erfolgte am Photoimager mittels CCD-Kamera.

3.10 Funktionale Prüfung von EspP: Überprüfung der proteolytischen Aktivität

Spaltung von Pepsin

Zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität von EspP wurden 20 µg Pepsin A mit 1 µg gereinigtem EspP in 25 µl 10 mM HEPES Puffer inkubiert (15 h, 37°C). Die Proben wurden auf ein 12%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und an ein elektrisches Feld angeschlossen. Die Reaktionsprodukte wurden durch Coomassie Blau gefärbt. Der EspP-produzierende Klon DH5α(pB9-5) trägt das *espP*-Gen vom *E. coli* Stamm O157:H7 EDL933 (13). Er wurde als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle fungierte der Kontrollstamm DH5α(pK18) (13).

Spaltung von Oligopeptidsubstraten

Zur weiteren Funktionsanalyse von EspP wurde die Spaltung des Oligopeptidsubstrats Ala-Ala-Pro-Leu-pNA analysiert. EspP ist in der Lage, para-Nitroanillin aus dem Substrat durch Spaltung freizusetzen. Das freigesetzte para-Nitroanillin ist photometrisch bei 405 nm nachweisbar. Durch die Differenz der

Absorptionsrate vor und nach Reaktionsablauf lässt sich die proteolytische Aktivität von EspP bestimmen.

Die 2 mM Substratlösung wurden mit 1 µg gereinigtem EspP inkubiert (15 h, 37°C). Ein Totalvolumen von jeweils 100 µl wurde auf eine 96-well Mikrotiterplatte zur weiteren Messung pipettiert. Die Absorptionsrate wurde nach 0 Minuten und nach 15 Stunden bei 405 nm durch einen Mikrotiterplattenleser bestimmt. Ab einer Differenz der Absorptionsrate von $\geq 0,03$ Einheiten, wurden die Proben als proteolytisch aktiv definiert. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden die gleichen Proben wie bei der Spaltung von Pepsin verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis von *espP* in klinischen EHEC-Isolaten

Bei insgesamt 158 EHEC-Bakterienstämmen aus drei verschiedenen Serogruppen (O157, O26, O111) wurde die Prävalenz von *espP* durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermittelt. Die hierfür verwendeten Primer der PCR(AB) (11) amplifizieren einen 1830 bp langen Genabschnitt des 3900 bp großen *espP*-Gens (47% des Gens). Die Anwendung dieser Methode führte zu folgendem Ergebnis: Bei den O157:H7-Stämmen waren 100% positiv (81/81). Dahingegen waren die O26:H11/H⁻-Stämme zu 62,2% (8/13) und die O111:H8/H⁻-Stämme zu 4,7% (3/64) positiv. Die auffallende Divergenz der Prävalenz von *espP* innerhalb der drei Serogruppen (100% bis 4,7%) ließ die Frage aufkommen, ob neben dem Unterschied in der Prävalenz auch Serogruppen-spezifische strukturelle Unterschiede bzw. funktionale Differenzen von EspP existieren. Die Struktur von *espP* wurde im Folgenden mittels Restriktionsanalysen untersucht und verglichen.

4.2 Entwicklung einer PCR zum Nachweis von *espP*-Subtypen

Um die Aussagekraft der Restriktionsanalyse zu erhöhen, wurde eine neue PCR entwickelt, die im Folgenden als PCR(long) bezeichnet wird. Durch die neue Primerkombination können *espP*-Genfragmente mit einer Länge von 3760 bp amplifiziert werden. Dieses PCR-Produkt repräsentiert 96,4% des gesamten *espP*-Gens. Somit kann beinahe das komplette *espP*-Gen untersucht und eine Aussage über seine Struktur getroffen werden (Abb. 1).

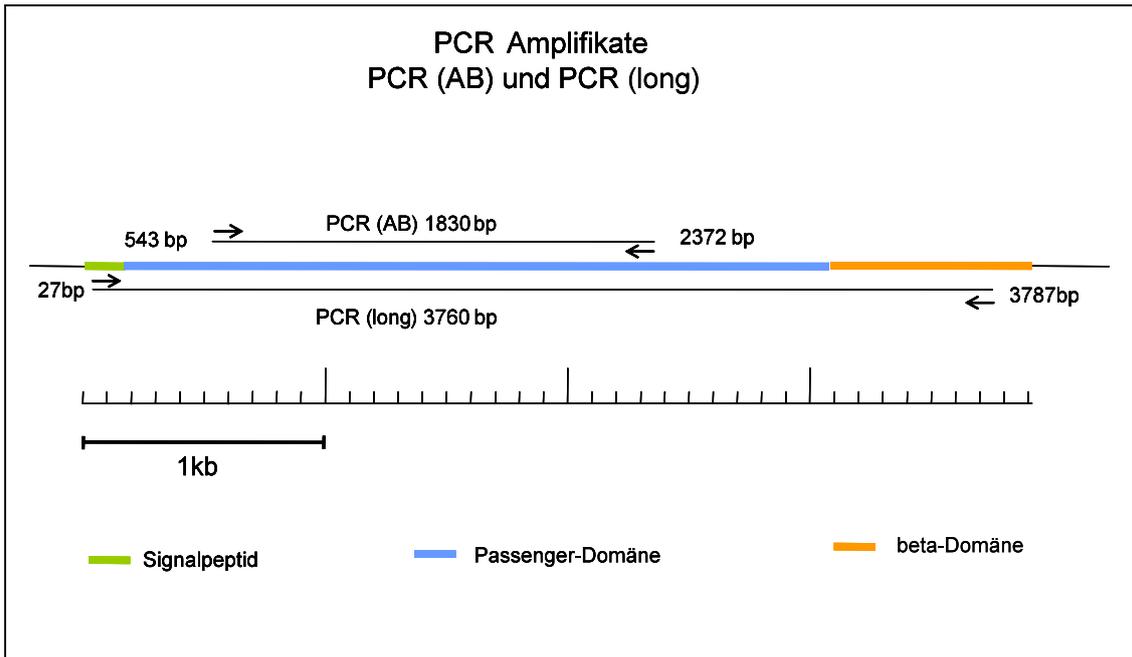


Abb. 1: Gegenüberstellung von PCR(AB) und PCR(long) unter Angabe der Primeransatzstellen. Die Pfeile markieren die Leserichtung.

4.3 Nachweis struktureller Polymorphismen mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Die 3760 bp langen PCR-Produkte einer repräsentativen Auswahl von 37 EHEC-Stämmen wurden im Folgenden auf ihre strukturellen Unterschiede hin untersucht. Hierzu wurden die Genfragmente mit fünf unterschiedlichen Restriktionsenzymen (*Accl*, *DraI*, *RsaI*, *SspI*, *AluI*) verdaut und die jeweiligen Schnittmuster miteinander verglichen. Da alle Stämme ein Amplifikat der erwarteten Länge aufwiesen, konnte das Vorkommen von größeren Insertionen oder Deletionen bei den getesteten Stämmen ausgeschlossen werden. Im Restriktionsverdau mit *RsaI*, *SspI*, *Accl* und *DraI* ließen sich keine Differenzen im Restriktionsmuster der Serogruppen oder Stämme beobachten (Abb. 2).

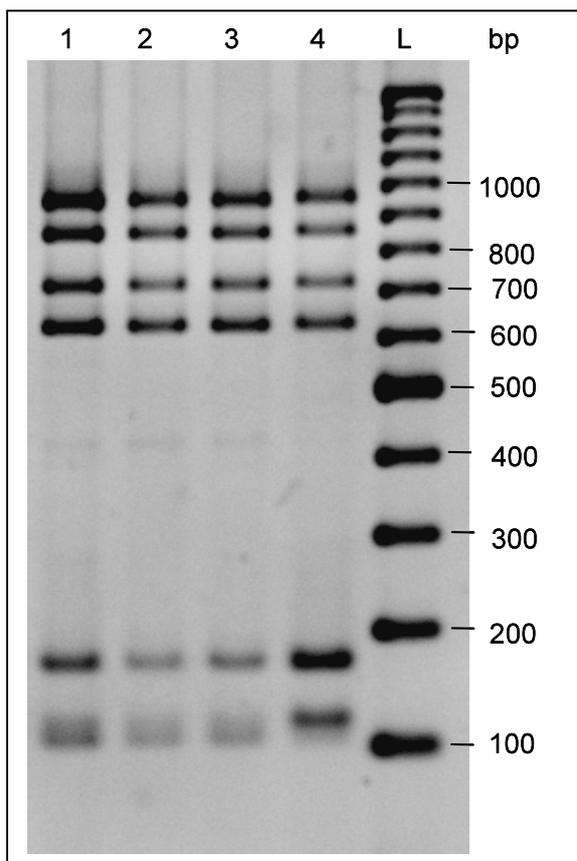


Abb. 2:

Agarose-Gelelektrophorese des *SspI* Verdauens der Serogruppen O157 und O111: Keine Differenzen im Restriktionsmuster der Serogruppen oder Stämme nachweisbar.

1: O157:H7 4895/00

2: O157:H7 4933/00

3: O157:H7 4932/00

4: O111:H⁻ 4791/97

L: 100 bp ladder

Die Restriktion mit *AluI* jedoch zeigte Serogruppen-spezifische Unterschiede im Schnittmuster auf (Abb. 3): Neben den Schnittstellen, welche die Serogruppe O157 aufwies, zeigten die Serogruppen O26 und O111 eine zusätzliche Schnittstelle (Abb. 4A). Innerhalb der O157 Stämme präsentierten die Stämme O157:H⁻ 4805/00, O157:H7 4644/99 und O157:H⁻ 297/99 einheitlich ein Schnittmuster, das von dem der anderen O157 Stämme abwich (Abb. 4B). Die genetischen Differenzen des Stammes O157:H⁻ 4805/00 konnten in einer neuen Studie durch Sequenzierung der Gene bestätigt werden (9).

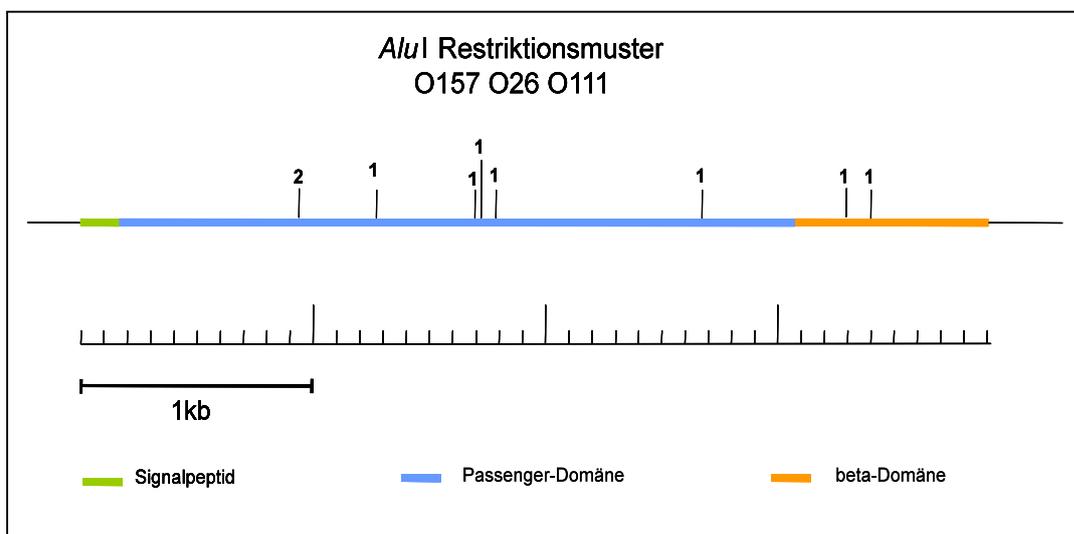


Abb. 3: *espP*-Restriktionsmuster mit *AluI*

1: gemeinsame *AluI* Schnittstellen von Serogruppen O157, O26, O111 und EDL 933. **2:** Zusätzliche *AluI* Schnittstelle von Serogruppe O26 und O111

Abb. 4A und 4B: Agarose-Gelelektrophorese des *AluI* Verdaus

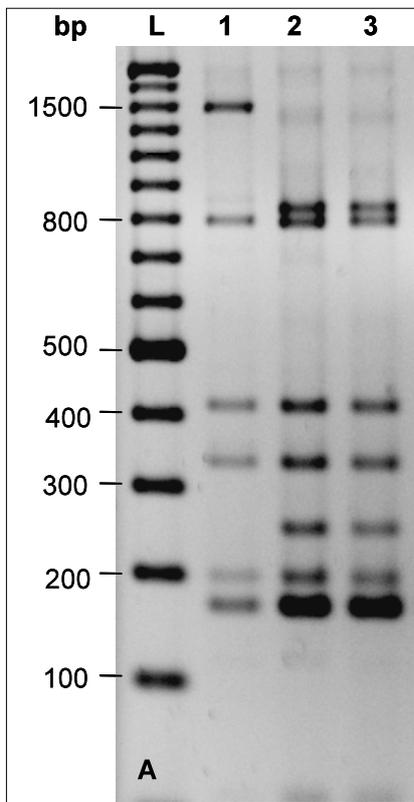


Abb. 4A:

Darstellung der Serogruppen-spezifischen Unterschiede im Schnittmuster mit *AluI*: Zusätzliche Schnittstelle bei den Serogruppen O26 und O111 im Vergleich zur Serogruppe O157.

1: O157:H7 4968/00

2: O111:H⁻ 4791/97

3: O26:H11 144/91

L: 100 bp ladder

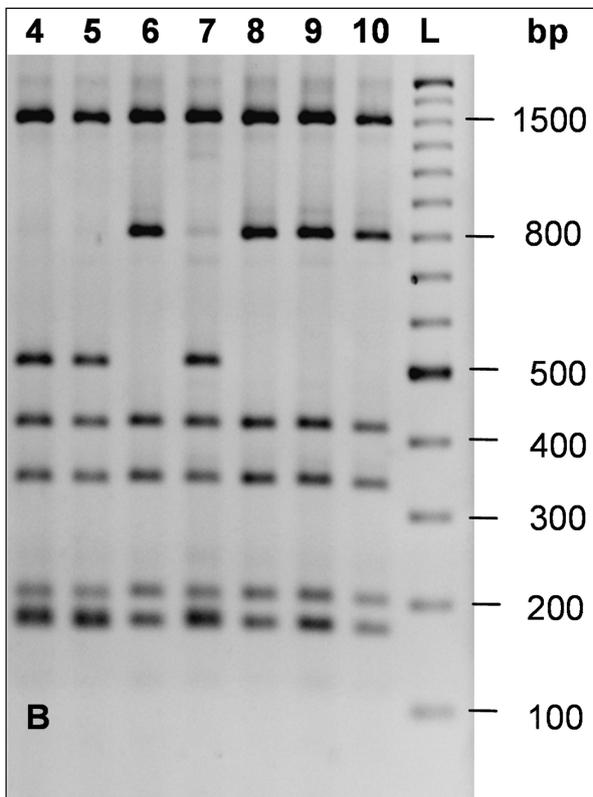


Abb. 4B:

Darstellung der abweichenden Restriktionsmuster (Proben 4, 5, 7) innerhalb der Serogruppe O157.

4: O157:H⁻ 4805/00

5: O157:H7 4644/99

6: O157:H⁻ 1702/99

7: O157:H⁻ 297/99

8: O157:H7 2539/99

9: O157:H7 4353/00

10: O157:H7 4895/00

L: 100 bp ladder

4.4 Prüfung der Funktionalität des Autotransporter-Mechanismus und Messung der enzymatischen Aktivität

Nachdem auf genetischer Ebene Serogruppen-spezifische Unterschiede festgestellt werden konnten, wurde im Folgenden überprüft, ob diese genetischen Differenzen Auswirkungen auf die Funktionalität der exprimierten Proteine haben.

Um die Autotransportfunktion zu überprüfen, wurden die *espP*-positiven Stämme in LB-Medium kultiviert. Die Kulturüberstände wurden anschließend säulenchromatographisch mittels Affinitätschromatographie an einer Benzamidin His-Trap Säule gereinigt (Abb. 5) und vorhandenes EspP mittels Immunoblot gegen einen spezifischen EspP-Antikörper nachgewiesen (Abb. 6).

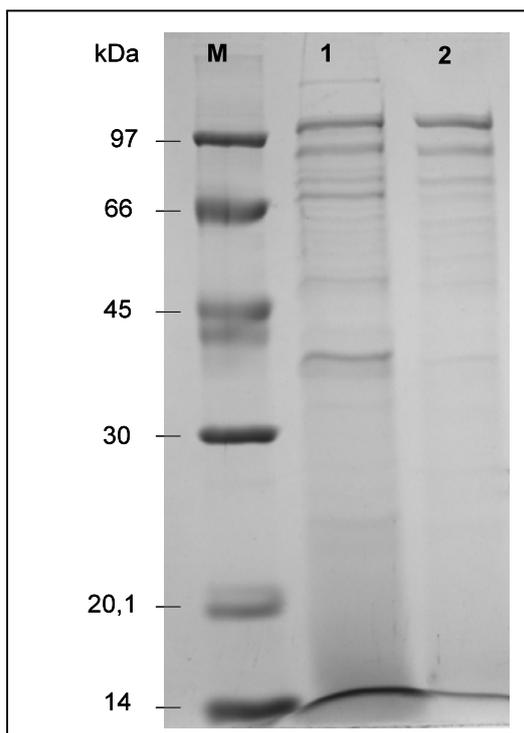


Abb. 5: Proteinaufreinigungseffekt durch Affinitätschromatographie

M: Marker, **1:** O111:H⁻ 4794/97 der Durchfluss beim Beladen der Säule,

2: Stamm O111:H⁻ 4794/97 Elution

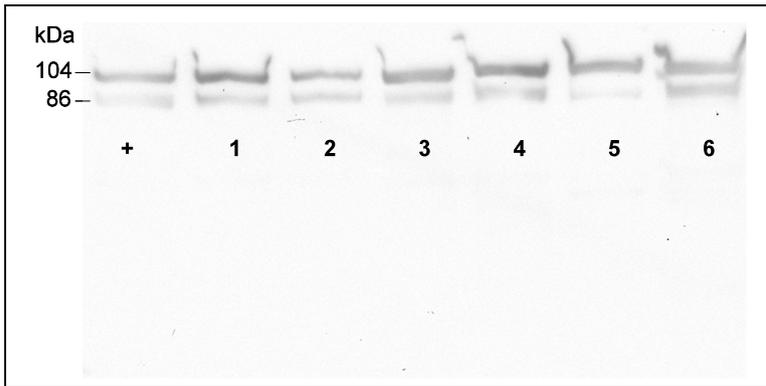


Abb. 6: EspP-Nachweis mittels Immunoblot gegen einen spezifischen EspP-AK
 +: Positivkontrolle WB 4-5K, **1:** O157:H7 4968/00, **2:** O157:H⁻ 2782/99,
3: O157:H7 3527/00, **4:** O157:H7 4734/00, **5:** O157:H7 4789/00,
6: O157:H7 3626/00

Die proteolytische Aktivität der aufgereinigten Passenger-Domäne wurde durch Inkubation mit Pepsin A ermittelt (Abb. 7). Die Ergebnisse konnten durch Inkubationsversuche der entsprechenden Proteinaufarbeitungen mit dem Substrat Ala-Ala-Pro-Leu-pNA bestätigt werden. Auch hier waren sämtliche Aufarbeitungen proteolytisch aktiv.

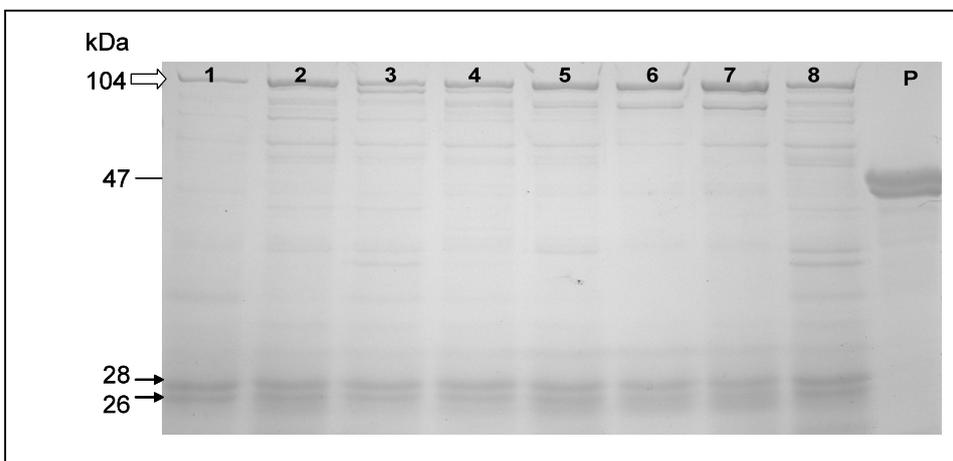


Abb. 7: Gelelektrophorese des Pepsin Verdaus: Nachweis der proteolytischen Aktivität gegenüber Pepsin.

1: O157:H7 4734/00, **2:** O157:H7 4789/00, **3:** O157:H7 3626/00,
4: O157:H7 4851/00, **5:** O157:H7 4805/00, **6:** O157:H7 2540/1,
7: O157:H⁻ 2765/99, **8:** O157:H⁻ 1702/99, **P:** Pepsin,
weißer Pfeil: EspP, **schwarze Pfeile:** Pepsinfragmente

Bei allen untersuchten Stämmen besaß EspP sowohl die Fähigkeit zum Autotransport aus der Zelle als auch proteolytische Aktivität gegenüber den eingesetzten Substraten.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Serogruppen-spezifische genetische Unterschiede der untersuchten EHEC-Stämme keine Auswirkung auf die Funktionalität von EspP haben.

5. Diskussion

Neben dem Hauptpathogenitätsfaktor Stx besitzen EHEC weitere potenzielle Pathogenitätsfaktoren, die ihrerseits die Virulenz des Stammes potenzieren und ursächlich an der Ausprägung schwerer Krankheitsverläufe beteiligt sein können (40). Beispielhaft können hierfür das EHEC-Hämolysin und das *eae*-kodierte Intimin (1, 72) angeführt werden. Weniger ist bisher über die Rolle der extrazellulären Serinprotease EspP bekannt. Eine weite Verbreitung von EspP in hochvirulenten Stämmen (12) lässt jedoch einen Beitrag von EspP zur Pathogenität von EHEC-Bakterien vermuten.

Proteasen im Allgemeinen werden als mögliche Virulenzfaktoren pathogener Organismen angesehen. Indem sie inaktive wirtseigene Proteasen und Faktoren durch Proteolyse in ihre aktive Form überführen, können sie nicht nur direkt Einfluss auf die biochemischen Vorgänge ihres Wirtsorganismus nehmen, sondern auch indirekten Einfluss ausüben. So ist beispielsweise einerseits eine direkte toxische Wirkung von Proteasen nachgewiesen (17), andererseits können sie auch andere Toxine durch Proteolyse aktivieren (54). Weiterhin wurden Einflüsse mikrobieller Proteasen auf die Gefäßpermeabilität beschrieben (35, 51). Für Proteasen der opportunistischen Krankheitserreger *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia marcescens* wurde gezeigt, dass durch proteolytische Aktivierung inaktiver Gerinnungsfaktoren die Gerinnungskaskade im Wirtsorganismus ausgelöst wird (36). Im speziellen Fall von EspP wurde eine proteolytische Aktivität gegenüber dem Gerinnungsfaktor V *in vitro* nachgewiesen (13). Diese proteolytische Fähigkeit könnte im Wirtsorganismus zur Interaktion mit der Gerinnungskaskade führen.

Für den konkreten Nachweis, dass EspP ausschlaggebend zur Pathogenese beiträgt, sind jedoch weitere Forschungen notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu EspP von 37 Stämmen aus drei Serogruppen untersucht, die mit schweren klinischen Verläufen assoziiert werden. Ziel der Arbeit war es, bei

hochvirulenten Stämmen die genetische Variation der *espP*-Gene zu analysieren, der EspP-Aktivität und Funktionalität gegenüberzustellen und mögliche Korrelationen herauszuarbeiten. Nach Amplifikation des *espP*-Genes wurden Variationen in der *espP*-Sequenz mittels Restriktionsanalysen nachgewiesen. Im zweiten Teil wurde dann untersucht, ob strukturelle Polymorphismen Einfluss auf die Funktionalität von EspP haben.

Bei den untersuchten Serotypen ließen sich auf genetischer Ebene mit den angewandten Methoden nur geringfügige strukturelle Unterschiede nachweisen. In der Funktionsanalyse zeigte sich, dass diese genetischen Variationen keine Auswirkung auf die proteolytische Aktivität oder den Autotransporter-Mechanismus von EspP in den untersuchten Stämmen hatte. Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass *espP* in den hochvirulenten EHEC-Serogruppen O157, O26 und O111 stark konserviert ist. Durch Untersuchung einer deutlich größeren Stammpopulation konnte in einer weiterführenden Studie gezeigt werden, dass sich *espP* in Stämmen weniger virulenter Serotypen strukturell deutlich von den in dieser Arbeit untersuchten *espP*-Genen unterscheidet (9). Insgesamt konnten in der weiterführenden Studie mindestens vier Subtypen von EspP differenziert werden (EspP α , EspP β , EspP γ und EspP δ), die neben der strukturellen Divergenz zum Teil auch deutliche funktionale Unterschiede aufwiesen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Subtypen von EspP unterschiedlich stark mit virulenten Serotypen assoziiert sind. So wurde in hochvirulenten Serogruppen wie O157, O26 und O111 ausschließlich der proteolytisch hochaktive Subtyp EspP α nachgewiesen (9, 34), während die proteolytisch inaktiven Subtypen EspP β und EspP δ vornehmlich in Serotypen gefunden wurden, die nur mit geringer Pathogenität assoziiert sind (9, 34). In der Gesamtschau mit weiteren Studien (9, 34) konnte in dieser Arbeit somit gezeigt werden, dass der Subtyp EspP α in Stämmen hochvirulenter Serotypen hochkonserviert und funktional aktiv ist. Dieser Befund unterstützt eine mögliche Rolle von EspP α in der Pathogenese einer EHEC-Infektion.

Aus Mangel an befriedigenden Tiermodellen konnten die Wirkung und das Verhalten von EspP *in vivo* bisher noch nicht beschrieben werden. Es gibt dennoch weitere indirekte Hinweise, die Rückschlüsse auf die *in vivo* Verhältnisse von EspP zulassen: So gehört EspP der Gruppe der Serinprotease-Autotransporter (SPATE) an. Mitglieder dieser Gruppe wurden mit einigen wenigen Ausnahmen bisher nur aus pathogenen Stämmen isoliert. In Kulturüberständen ihrer jeweiligen Erreger gehören die Proteine der SPATE Familie darüber hinaus mengenmäßig zu den Hauptfraktionen (27). Ferner liegt das Expressionsmaximum von EspP im Bereich der Körpertemperatur des Wirtsorganismus, wohingegen bei 20°C keine Expression nachgewiesen werden kann (11). Auf eine *in vivo* Expression von EspP deutet die Beobachtung hin, dass Patienten, nachdem sie sich mit EHEC infizierten, eine Antikörper-Reaktion auf EspP zeigten. Demnach ist anzunehmen, dass EspP bei Infektionen exprimiert wird und in immunogener Form im Wirtsorganismus vorliegt (11).

Für einen zweifelsfreien Nachweis einer Beteiligung von EspP(α) an der Pathogenese einer EHEC-Infektion sind diese indirekten Nachweise jedoch nicht ausreichend. Daher sollte es Ziel zukünftiger Studien sein, sich direkt mit den funktionalen Eigenschaften von EspP im Rahmen der Pathogenese zu befassen. Erst durch weitere Aufklärung der Pathogenitätsmechanismen von EHEC wird es möglich sein, kausale Therapien und gezielte präventive Maßnahmen zur Bekämpfung von EHEC Infektionen zu entwickeln.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
DAEC	Diffus adherierende <i>Escherichia coli</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAEC	Enter aggregative <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EspP	Extrazelluläre Serinprotease, plasmid-kodiert
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
FPLC	fast proteine liquid chromatography
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl] Ethansulfonsäure Natriumsalz
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MWCO	molecular weight cut off
NaCl	Natriumchlorid
p.a.	per analysi
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PES	Polyethersulfonat
RFLP	Restriktionsfraktionlängen-polymorphismus
rpm	rounds per minute

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAC-Medium	Sorbit-MacConkey-Medium
SPATE	Serinprotease-Autoporter
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga Toxin
Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	Succinyl-Alanin-Prolin-Leucin-para-Nitroanillin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Z-Arg-Arg-pNA	Z-Arginin-Arginin-para-Nitroanillin

7. Literatur

1. Aldick, T., Bielaszewska, M., Zhang, W., Brockmeyer, J., Schmidt, H., Friedrich, A. W., Kim, K. S., Schmidt, M. A., Karch, H., 2007. Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes and Infection* 9, 282-90.
2. Barnard, T. J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H. D., Buchanan, S. K., 2007. Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1214-20.
3. Bauer, M. E., Welch, R. A., 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity* 64, 167-75.
4. Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., Gleier, K., 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1099-108.
5. 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. *Infection and Immunity* 73, 552-62.
6. Bitzan, M., Müller-Wiefel, D. E., Schwarzkopf, A., Karch, H., 1992. Role of antibiotics in the management of the Verotoxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Immunität und Infektion* 20, 168-72.
7. Bopp, C. A., Greene, K. D., Downes, F. P., Sowers, E. G., Wells, J. G., Wachsmuth, I. K., 1987. Unusual Verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology* 25, 1486-9.

8. Brandis, M., Karch, H., Zimmerhackl, L. B., Verweyen, H., Gerber, A., 2002. Das hämolytisch-urämische Syndrom. Deutsches Ärzteblatt 99, A-196/B-157/C-153.
9. Brockmeyer, J., Bielaszewska, M., Fruth, A., Bonn, M.-L., Mellmann, A., Humpf, H. U., Karch, H., 2007. Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. Applied and Environmental Microbiology 73, 6351-9
10. Brooks, J. T., Sowers, E. G., Wells, J. G., Greene, K. D., Griffin, P. M., Hoekstra, R. M., Strockbine, N. A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. Journal of Infectious Diseases 192, 1422-9.
11. Brunder, W., 1997. Strukturelle und funktionelle Analyse eines 21 kb DNA-Fragmentes aus dem Plasmid von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157:H7. Dissertationsschrift.
12. Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., Karch, H., 1999. The large plasmids of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. Microbiology 145, 1005-14.
13. Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H., 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. Molecular Microbiology 24, 767-78.
14. Dautin, N., Barnard, T. J., Anderson, D. E., Bernstein, H. D., 2007. Cleavage of a bacterial autotransporter by an evolutionarily convergent autocatalytic mechanism. The EMBO Journal 26, 1942-52.
15. Desvaux, M., Parham, N. J., Henderson, I. R., 2004. The autotransporter secretion system. Research in Microbiology 155, 53-60.

16. Dreesmann, J., Cleves, S., 2003. Ökologische Studie zu regionalen Risikofaktoren für EHEC und HUS in Niedersachsen. Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Hannover. http://public.beuth-hochschule.de/~kred/akmedgeo/pdf/J2004_pdfs/dreesman_cleves.pdf
17. Dutta, P. R., Cappello, R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J. P., 2002. Functional comparison of Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity* 70, 7105-13.
18. Dytoc, M., Soni, R., Cockerill, F., De Azavedo, J., Louie, M., Bruton, J., Sherman, P., 1993. Multiple determinants of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 attachment-effacement. *Infection and Immunity* 61, 3382-91.
19. Elliott, E. J., Robins-Browne, R. M., O'Loughlin, E. V., Bennett-Wood, V., Bourke, J., Henning, P., Hogg, G. G., Knight, J., Powell, H., Redmond, D., 2001. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Archives of Disease in Childhood* 85, 125-31.
20. Fratamico, P. M., Bhaduri, S., Buchanan, R. L., 1993. Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-MDa plasmid and on 60-MDa plasmid-cured derivatives. *Journal of Medical Microbiology* 39, 371-81.
21. Friedrich, A. W., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Köck, R., Fruth, A., Tschäpe, H., Karch, H., 2007. Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clinical Infectious Diseases* 45, 39-45.

22. Garg, A. X., Suri, R. S., Barrowman, N., Rehman, F., Matsell, D., Rosas-Arellano, M. P., Salvadori, M., Haynes, R. B., Clark, W. F., 2003. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic-uremic syndrome - A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Journal of the American Medical Association* 290, 1360-70.
23. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M., Zimmerhackl, L. B., 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. *Journal of Infectious Diseases* 186, 493-500.
24. Griffin, P. M., 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infections of the Gastrointestinal Tract*, Raven Press, New York 739-61.
25. Hamburger, J. C., 2004. Vorkommen und Struktur der Pathogenitätsinsel LPA in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*. *Dissertationsschrift*.
26. Henderson, I. R., Desvaux, M., 2004. The type V secretion pathway: a premium source of virulence factors? *Drug Discovery Today* 9, 241.
27. Henderson, I. R., Nataro, J. P., 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity* 69, 1231-43.
28. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J. P., 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* 6, 370-8.
29. Herold, S., Karch, H., Schmidt, H., 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology* 294, 111-5.

30. Jarvis, K. G., Kaper, J. B., 1996. Secretion of extracellular Proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infection and Immunity* 64, 4826-9.
31. Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D., Tarr, P., 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: Bacterial genotypes and clinical profiles. *Journal of Infectious Diseases* 188, 719-29.
32. Johnson, K. E., Thorpe, C. M., Sears, C. L., 2006. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases* 43, 1587-95.
33. Johnson, W. M., Lior, H., Bezanson, G. S., 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1, 76 (letter).
34. Kahn, A. B., Naim, A., Orth, D., Grif, K., Moshin, M., Prager, R., Dierich, M. P., Würzner, R., 2009. Serine protease espP subtype α , but not β or γ , of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is associated with highly pathogenic serogroups. *International Journal of Medical Microbiology*. 299, 247-54.
35. Kaminishi, H., Tanaka, M., Cho, T., Maeda, H., Hagihara, Y., 1990. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infection and Immunity* 58, 2139-43.
36. Kaminishi, H., Hamatake, H., Cho, T., Tamaki, T., Suenaga, N., Fujii, T., Hagihara, Y., Maeda, H., 1994. Activation of blood clotting factors by microbial proteinases. *FEMS Microbiology Letters* 121, 327-32.
37. Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-40.

38. Kaplan, B. S., Meyers, K. E., Schulman, S. L., 1998. The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 9, 1126-33.
39. Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R., O'Brien, A. D., Tacket, C. O., Levine, M. M., 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infection and Immunity* 55, 455-61.
40. Karch, H., 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 27, 207-13.
41. Karch, H., Tarr, P. I., Bielaszewska, M., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 405-18.
42. Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., Lim, C., 1983. Sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1, 619-20.
43. Kaye, S. A., Louise, C. B., Boyd, B., Lingwood, C. A., Obrig, T. G. Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome - Interleukin-1-beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial-cells *in vitro*. *Infection and Immunity* 61, 3886-91.
44. Kenny, B., Lai, L. C., Finlay, B. B., Donnenberg, M. S., 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Molecular Microbiology* 20, 313-23.
45. Lai, L. C., Wainwright, L. A., Stonde, K. D., Donnenberg, M. S., 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infection and Immunity* 65, 2211-7.

46. Lara-Tejero, M., Galán, J. E., 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* 290, 354-7.
47. Levine, M. M., Xu, J. G., Kaper, J. B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H., Wachsmuth, K., 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 156, 175-82.
48. Louie, M., de Azavedo, J. C., Handelsman, M. Y., Clark, C. G., Ally, B., Dytoc, M., Sherman, P., Brunton, J., 1993. Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infection and Immunity* 61, 4085-92.
49. McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1664-8.
50. Mellmann, A., Bielaszewska, M., Zimmerhackl, L. B., Prager, R., Harmsen, D., Tschäpe, H., Karch, H., 2005. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: *In vivo* evolution of a bacterial pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 41, 785-92.
51. Miyoshi, N., Miyoshi, S., Sugiyama, K., Suzuki, Y., Furuta, H., Shinoda, S., 1987. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* protease. *Infection and Immunity* 55, 1936-9.
52. Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M., Giannella, R. A., 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infection and Immunity* 41, 1340-51.

53. Moyer, M. P., Dixon, P. S., Rothman, S. W., Brown, J. E., 1987. Cytotoxicity of Shiga toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. *Infection and Immunity* 55, 1533-5.
54. Nagamune, K., Yamamoto, K., Naka, A., Matsuyama, J., Miwatani, T., Honda, T., 1996. In vitro proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infection and Immunity* 64, 4655-8
55. Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 142-201.
56. O'Brien, A. O., Lively, T. A., Chen, M. E., Rothman, S. W., Formal, S. B., 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.
57. O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A. A., Keusch, G. T., 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 180, 65-94.
58. Orth, D., Wurznner, R., 2006. What makes an enterohemorrhagic *Escherichia coli*? *Clinical Infectious Diseases* 43, 1168-9.
59. Ostroff, S. M., Tarr, P. I., Neill, M. A., Lewis, J. H., Hargrett-Bean, N., Kobayashi, J. M., 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Journal of Infectious Diseases* 160, 994-8.
60. Oswald, E., Nougayrede, J.-P., Taieb, F., Sugai, M., 2005. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Current opinion in microbiology* 8, 83-91.

61. Paros, M., Tarr, P. I., Kim, H., Besser, T. E., Hancock, D. D., 1993. A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin genotype, plasmid profile, and bacteriophage lambda-restriction fragment length polymorphism profile. *Journal of Infectious Diseases* 168, 1300-3.
62. Paton, A. W., Woodrow, M. C., Doyle, R. M., Lanser, J. A., Paton, J. C., 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113: H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3357-61.
63. Peterson, J. H., Szabady, R. L., Bernstein, H. D., 2006. An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 9038-48.
64. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., Meyer, T. F., 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458-62.
65. Ramegowda, B., Tesh, V. L., 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infection and Immunity* 64, 1173-80.
66. Richardson, S. E., Karmali, M. A., Becker, L. E., Smith, C. R., 1988. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Human Pathology* 19, 1102-8.
67. Riley, L. W., 1987. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annual Review of Microbiology* 41, 383-407.

68. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johanson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine* 308, 681-5.
69. Robert Koch-Institut. 2000. Enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Infektionen (EHEC). *Epidemiologisches Bulletin* 34, 271-5
70. Robert Koch-Institut, 2002. Ein HUS-Ausbruch durch sorbitol-fermentierende EHEC des Serovars O157:H7: Untersuchungsergebnisse und Lehren für die Surveillance. *Epidemiologisches Bulletin* 22, 171-175.
71. Safdar, N., Said, A., Gangnon, R. E., Maki, D. G., 2002. Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. A Meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 288, 996-1001.
72. Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity* 63, 1055-61.
73. Schmidt, H., Kernbach, C., Karch, H., 1996. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142, 907-14.
74. Scotland, S. M., Richmond, J. E., Rowe, B., 1983. Adhesion of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* (EPEC) to Hep-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. *FEMS Microbiology Letters* 20, 191-5.
75. Skillman, K. M., Barnard, T. J., Peterson, J. H., Ghirlando, R., Bernstein, H. D., 2005. Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Molecular Microbiology* 58, 945-58.

76. Szabady, R. L., Peterson, J. H., Skillman, K. M., Bernstein, H. D., 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 221-6.
77. Tarr, P. I., 1995. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic, and Epidemiologic Aspects of Human Infection. *Clinical Infectious Diseases* 20, 1-10.
78. Tarr, P. I., Gordon, C. A., Chandler, W. L., 2005. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365, 1073-86.
79. Tesh, V. L., O'Brien, A. D., 1991. The pathogenic mechanism of Shiga toxin and the Shiga-like toxin. *Molecular Microbiology* 5, 1817-22.
80. Thelestam, M., Frisan, T., 2004. Cytolethal distending toxins. 152. *Review of Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 111-33.
81. Toth, I., Cohen, M. L., Rumschlag, H. S., Riley, L. W., White, E. H., Carr, J. H., Bond, W. W., Wachsmuth, I. K., 1990. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infection and Immunity* 58, 1223-31.
82. Velarde, J. J., Nataro, J. P., 2004. Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. *Journal of Biological Chemistry* 279, 31495-504.
83. Yu, J., Kaper, J. B., 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 6, 411-7.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. H. Karch danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die hervorragenden Rahmenbedingungen bei dessen Bearbeitung.

Herrn Dr. rer. nat. Jens Brockmeyer danke ich für die ausgezeichnete Betreuung und Hilfsbereitschaft und besonders für seine Geduld, die er mir während des gesamten Zeitraums entgegengebracht hat.

Meiner Familie danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann.