

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

**Charakterisierung der Typ 1 Fimbrien-Expression bei HUS - assoziierten
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)**

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von
Katharina Maria Rösmann
aus Münster

2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Helge Karch

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

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

Zusammenfassung

Charakterisierung der Typ 1 Fimbrien-Expression bei HUS - assoziierten enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

Katharina Maria Rösmann

EHEC-Bakterien, die beim Menschen das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen, besitzen zahlreiche Virulenzfaktoren wie Toxine, sekretorische Proteine, Adhäsine und Fimbrien. Der Großteil dieser Virulenzfaktoren ist bereits gut charakterisiert, während die genaue Bedeutung der Typ 1 Fimbrien bei EHEC weitgehend ungeklärt ist. Ziel war es, die Expression Mannose-sensitiver Typ 1 Fimbrien von 48 EHEC-Stämmen verschiedener Serotypen aus HUS-Patienten-Isolaten sowohl phänotypisch als auch genotypisch zu charakterisieren.

Die phänotypischen Untersuchungen mittels Hefe-Agglutinationstest ergaben, dass 38 der 48 untersuchten Stämme in der Lage sind, Typ 1 Fimbrien zu exprimieren. Bei den vier O157:H7 und sechs weiteren Stämmen sowie dem Kontrollstamm konnte keine Agglutination beobachtet werden. Diese negativen Testergebnisse weisen darauf hin, dass zehn Stämme keine Typ 1 Fimbrien besitzen.

Im Verlauf einer zweiwöchigen Inkubationszeit kam es zu einer Zunahme der Agglutinationsfähigkeit bei allen positiv getesteten Stämmen. Es konnte mit einer Ausnahme kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzucht der Stämme unter aeroben oder mikroaerophilen Bedingungen festgestellt werden. In den anschließenden PCR- und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analysen erfolgte der genotypische Nachweis der Phasenvariation, worunter man die zwischen "on"- und "off"-Ausrichtung variable Expression der Typ 1 Fimbrien versteht. Die erzielten Resultate zeigten eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Hefe-Agglutinationstests und der Phasenstadien des fimbriellen Switches.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	<u>1</u>
1.1.	Charakteristik der Bakterien	<u>1</u>
1.2	Das klinische Bild	<u>1</u>
1.3	Therapie	<u>2</u>
1.4	Erregerreservoir und Übertragungswege	<u>3</u>
1.5	Virulenzfaktoren der EHEC	<u>4</u>
1.5.1	Shiga Toxine	<u>4</u>
1.5.2	Weitere Pathogenitätsfaktoren	<u>5</u>
1.6	Fimbrien	<u>6</u>
2	Zielsetzung	<u>8</u>
3	Material und Methoden	<u>9</u>
3.1	Material	<u>9</u>
3.1.1	Geräte und Laboreinrichtungen	<u>9</u>
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	<u>10</u>
3.1.3	Medien	<u>11</u>
3.1.4	Bakterienstämme	<u>11</u>
3.2	Methoden	<u>14</u>
3.2.1	Anzucht der Bakterien	<u>14</u>
3.2.2	Herstellung der Bakteriensuspension	<u>14</u>
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	<u>15</u>
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	<u>16</u>
3.2.5	Restriktionsanalyse	<u>18</u>
3.2.6	Hefe-Agglutinationstest	<u>18</u>
4	Ergebnisse	<u>19</u>
4.1	Phänotypischer Nachweis der Typ 1 Fimbrien im Hefe-Agglutinationstest	<u>19</u>
4.2	Genotypischer Nachweis der Phasenvariation	<u>23</u>
4.2.1	PCR Analyse	<u>23</u>
4.2.2	Restriktionsanalyse	<u>23</u>
4.3	Nachweis des intakten fim-Switches	<u>27</u>
4.4	Nachweis der 16 bp Deletion	<u>28</u>
5	Diskussion	<u>29</u>
6	Literaturverzeichnis	<u>34</u>
7	Abkürzungsverzeichnis	<u>41</u>
8	Lebenslauf	<u>42</u>
9	Danksagung	<u>43</u>

1 Einleitung

1.1. Charakteristik der Bakterien

Das Bakterium *Escherichia coli* wurde erstmals 1885 vom deutschen Pädiater Theodor Escherich (1857-1911) aus dem Stuhl von Neugeborenen isoliert. Die offizielle Benennung erfolgte im Jahre 1919.

Das Darmbakterium *E. coli* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Es ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, peritrich begeißeltes und säurebildendes Bakterium, welches sich sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen vermehren kann (40).

Man unterscheidet fakultativ pathogene und obligat pathogene Stämme. Die fakultativ pathogenen Stämme sind physiologischer Bestandteil der menschlichen Darmflora. Gelangen diese in den extraintestinalen Bereich, so sind sie in der Lage, schwerste Infektionen, wie z. B. Harnwegsinfekte, Sepsis und Neugeborenenmeningitis auszulösen (27). Die darmpathogenen Stämme sind nicht Bestandteil der gesunden Darmflora. Man unterscheidet sechs Subtypen: enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) (33).

EIEC und EPEC werden weltweit für ca. 160 Mio. Durchfallerkrankungen und eine Mio. Todesfälle verantwortlich gemacht. ETEC sind häufig Auslöser der Reisediarrhoe. EHEC stellen dagegen hauptsächlich ein Problem der industrialisierten Länder dar.

Im Jahr 2009 wurden allein in Deutschland 835 EHEC-bedingte Durchfallerkrankungen an das Robert Koch Institut gemeldet, worunter sich 66 Patienten mit HUS befanden (31).

1.2 Das klinische Bild

Der Großteil der EHEC-Infektionen verläuft klinisch inapparent und bleibt deshalb unerkannt. Die Erkrankung beginnt nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Tagen, selten bis zu acht Tagen, mit unspezifischen gastroenteritischen

Beschwerden wie wässriger Durchfall, Abdominalschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Bei 10-20 % der Patienten entwickelt sich eine hämorrhagische Kolitis, die durch blutige Durchfälle, krampfartige Abdominalschmerzen und teilweisem Fieber gekennzeichnet ist. Besonders betroffen sind Säuglinge, Kleinkinder, alte Menschen und Personen mit geschwächter Immunabwehr. Eine schwere und gefürchtete Komplikation ist das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), welches sich bei etwa 10 % der Fälle entwickelt und der häufigste Grund für akutes Nierenversagen im Kindesalter ist. Das HUS ist gekennzeichnet durch die Trias hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen (38). Zahlreiche internistische Erkrankungen wie Pankreatitis, Kolonstrikturen, Gallensteine, sekundäre arterielle Hypertonie, auffällige Urinbefunde, Diabetes mellitus, Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) und toxische Myokardschäden können begleitend auftreten bzw. auch nach der akuten Phase bestehen bleiben. Zusätzlich kann es zu neurologischen Komplikationen wie Krämpfen, Koma, Hirnödemen, cerebralen Ischämien, Ataxien oder Paresen kommen (10, 14). Eine terminale Niereninsuffizienz bis hin zum Tod entwickelt sich in ca. 10 % der Fälle. Ein Viertel aller HUS-Fälle bei Kindern führt zu einer bleibenden Nierenschädigung mit eingeschränkter glomerulärer Filtrationsrate und Proteinurie sowie persistierender Hypertonie (21, 35).

1.3 Therapie

Da es bis heute nicht gelungen ist, eine kausale Therapie durchzuführen, ist es umso wichtiger, die symptomatische Therapie in spezialisierten Zentren rechtzeitig einzuleiten, um Folgeschäden zu vermeiden. Bei globaler Niereninsuffizienz ist die forcierte Diurese und die Durchführung der Häm- oder Peritonealdialyse die einzige Therapie der Wahl (64).

Wichtig ist, dass bei nachgewiesener Erkrankung auf eine sorgfältige Hygiene geachtet wird, da weniger als 100 Bakterien für eine Ansteckung ausreichend sind. Die Ansteckungsfähigkeit besteht, solange EHEC-Bakterien im Stuhl nachgewiesen werden können. Die Dauer kann von einigen Tagen bis zu

mehreren Wochen variieren. Selbst bei klinisch unauffälligem Bild kann die Ausscheidungsdauer noch über einen Monat betragen. Allgemein gilt, dass der Erreger bei Kindern länger im Stuhl nachgewiesen werden kann als bei Erwachsenen (58).

1.4 Erregerreservoir und Übertragungswege

Die Erreger können gut in einem sauren Milieu überleben, was sich an den Lebensmitteln, in denen sie nachgewiesen werden können, zeigt. Dies sind vor allem rohe Lebensmittel tierischer Herkunft wie Rinderhackfleisch, Salami, Mettwurst, fermentierte Wurstwaren, Milchprodukte, Mayonnaise, aber auch Apfelsaft, Salat und Sprossen (6, 64).

Das Hauptreservoir der EHEC ist der Darm von Wiederkäuern, wobei sie vor allem bei Rindern, Ziegen, Schafen, aber auch Wildwiederkäuern wie Hirschen und Rehen vorkommen (3, 35). Diese Tiere können den Keim längere Zeit in sich tragen und ausscheiden, erkranken selbst aber nicht daran (63).

Der Mensch kann sich zum einen über die genannten kontaminierten Nahrungsmittel und über verseuchtes Trink- und Badewasser infizieren. Es ist aber auch möglich, sich durch direkten Tierkontakt, wie er z.B. berufsbedingt in der Landwirtschaft oder beim Besuch von Streichelzoos zustande kommt, anzustecken. Häufig erfolgt eine direkte Kontaktinfektion von Mensch zu Mensch. Diese fäkal-orale Übertragung ist besonders für Risikopersonen wie Kinder, alte Menschen und Immungeschwächte von großer Bedeutung (14, 55).

Aufgrund des schweren Krankheitsbildes, welches durch EHEC ausgelöst werden kann, und der bis heute fehlenden Impf- und Behandlungsmöglichkeiten ist es wichtig, die Forschung auf diesem Gebiet voranzutreiben.

1.5 Virulenzfaktoren der EHEC

1.5.1 Shiga Toxine

Die Fähigkeit, Shiga Toxine zu produzieren, ist ein gemeinsames Merkmal aller EHEC (16).

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines HUS bzw. anderen gastrointestinalen Erkrankungen und Shiga Toxin- produzierenden *E. coli* konnte erstmalig 1983 gezeigt werden (39).

Die Definition als EHEC erfolgte im Jahre 1987 aufgrund ihrer Shiga Toxin- und Hämolysinproduktion und des durch sie hervorgerufenen Krankheitsbildes (47).

Shiga Toxine werden aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung auf Verozellen auch als "Verotoxine" bezeichnet (37). Entsprechend ihrer biologischen Aktivität werden sie zur Familie der Ribosomen-inaktivierenden Proteine gezählt, zu denen auch Rizin gehört, welches aus der Kastorbohne gewonnen werden kann (4).

Abhängig von der Expression des Globotriaosylceramid (Gb3) - Rezeptors, welcher sich in der Plasmamembran vor allem von Gefäßendothel- und Epithelzellen der proximalen Nierentubuli befindet, gelten Stx als extrem potente Zellgifte, die aus zwei Hauptgruppen bestehen: Stx1 und Stx2. Beide lassen sich in mehrere Subgruppen unterteilen: Stx1, Stx1c, Stx1d, Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f und Stx2g (16, 17, 19, 45, 68).

Die Subtypen Stx2 und Stx2c sind besonders häufig an der Ausbildung eines HUS beteiligt, wie klinische Untersuchungen belegen (34, 36). Einzelne EHEC-Stämme sind nicht nur auf eine Toxinart festgelegt, sondern können mehrere Toxintypen aufweisen (16, 17, 19). Stx hemmen als Hauptpathogenitätsfaktoren die eukaryotische Proteinbiosynthese, indem sie als rRNA-N-Glykosidasen wirken. Die Holotoxine mit einer Größe von ca. 70 kDa bestehen aus einer A-Untereinheit, welche die enzymatische Aktivität beinhaltet, und fünf B-Untereinheiten, die hauptsächlich für die Bindung des Toxins an die Zielzelle verantwortlich sind (7, 34).

Zytotoxische Effekte werden ausgelöst, indem die Stx mit ihrer B-Untereinheit an Globotriaosylceramid (Gb3) - Rezeptoren, welche auch als CD77 bezeichnet werden, binden und dann zum Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen

Retikulum der Zielzellen gelangen (51). Die Protease Furin spaltet dabei die A-Untereinheit in ein N-terminales und ein C-terminales Fragment. Das katalytisch aktive N-terminale Segment hemmt die 60 S Untereinheiten der Ribosomen, indem es als rRNA-N-Glykosidase wirkt. Dies führt zunächst zur Inhibierung der Proteinbiosynthese und schließlich zur Apoptose (7).

Die Produktion und Freisetzung von Stx kann durch eine antibiotische Therapie induziert werden, so dass diese zumindest während der akuten Krankheitsphase absolut kontraindiziert ist (66).

Neben den Stx spielen weiterhin Adhäsionsfaktoren, Proteasen und Hämolsine bei den Pathogenitätsmechanismen der EHEC-Infektionen eine Rolle.

1.5.2 Weitere Pathogenitätsfaktoren

Viele EHEC besitzen zusätzlich in ihrem Chromosom eine Pathogenitätsinsel, die als "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE) bezeichnet wird. Auf ihr liegt das *eae*-Gen, welches für das Membranprotein Intimin kodiert (9, 23, 25, 67) .

Dieser ist an der Ausbildung von "Attaching and Effacing"- Läsionen an Enterozyten beteiligt, welche für die Adhäsion der Bakterienzellen an der intestinalen Mucosa und die Zerstörung des Bürstensaumes verantwortlich gemacht werden (36, 50, 67). Zusätzlich besitzen viele EHEC-Stämme ein Virulenzplasmid mit potenziellen Virulenzgenen wie *espP*, *hlyA*, *katP* oder *toxB*. Ihre genaue Rolle und die Mechanismen zur Entstehung der EHEC-Infektion sind noch weitgehend unbekannt (33). Zudem besitzen EHEC eine relativ hohe Resistenzfähigkeit. Sie sind z. B. in der Lage, effektive Säureschutzmechanismen zu produzieren, so dass sie bei sehr niedrigen pH-Werten überleben können (2, 57).

1.6 Fimbrien

Fimbrien sind elektronenmikroskopisch als faserartige Strukturen auf der Bakterienoberfläche zu erkennen. Sie sind aus heteropolymeren Proteinen aufgebaut, die aus mehreren Untereinheiten verschiedener Größe bestehen.

Fimbrien ermöglichen den Erregern eine Adhäsion an die Wirtszellen und können dadurch den Ausbruch einer Erkrankung induzieren (29).

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Aufbau und die Organisation des Typ 1 Fimbrien Genclusters (*fim*). Die Proteine werden durch das chromosomal lokalisierte *fim* Gencluster kodiert. Auf einem Operon befinden sich sieben der neun Gene.

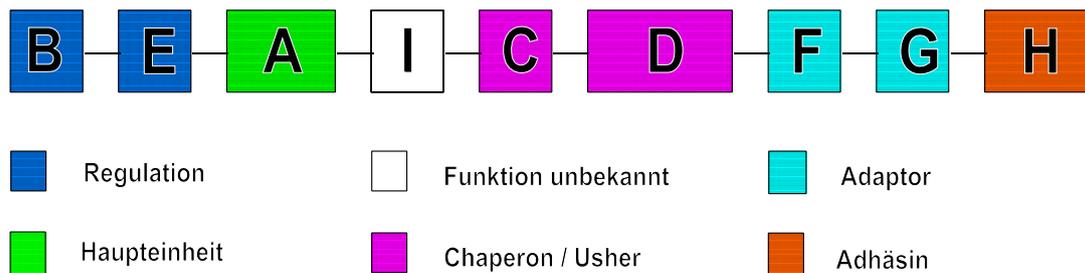


Abb. 1 Aufbau und Organisation des Typ 1 Fimbrien Genclusters

Bei *E. coli* lassen sich zwei Fimbrien-Typen unterscheiden: Die Mannose-sensitiven Typ 1 Fimbrien und die Mannose-resistenten Typ 2 Fimbrien.

Charakteristisches Zeichen von Typ 1 Fimbrien ist ihre Fähigkeit zur Hämagglutination, die bei Anwesenheit von Mannose gehemmt werden kann. Bei den Typ 2 Fimbrien führt Mannose zu keiner Inhibition der Agglutination.

Diese Studie beschäftigt sich mit den Mannose-sensitiven Typ 1 Fimbrien und deren Expression (12, 26, 27, 42, 43, 44).

Da die Expression der Typ 1 Fimbrien einem Phasenwechsel unterliegt, ist es möglich, dass innerhalb einer Bakteriengruppe sowohl Organismen mit als auch

ohne Fimbrien auftreten. Dies ist abhängig von einem 314 bp großen invertierbaren DNA-Element, dem sog. "fim-Switch", welches den Promotor für die Hauptuntereinheit (major subunit) der Fimbrien, *fimA* beinhaltet (1, 42, 54). Die Inversion wird von zwei spezifischen "Site"-Rekombinasen mitbestimmt: FimB katalysiert die Inversion sowohl in die Richtung von "on" nach "off", als auch in die Richtung von "off" nach "on". FimE bewirkt die Inversion von "on" nach "off" (11, 13, 20, 49, 55).

Das sich am Fimbrienschaft befindende Mannose-bindende Adhäsine fimH spielt eine Rolle in der Rezeptorerkennung (28, 32).

Bis heute konnte noch keine überzeugende Erklärung für die Bedeutung der Typ 1 Fimbrien bei durch EHEC verursachten Erkrankungen geliefert werden.

Demgegenüber ist die Erforschung von uropathogenen *Escherichia coli* Stämmen (UPEC) in Bezug auf dieses Thema wesentlich weiter fortgeschritten (8, 46, 60, 65).

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Expression von Typ 1 Fimbrien an 48 Bakterienstämmen verschiedener Serotypen von HUS-Patienten untersucht werden. Zum einen soll die Fähigkeit der Bakterien, Typ 1 Fimbrien zu exprimieren, phänotypisch mit Hilfe eines Hefe-Agglutinationstests untersucht werden, zum anderen soll ein genotypischer Nachweis durch PCR und Restriktionsanalysen erfolgen. Des Weiteren sollen die Tests sowohl unter aeroben, als auch unter mikroaerophilen Bedingungen durchgeführt werden, um festzustellen, ob äußere Faktoren einen Einfluss auf die Produktion der Fimbrien haben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Laboreinrichtungen

Brutschränke	Heraeus, Hanau, verschiedene Modelle
Elektrophoresekammern	BioRad, München, mini-Protean-II-Dual Slab PhorCasterMini, PhorCasterMidi: Horizontale, Agarosegelelektrophoresekammern, versch. Modelle
Elektrophorese-Netzteile	BioRad, München, Modelle 3000Xi, 300, Biometra, Göttingen, Modelle P23, P24
Foto-Dokumentationsanlage	Intas, Göttingen, Micro-Cam 3000 Kaiser, Hitachi, Mitsubishi
Heizplatte	MR 3001, heidolph instruments
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main, Micromat
Lumi-Imager F1	Boehringer, Mannheim
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermocycler	Version 1.259; Bio-Rad, München Biometra Tgradient 96, Göttingen T Personal, Whatman Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Comfort
Tischinkubator	Eppendorf, Hamburg, Thermostat 5320
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5417 R Mini Spin, Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Merck eurolab, Darmstadt, Modell Test Tube Shaker, MELB 1718
Waagen	Ohaus, Scout II
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg 5404 R

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agarose NEE0	Carl Roth GmbH&CO KG (Karlsruhe)
Aqua destillata	UKM
Anaerobentopf	MERCK Diagnostic
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	peqLab Biotechnologie GmbH Erlangen
EDTA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
5xEnhancer Solution P	peqLab Biotechnologie GmbH Erlangen
Ethidiumbromid	BioRad, Hercules (CA/USA)
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefestammlsg. 100mg/ml Hefe (100µl Aliquotieren, einfrieren)	Selbsterstellung Inst. für Hygiene MS
HPLC-Wasser	Merck, DARMSTADT
Natriumchlorid 0.9%	Delta Pharm, Pfullingen
1kb DNA-Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	peqLab Biotechnologie GmbH Erlangen
30 % Mannose (0,3 g Mannose auf 1 ml PBS oder H ₂ O. 100 µl Aliquotieren, einfrieren)	Selbsterstellung Inst. für Hygiene, MS
Mikrobiocult C	Merck, Darmstadt
Mikropipetten 10, 20, 100 und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg: Modell Research
NE Buffer 2	New England BioLabs
50 Objektträger ca. 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Ösen	Nunc TM, Roskilde, Dänemark
Primer	Sigma ARK, Darmstadt
10x Reaktionspuffer	peqLab Biotechnologie GmbH Erlangen
Restriktionsenzym Hinf I	New England BioLabs
Taq DNA Polymerase	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Trisborat-EDTA-Puffer (TBE)	
10x Tris Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zahnstocher	

3.1.3 Medien

LB-Flüssigmedium:

Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1% (w/v)

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

3.1.4 Bakterienstämme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 41 HUSEC-Stämme und 6 weitere Stämme von HUS-Patienten aus der Stammsammlung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Karch, Institut für Hygiene und Konsiliarlaboratorium für Hämolytisch-Urämisches Syndrom Universitätsklinikum Münster und aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Röntgenring, Würzburg untersucht. Als Negativkontrolle für Typ 1 Fimbrien wurde der Stamm *E. coli* K12 MG1655, Δ fim Δ flu von PD Dr. Ulrich Dobrindt, Institut für Molekulare Infektionsbiologie Universität Würzburg, verwendet (**siehe Tabelle 1**).

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stämme	Original	Serotyp	stx	eae	E-Hly
HUSEC001	05-946	O111:H10	2	-	-
HUSEC002	5152/97	Ont:H ⁻	2	-	+
HUSEC003	6334/96	O157:H7	2	+	+
HUSEC004	3072/96	O157:H ⁻	2	+	+
HUSEC005	2907/97	O55:H7	2	+	-
HUSEC006	5376/99	O157:H ⁻	2	-	+
HUSEC007	7382/96	O103:H2	2	-	-
HUSEC008	2791/97	O103:H ⁻	2	-	+
HUSEC009	6833/96	OR:H2	2	-	-
HUSEC010	1805/00	O119:H2	1	+	-
HUSEC011	2516/00	O111:H8	1+2	+	+
HUSEC012	6037/96	O111:H ⁻	1+2	+	+
HUSEC013	2245/98	O261:H1	1	-	+
HUSEC014	5080/97	O26:H ⁻	1+2	+	+
HUSEC015	126814/98	OR:H11	1+2	-	-
HUSEC016	5028/97	Ont:Hnt	1	+	+
HUSEC017	3319/99	O26:H11	1+2	-	-
HUSEC018	1530/99	O26:H11	2	-	+
HUSEC019	1588/98	OR:H11	1	-	+
HUSEC020	3271/00	O26:H11	2	+	+
HUSEC021	0488/99	O145:H28	2	+	+
HUSEC022	4557/99	O145:H ⁻	2	+	+
HUSEC023	1169/97/1	O112:H ⁻	2d _{act}	+	-
HUSEC024	2996/96	O73:H18	2d _{act}	-	-

Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stämme	Original	Serotyp	stx	eae	E-Hly
HUSEC025	06-05009	O55:Hnt	1	-	-
HUSEC026	99-09355	O113:H21	2d _{act}	+	-
HUSEC027	03-07727	O163:H19	2d _{act}	-	-
HUSEC028	03-06687	O128:H2	1c+2d	-	+
HUSEC029	4256/99	O70:H8	2	-	-
HUSEC030	05-03519	O98:H ⁻	1	-	-
HUSEC031	7792/96	OR:H ⁻	1	-	+
HUSEC032	2441/98	O136:Hnt	1c+2	-	-
HUSEC033	4392/97	O145:H25	2	-	+
HUSEC034	3332/99	O91:H21	1+2+2d _{act}	-	+
HUSEC035	1529/98	O121:H19	2	-	+
HUSEC036	2839/98	O145:H ⁻	1+2c	-	-
HUSEC037	02-03885	O104:H21	1+2+2d _{act}	-	+
HUSEC038	3356/97/B	Ont:H21	1+2d _{act}	-	-
HUSEC039	3651/96	O76:H19	1c	-	-
HUSEC040	220/00	O174:H21	2c	+	-
HUSEC041	01-09591	O104:H4	2	-	-
	EDL933	O157:H7	1+2	+	+
	3232/96	O157:H7	2	+	+
	5524/00	O157:H7	2+2c	+	+
	493/89	O157:H-	2	-	+
	2518/00	O157:H-	2	-	+
	E06/486	O157:H-	2	-	+
	<i>E. coli</i> K12 MG 1655 Δ <i>fim</i> Δ <i>flu</i>	Typ 1 Fimbrien negativ	-	-	-

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht der Bakterien

Um die *E. coli* Bakterien anzuzüchten, wurden Sorbitol MacConkey Agarplatten mit den zur Verfügung stehenden Stämmen beimpft und bei 37°C für ca. 18 Stunden bebrütet.

Für den Hefe-Agglutinationstest wurden 2 ml LB-Medium mit jeweils einer Bakterienkolonie von den Platten beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 2 ml LB-Medium erneut mit der vorherigen über Nacht Kultur (1:100 Verdünnung) beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dies wurde mehrere Tage hintereinander, immer für die jeweilige Passage, durchgeführt.

3.2.2 Herstellung der Bakteriensuspension

Für die Herstellung der Bakteriensuspensionen wurde eine Öse mit einer frischen Bakterienkolonie von jedem Stamm entnommen und jeweils in 500 µl 0.9%-iger NaCl-Lösung suspendiert, für 10 min bei 99°C gekocht und anschließend 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Die abgenommenen Überstände wurden in neue Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert.

Die Bakteriensuspensionen der Bakterien nach einer Woche Inkubation bei 37°C wurden folgendermaßen hergestellt: 100 µl Bakteriensuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und für 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Überstände verworfen waren, wurden 100 µl 0,9%-iges NaCl hinzugegeben, kurz gevortext, für 10 min bei 99°C gekocht und erneut bei 7000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und als DNA Template im PCR-Verfahren eingesetzt.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um das Vorhandensein des spezifischen Fimbrien-Gens im Genom eines Stammes nachzuweisen, wurden verschiedene PCR-Verfahren durchgeführt. Mit der PCR ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren.

Der Standardansatz (50 µl) setzt sich aus 5 µl Templet und 45 µl Mastermix zusammen.

PCR - Ansatz Mastermix:

Steriles destilliertes Wasser	25,4 µl
10x Reaktionspuffer (peqLab)	5,0 µl
5x Enhancer Solution P (peqLab)	10,0 µl
Magnesiumchlorid	1,5 µl
Primer 1 (aus 30 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (aus 30 pmol/µl)	1,0 µl
dNTP-Mix (10 mM) (peqLab)	1,0 µl
Taq- DNA-Polymerase (peqLab)	0,2 µl

Beides wurde in ein PCR- Reaktionsgefäß pipettiert und in den Thermocycler für die DNA - Amplifikation gestellt.

Die genauen Primer- und PCR- Bedingungen sind in **Tabelle 2** aufgelistet.

Zunächst erfolgte im Reaktionsgefäß die Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA für 5 min auf 94°C erhitzt wurde, um die DNA-Stränge zu trennen.

Anschließend folgten 30-Zyklen der Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Synthese.

Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nach Beendigung der 30 Zyklen eine Oligonukleotid-Elongation bei 72°C für 5 min durchgeführt.

Es erfolgt im Anschluss eine gleichmäßige Abkühlung auf 4°C.

Wenn die fertigen Produkte nicht sofort weiterverwendet werden, können sie im Kühlschrank bei 4°C für einige Tage gelagert, bzw. bei -20°C für einen längeren Zeitraum im Eisschrank tiefgefroren werden.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der DNA-Fragmente wurden 1,5% Agarosegele verwendet. Die Herstellung der Agarosegele erfolgte, indem 15 g Agarosepulver in einem Liter 0,5-fachem TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, kurz abgekühlt und anschließend in die vorbereiteten Gelschlitten mit Kämmen gegossen wurden. Nach ca. 25 min ist das Gel hart geworden, so dass es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5% TBE-Puffer überschichtet werden konnte.

In die Geltaschen wurden jeweils 10-12µl PCR-Produkt, zu dem zuvor 2 µl Probenpuffer hinzugegeben wurde, pipettiert. In die erste Geltasche wurde ein Größenmarker, bestehend aus 1µl 1kb Ladder, 2µl 10-fachem DNA-Probenpuffer und 8µl HPLC, aufgetragen.

Die Elektrophorese lief je nach Größe der Kammern zwischen 80 und 120 V für etwa 45-60 min, bis die Bromphenolbande etwa 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente für ca. 20 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt.

Bevor die verschiedenen DNA-Fragmente unter dem UV-Transiluminator sichtbar gemacht und fotografiert wurden, erfolgte eine Entfärbung im Wasserbad für einige Minuten.

0,5x TBE-Puffer:

1900 ml Aqua bidestillata

100 ml 10x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer:

Tris Ultra	0.89M
Borsäure	0,89M
EDTA	25mM

DNA-Probenpuffer (10-fach):

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

Ethidiumbromid-Färbegrad:

200µl Ethidiumbromid in 1 Liter H₂O

Tabelle 2: PCR- Primer und Bedingungen

Primer	Primersequenz 5'—3'	Target	PCR- Bedingungen			Länge des PCR- Produktes	Referenz
			Denaturierung	Annealing	Extension		
Sts-1ba Con-2	CTCAAGCATAAAAATTTTAAAAAA CGAC ACGTCCCTGTAACCTGGGTAGGT TA	<i>Fim</i> - Switch	94°C 30s	62°C 60s	72°C 60s	952 bp spezifisch für den intakten <i>fim</i> -Switch	Li et al. (1997)
Sts-1 Con-2	CTCAAGCATAAAAATTTTAAACTA ACTG ACGTCCCTGTAACCTGGGTAGGT TA	<i>Fim</i> - Switch	94°C 30s	62°C 60s	72°C 60s	936 bp spezifisch für den deletierten <i>fim</i> -Switch	Li et al. (1997)
<i>fim</i> 5 <i>fim</i> 3	GCCGGATTATGGGAAAGA AGTGAACGGTCCCACCAT	<i>fim</i> A	94°C 30s	60°C 60s	72°C 60s	604 bp	Leathart & Gally (1998)

3.2.5 Restriktionsanalyse

Die spezielle Charakterisierung der unterschiedlichen on- oder off- Switch Genotypvariation erfolgte mittels Restriktionsanalyse unter Einsatz des Restriktionsenzym Hinf I.

Für diesen Restriktionsansatz wurden 17µl PCR-Produkt, 2µl 10xNE Buffer 2 und 1 µl Restriktionsenzym Hinf I in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß hineinpipettiert, kurz zentrifugiert und für 2 h bei 37° inkubiert.

Dann erfolgte der Auftrag auf ein 2%iges Agarosegel in einer Elektrophoresekammer.

3.2.6 Hefe-Agglutinationstest

Das charakteristische Kennzeichen von Typ 1 Fimbrien ist die Fähigkeit zur Hämagglutination von Erythrozyten aus Meerschweinchen sowie die Agglutination von Hefezellen. Beides kann mit α-D-Mannose inhibiert werden, so dass Typ 1 Fimbrien zu den Mannose-sensitiven Pili zählen (43).

Bei diesem Test wurden zunächst Hefe-Suspensionen mit und ohne Mannose hergestellt.

Die Arbeitskonzentrationen betragen 10 mg/ml Hefe und 3% Mannose.

Für die Durchführung des Hefe-Agglutinationstests wurden jeweils 15 µl Hefesuspension ohne Mannose und mit Mannose nebeneinander auf einen Objektträger pipettiert. Hierzu wurden jeweils 15 µl Bakterienkultur (Herstellung siehe 3.2.1.) hinzugegeben. Durch Schwenken des Objektträgers bzw. Verrühren mit Hilfe eines Zahnstochers wurde festgestellt, ob entweder eine positive Reaktion, d.h. eine Agglutination oder eine negative Reaktion (fehlende Agglutination) beobachtet werden konnte.

Dieser Test wurde mit der bei 37 °C inkubierten Bakterienkultur nach 3 Tagen, nach 1 Woche und nach 2 Wochen durchgeführt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 Stämme phänotypisch und genotypisch untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass 38 Stämme in der Lage sind, Typ 1 Fimbrien zu exprimieren (siehe Tabelle 3).

4.1 Phänotypischer Nachweis der Typ 1 Fimbrien im Hefe-Agglutinationstest

Die Fähigkeit der einzelnen Stämme, Typ 1 Fimbrien zu exprimieren, wurde durch den Test auf Mannose-sensitive Hefe-Agglutination gezeigt. Eine Verklumpung der Hefesuspension steht für eine positive Reaktion. Die Anwesenheit von Mannose hemmt die durch Typ 1 Fimbrien vermittelte Agglutination.

Getestet wurden 48 Stämme, darunter 41 Stämme der HUSEC-Kollektion, sowohl unter aeroben, als auch unter mikroaerophilen Bedingungen nach 3, 7 und 14 Tagen Inkubationszeit. Die Agglutinationsfähigkeit wurde graduiert in keine (-), leichte (+), mittelstarke (++) und starke (+++) Reaktion. Bei allen Stämmen zeigte der Durchgang mit den Originalen ohne Inkubationszeit keine Reaktion (-). Der Test unter Einsatz von Mannose ergab bei allen 48 Stämmen zu jeder Zeit ein negatives Testergebnis (-).

Bei den Stämmen HUSEC001, HUSEC002, HUSEC032, HUSEC036, HUSEC041 und *E.coli* K-12 MG1655 wurde im Verlauf des gesamten Testes keine Agglutination sichtbar. Auch die O157:H7 Stämme, die eine 16 bp Deletion aufweisen (HUSEC003, 42 (EDL933), 43 (3232/96), 44 (5524/00)), zeigten keine Klumpenbildung und damit ein negatives Ergebnis.

Im Verlauf des Agglutinationstests konnte bei allen positiv getesteten Stämmen eine Agglutinationsfähigkeit und Zunahme der Reaktionsstärke beobachtet werden. Die Agglutinationsfähigkeit bei den für drei Tage inkubierten Bakterien war bei allen positiv getesteten Stämmen schwächer und langsamer als nach einer bzw. nach zwei Wochen Inkubationszeit. Mit Ausnahme der Stämme HUSEC011 und HUSEC012, bei denen sich erst im dritten Testdurchgang eine schwache Reaktion (+) zeigte.

Anhand von Vortests konnte ermittelt werden, dass es keinen Unterschied macht, ob die Passagen täglich neu angesetzt werden oder ob man die zu Beginn hergestellte Bakteriensuspension für einige Tage inkubiert und verwendet.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den Ergebnissen des Hefe-Agglutinationstests unter aeroben oder mikroaerophilen Bedingungen, mit Ausnahme des Stammes HUSEC010 (O119:H2), bei dem unter mikroaerophilen Bedingungen eine stärkere Agglutination als unter aeroben Bedingungen beobachtet werden konnte.

Die einzelnen Testergebnisse der verschiedenen Stämme und Durchgänge sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Erläuterung zur nachfolgenden Tabelle:

- keine Agglutination
- + schwache Agglutination
- ++ mittelstarke Agglutination
- +++ starke, sofortige Agglutination

Tabelle 3 Ergebnisse des Hefe-Agglutinationstests

Stamm	Original	Serotyp	aerobe Bed. nach 3 Tagen	aerobe Bed. nach 1 Woche	aerobe Bed. nach 2 Wochen	mikroaero- phile Bed. nach 3 Tagen	mikroaero- phile Bed. nach 1 Woche	mikroaero- phile Bed. nach 2 Wochen
HUSEC001	05-946	O111:H10	-	-	-	-	-	-
HUSEC002	5152/97	Ont:H ⁻	-	-	-	-	-	-
HUSEC003	6334/96	O157:H7	-	-	-	-	-	-
HUSEC004	3072/96	O157:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC005	2907/97	O56:H7	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC006	5376/99	O157:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC007	7382/96	O103:H2	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC008	2791/97	O103:H ⁻	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC009	6833/96	OR:H2	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC010	1805/00	O119:H2	-	+	+	+	++	+++
HUSEC011	2516/00	O111:H8	-	-	+	-	-	+
HUSEC012	6037/96	O111:H ⁻	-	-	+	-	-	+
HUSEC013	2245/98	O26:H11	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC014	5080/97	O26:H ⁻	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC015	126814/98	OR:H11	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC016	5028/97	Ont:Hnt	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC017	3319/99	O26:H11	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC018	1530/99	O26:H11	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC019	1588/98	OR:H11	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC020	3271/00	O26:H11	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC021	0488/99	O145:H28	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC022	4557/99	O145:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC023	1169/97/1	O112:H ⁻	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC024	2996/96	O73:H18	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC025	06-05009	O55:Hnt	++	+++	+++	++	+++	+++

Fortsetzung Tabelle 3

Stamm	Original	Serotyp	aerobe Bed. nach 3 Tagen	aerobe Bed. nach 1 Woche	aerobe Bed. nach 2 Wochen	mikroaero- phile Bed. nach 3 Tagen	mikroaero- phile Bed. nach 1 Woche	mikroaero- phile Bed. nach 2 Wochen
HUSEC026	99-09355	O113:H21	+	+	++	+	+	++
HUSEC027	03-07727	O163:H19	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC028	03-06687	O128:H2	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC029	4256/99	O70:H8	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC030	05-03519	O98:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC031	7792/96	OR:H ⁻	+	+++	+++	+	+++	+++
HUSEC032	2441/98	O136:Hnt	-	-	-	-	-	-
HUSEC033	4392/97	O145:H25	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC034	332/99	O91:H21	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC035	1529/98	O121:H19	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC036	2839/98	O145:H ⁻	-	-	-	-	-	-
HUSEC037	02-03885	O104:H21	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC038	3356/97/8	Ont:H21	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC039	3651/96	O76:H19	+	++	+++	+	++	+++
HUSEC040	220/00	O174:H21	++	+++	+++	++	+++	+++
HUSEC041	01-09591	O104:H4	-	-	-	-	-	-
	EDL933	O157:H7	-	-	-	-	-	-
	3232/96	O157:H7	-	-	-	-	-	-
	5524/00	O157:H7	-	-	-	-	-	-
	493/89	O157:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
	2518/00	O157:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
	E06/486	O157:H ⁻	+	++	+++	+	++	+++
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655 Δ fim Δ flu	Typ 1 Fimbrien negativ	-	-	-	-	-	-

4.2 Genotypischer Nachweis der Phasenvariation

Um zu überprüfen, ob sich der Switch in der off- oder on-Ausrichtung befindet und zur Überprüfung der Korrelation zwischen den Ergebnissen im Hefe-Agglutinationstest und dem Phasenstadium des fim-Switches, wurden eine PCR und eine Restriktionsanalyse, wie in den Abschnitten 3.2.3. bis 3.2.5. beschrieben, durchgeführt.

Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Ergebnisse stellen eine exemplarische Auswahl aus allen Untersuchungen dar und zeigen keinen signifikanten Unterschied zu weiteren untersuchten Stämmen. Aus diesem Grund kann auf die Publikation weiterer Abbildungen verzichtet werden.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert.

4.2.1 PCR Analyse

In der ersten Versuchsreihe wurden die noch nicht induzierten Bakterienstämme (Original-Templates) eingesetzt.

Ein positives PCR-Produkt konnte bei 42 der 48 untersuchten Stämme beobachtet werden. Die sechs Stämme HUSEC001, HUSEC002, HUSEC032, HUSEC036, HUSEC041 und *E. coli* K-12 MG1655 Δ fim Δ flu weisen kein PCR-Produkt auf.

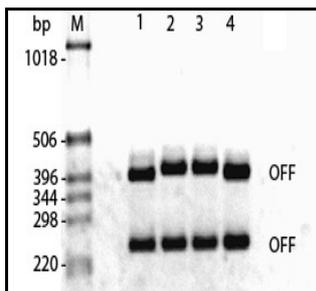
4.2.2 Restriktionsanalyse

Mit der nachfolgenden Restriktionsanalyse konnte gezeigt werden, dass sich alle zuvor in der PCR positiv getesteten Stämme in der off-Ausrichtung befinden. Sie weisen das in Abb. 2 exemplarisch dargestellte Restriktionsfragmentmuster auf. Bei den Stämmen HUSEC021 (O145:H28) und HUSEC022 (O145:H⁻) zeigte sich ein abweichendes Restriktionsfragmentmuster.

Beim zweiten Durchgang wurden die Templates nach einer Woche Inkubationszeit verwendet. Die Ergebnisse der PCR waren identisch mit denen des ersten Durchgangs. In der Restriktionsanalyse zeigten sich jedoch große Unterschiede. Der Großteil der Stämme befand sich mit dem fim-Switch in der on-Ausrichtung

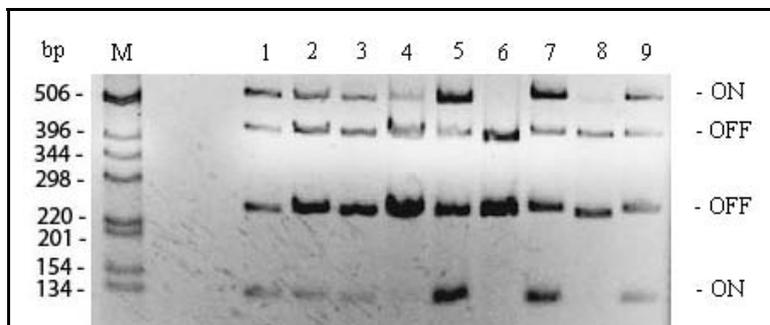
(Abb.3). Die O157:H7- Stämme blieben jedoch alle in der off-Ausrichtung.
 Damit bestätigen sich die Ergebnisse des Hefe-Agglutinationstestes, dass die O157:H7- Stämme nicht in der Lage sind, Typ 1 Fimbrien auszubilden.
 Des Weiteren zeigte sich bei den Stämmen HUSEC021 und HUSEC022, wie zuvor auch bei der Verwendung der Original Templets, ein abweichendes Bild im RFLP. Wie diese Abweichungen zustande kommen könnte in einer weiteren Studie näher untersucht und diskutiert werden. Die Stämme HUSEC010, HUSEC025 und HUSEC026 weisen keine eindeutige on-Ausrichtung auf. Sie bleiben teilweise noch in der off-Ausrichtung bzw. zeigen eine Tendenz zur on-Ausrichtung.

Abb. 2 Restriktion der PCR mit Hinf I, Original Templets (1. Durchgang)



Spur 1: HUSEC003 (O157:H7)
 Spur 2: HUSEC004 (O157:H)
 Spur 3: HUSEC005 (O55:H7)
 Spur 4: EDL933 (O157:H7)
 M : Marker

Abb. 3 Restriktion der PCR mit Hinf I,
 1 Woche Templets (2. Durchgang)



Spur 1: HUSEC017 (O26:H11)
 Spur 2: HUSEC034 (O91:H28)
 Spur 3: E06/486 (O157:H)
 Spur 4: HUSEC010 (O119:H2)
 Spur 5: HUSEC004 (O157:H)
 Spur 6: EDL933 (O157:H7)
 Spur 7: HUSEC005 (O55:H7)
 Spur 8: HUSEC003 (O157:H7)
 Spur 9: HUSEC038 (Ont:H21)
 M: Marker

Tabelle 4: Genotypischer Nachweis der Phasenvariation

Stamm	Original	Serotyp	Primer	Primer				
			Sts-1ba/Con-2	Sts-1/Con-2	PCR	Restriktion	PCR	Restriktion
			inaktiver Switch	Deletion	Original	Original	nach 1 Woche	nach 1 Woche
HUSEC001	05-946	O111:H10	-	-	-	-	-	-
HUSEC002	5152/97	Ont:H-	-	-	-	-	-	-
HUSEC003	6334/96	O157:H7	-	+	+	Off	+	Off
HUSEC004	3072/96	O157:H-	+	-	+	Off	+	On
HUSEC005	2907/97	O55:H7	+	-	+	Off	+	On
HUSEC006	5376/99	O157:H-	+	-	+	Off	+	On
HUSEC007	7382/96	O103:H2	+	-	+	Off	+	On
HUSEC008	2791/97	O103:H-	+	-	+	Off	+	On
HUSEC009	6833//96	OR:H2	+	-	+	Off	+	On
HUSEC010	1805/00	O119:H2	+	-	+	Off	+	Off
HUSEC011	2516/00	O111:H8	+	-	+	Off	+	On
HUSEC012	6037/96	O111:H-	+	-	+	Off	+	On
HUSEC013	2245/98	O26:H11	+	-	+	Off	+	On
HUSEC014	5080/97	O26:H-	+	-	+	Off	+	On
HUSEC015	126814/98	OR:H11	+	-	+	Off	+	On
HUSEC016	5028/97	Ont:Hnt	+	-	+	Off	+	On
HUSEC017	3319/99	O26:H11	+	-	+	Off	+	On
HUSEC018	1530/99	O26:H11	+	-	+	Off	+	On
HUSEC019	1588/98	OR:H11	+	-	+	Off	+	On
HUSEC020	3271/00	O26:H11	+	-	+	Off	+	On
HUSEC021	0488/99	O145:H28	+	-	+	Off	+	*
HUSEC022	4557/99	O145:H-	+	-	+	Off	+	*
HUSEC023	1169/97/1	O112:H-	+	-	+	Off	+	On
HUSEC024	2996/96	O73:H18	+	-	+	Off	+	On

* abweichendes Muster (HUSEC021 und HUSEC022)

Fortsetzung Tabelle 4: Genotypischer Nachweis der Phasenvariation

Stamm	Original	Serotyp	Primer	Primer				
			Sts-1ba/Con-2	Sts-1/Con-2	PCR	Restriktion	PCR	Restriktion
			inaktiver Switch	Deletion	Original	Original	nach 1 Woche	nach 1 Woche
HUSEC025	06-05009	O55:Hnt	+	-	+	Off	+	On
HUSEC026	99-09355	O113:H21	+	-	+	Off	+	On
HUSEC027	03-07727	O163:H19	+	-	+	Off	+	On
HUSEC028	03-06687	O128:H2	+	-	+	Off	+	On
HUSEC029	4256/99	O70:H8	+	-	+	Off	+	On
HUSEC030	05-03519	O98:H ₂	+	-	+	Off	+	On
HUSEC031	7792/96	OR:H ₂	+	-	+	Off	+	On
HUSEC032	2441/98	O136:Hnt	-	-	-	-	-	-
HUSEC033	4392/97	O145:H25	+	-	+	Off	+	On
HUSEC034	3332/99	O91:H21	+	-	+	Off	+	On
HUSEC035	12529/98	O121:H19	+	-	+	Off	+	On
HUSEC036	2839/98	O145:H ₂	-	-	-	-	-	-
HUSEC037	02-03885	O104:H21	+	-	+	Off	+	On
HUSEC038	3356/97/B	Ont:H21	+	-	+	Off	+	On
HUSEC039	3651/96	O76:H19	+	-	+	Off	+	On
HUSEC040	220/00	O174:H21	+	-	+	Off	+	On
HUSEC041	01-09591	O104:H4	-	-	-	-	-	-
	EDL933	O157:H4	-	+	+	Off	+	Off
	3232/96	O157:H7	-	+	+	Off	+	Off
	5524/00	O157:H7	-	+	+	Off	+	Off
	493/89	O157:H ₂	+	-	+	Off	+	On
	2518/00	O157:H ₂	+	-	+	Off	+	On
	E06/486	O157:H ₂	+	-	+	Off	+	On
	<i>E. coli</i> K-12 MG1655 Δ fim Δ flu	Typ 1 Fimbrien negativ	-	-	-	-	-	-

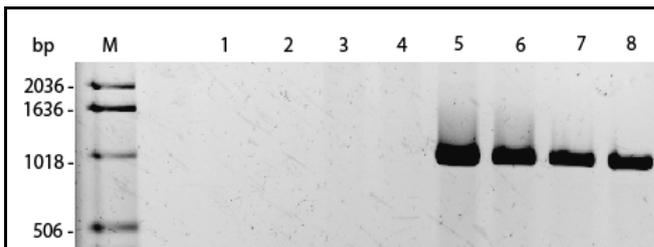
4.3 Nachweis des intakten fim-Switches

Für die Ermittlung des intakten fim-Switches wurden die Primer Sts-1ba und Con-2 verwendet (Li et al. 1997). Bei einem intakten Switch produzieren die Primer ein 952 bp großes Amplifikat.

Dieser intakte Switch ließ sich bei 38 von den 48 untersuchten Stämmen nachweisen (Tabelle 4 und Abb. 4).

Bei den vier O157:H7 Stämmen HUSEC003, 42 (EDL933), 43 (3232/96) und 44 (5524/00), sowie bei den Stämmen HUSEC001 (O111:H10), HUSEC002 (Ont:H⁻), HUSEC032 (O136:Hnt), HUSEC036 (O145:H⁻), HUSEC041 (O104:H4) und *E. coli* K-12 MG1655 Δ fim Δ flu wurde kein PCR-Produkt nachgewiesen.

Abb. 4 952 bp spezifisch für den intakten fim-Switch



Spur 1: HUSEC003 (O157:H7)

Spur 2: EDL933 (O157:H7)

Spur 3: 3232/96 (O157:H7)

Spur 4: *E. coli* K-12 MG1655 Δ fim Δ flu

Spur 5: HUSEC004 (O157:H⁻)

Spur 6: HUSEC005 (O55:H7)

Spur 7: HUSEC017 (O26:H11)

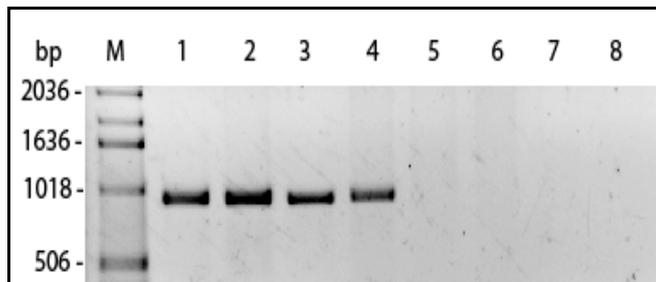
Spur 8: E06/486 (O157:H⁻)

M : Marker

4.4 Nachweis der 16 bp Deletion

Zum Nachweis der 16 bp Deletion wurden die Primer Sts-1 und Con-2 verwendet. Liegt eine Deletion des fim-Switches vor, so wird ein 936 bp Amplifikat sichtbar. Die "Switch Deletion", die auf eine 16 bp Deletion im fim-Promotor hinweist, konnte bei allen untersuchten O157:H7 Serotypen nachgewiesen und den Stämmen HUSEC003, EDL933, 3232/96 und 5524/00 zugeordnet werden (Abb. 4, Bahnen 1 bis 4). Die restlichen untersuchten Stämme zeigten kein PCR-Produkt und weisen somit keine Deletion auf (Abb. 4, Bahnen 5-8).

Abb. 5 936 bp spezifisch für die Deletion des fim-Switches



Spur 1: HUSEC003 (O157:H7)

Spur 2: EDL933 (O157:H7)

Spur 3: 3232/96 (O157:H7)

Spur 4: 5524/00 (O157:H7)

Spur 5: HUSEC005 (O55:H7)

Spur 6: HUSEC006 (O157:H)

Spur 7: HUSEC035 (O121:H19)

Spur 8: *E. coli* K-12 MG1655 Δ fim Δ flu

5 Diskussion

EHEC Bakterien sind in der Lage, eine hämorrhagische Kolitis auszulösen, die sich bei 10 bis 15 % der Erkrankten zu einem HUS entwickelt. Dieses ist gekennzeichnet durch eine Symptomentrias aus hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen (36, 38).

Bis heute gibt es weder eine kausale Therapie noch Impfpräventivmöglichkeiten, so dass sich die Forschung umso mehr mit der genauen Beschreibung des Erregerreservoirs, der verschiedenen Übertragungswege und der Pathomechanismen auseinandersetzen sollte (66).

Zahlreiche Virulenzfaktoren wie Toxine, Adhäsine, sekretorische Proteine und Fimbrien sind in Bezug auf den Pathomechanismus der EHEC bekannt. Diese Studie beschäftigt sich mit dem Nachweis der Expression der Typ 1 Fimbrien bei verschiedenen Serotypen von HUS Patienten.

Während die Bedeutung von Virulenzfaktoren wie z.B. der Shiga Toxine schon weitgehend erforscht ist, steht die Untersuchung der Typ 1 Fimbrien bei EHEC noch am Anfang. Welche Rolle sie im Krankheitsgeschehen spielen, ist bis heute nicht genau geklärt. Im Gegensatz dazu ist die Forschung bei UPEC schon weiter fortgeschritten.

Wie verschiedene Studien verdeutlichen, spielen Typ 1 Fimbrien bei einer Infektion mit UPEC im Urogenitaltrakt eine bedeutende Rolle. Im Mausmodell zeigten UPEC mit defekten Typ 1 Fimbrien eine reduzierte Überlebensrate sowie geringere entzündungsauslösende Effekte. Die Typ 1 Fimbrien begünstigen das Überleben der Bakterien und den Ausbruch der Krankheit (8, 46, 60, 65).

Es wird vermutet, dass am Anfang der Erkrankung die Bindung der UPEC mit Typ 1 Fimbrien an die Mannose-haltigen Rezeptoren von Vorteil ist. Im weiteren Verlauf und nach Etablierung der uropathogenen Erreger im Harntrakt scheint der Verlust der Bindungsfähigkeit von Vorteil zu sein, da der Erreger versucht, sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen und die Bindungsfähigkeit für die sich auf Phagozyten befindenden Mannose-haltigen Rezeptoren verliert (24, 53). Des Weiteren konnte eine Deletion des fim Genclusters sowie angrenzender DNA Bereiche aus dem bakteriellen Chromosom in einer Studie nachgewiesen

werden. Die Verkleinerung des Genoms der Bakterien scheint die Generationszeit zu verkürzen und damit zu einem Selektionsvorteil der uropathogenen Erreger im Harntrakt zu führen (5, 29). Weitere Faktoren und Mechanismen in Bezug auf den Schutz vor Wirtsabwehrmechanismen werden in anderen Publikationen vermutet und diskutiert (22, 61). Zudem scheint der Immunstatus eine wichtige Rolle bezüglich der verschiedenen Virulenzfaktoren einzunehmen (18). Diese Forschungsergebnisse könnten zum Verstehen der Expression von Typ 1 Fimbrien bei EHEC beitragen.

In der vorliegenden Studie konnte die Expression der Typ 1 Fimbrien bei allen Stämmen, die einen intakten Switch in der zuvor durchgeführten PCR aufwiesen, phänotypisch mit Hilfe eines Mannose-sensitiven Hefe-Agglutinationstests nachgewiesen werden. Im Verlauf des Testes kam es zu einer Zunahme der Agglutinationsfähigkeit. Dies zeigte sich sowohl durch eine stärkere Verklumpung der Bakteriensuspensionslösung ohne Mannose, als auch durch eine schneller eintretende Reaktion. Wie erwartet führte im Gegensatz dazu die Anwesenheit von Mannose bei keinem der Stämme zu einer sichtbaren Reaktion.

Der Zeitrahmen, bis eine Agglutination eintritt, und die Stärke der zum Nachweis der Fimbrienproduktion eintretenden Reaktion sind sehr variabel. Einige Stämme zeigten bei der Testung bereits nach drei Tagen Inkubationszeit eine rasche Agglutination, bei anderen entwickelte sich diese erst nach ein bis zwei Wochen Inkubation. Nach zwei Wochen zeigten alle Stämme mit intaktem Switch eine Agglutination.

Es stellte sich heraus, dass es keine Rolle spielt, ob die Anfangspassage für die Versuchsreihe im Inkubator bleibt oder ob die Passagen jeweils neu angesetzt werden.

In Bezug auf die Testergebnisse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Bakterien, die unter aeroben oder mikroaerophilen Bedingungen angezüchtet wurden. Nur der Stamm HUSEC010 zeigte eine stärkere Agglutination unter mikroaerophilen Bedingungen. In weiteren Studien könnten veränderte Wachstumsbedingungen dieses Stammes berücksichtigt und getestet werden.

Die Hypothese, dass mikroaerophile Bedingungen einen günstigen Einfluss auf die Fimbrienproduktion haben, wie von Iida et al. in ihrer Studie beschrieben, konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden (30).

Bei allen O157:H7 Stämmen trat während der Tests zu keinem Zeitpunkt eine Agglutination auf, was dafür spricht, dass diese Stämme keine Typ 1 Fimbrien exprimieren. Bei diesen Stämmen konnte mittels PCR eine 16 bp Deletion nachgewiesen werden, die für die fehlende Ausprägung der Typ 1 Fimbrien verantwortlich zu sein scheint (48).

Im weiteren Verlauf der Diskussion wird darauf noch näher eingegangen.

Auch bei den Stämmen HUSEC001, HUSEC002, HUSEC032, HUSEC036, HUSEC041 und *E. coli* K-12 MG1655 Δ fim Δ flu trat keine Agglutination auf. Bei diesen ließ sich mit der PCR weder ein intakter fim-Switch noch eine Deletion nachweisen.

Zur genotypischen Überprüfung der Ergebnisse sind PCR und Restriktionsanalysen durchgeführt worden, wobei zunächst die noch nicht induzierten Bakterienstämme (Original Templates) verwendet wurden.

Alle Stämme mit einem intakten fim-Switch und auch die O157:H7 Stämme mit der 16 bp Deletion zeigten eine "off" fim-Switch Konfiguration. Das Restriktionsfragmentmuster der Stämme HUSEC021 (O145:H28) und HUSEC022 (O145:H-) zeigte eine Abweichung. Daraufhin erfolgte eine Durchführung mit den Templates, die nach einer Woche Inkubationszeit hergestellt wurden. Der Großteil der Stämme mit intaktem Switch zeigte eine Änderung der Orientierung von "off" nach "on". Nur der schon beim Agglutinationstest abweichende Stamm HUSEC010 blieb in der "off"-Orientierung. Dies könnte damit zusammenhängen, dass dieser Stamm eine längere Inkubationszeit und veränderte Wachstumsbedingungen benötigt. Vermutlich wird sich unter Herstellung und Verwendung eines Templates nach längerer Inkubationszeit und anderen Wachstumsbedingungen eine "on"-Orientierung zeigen. Bei den Stämmen HUSEC021 (O145:H28) und HUSEC022 (O145:H-) zeigte sich wieder eine Abweichung des Restriktionsfragmentmusters. Wie dies entsteht und die möglichen Zusammenhänge diesbezüglich könnten Thema einer weiteren Studie

sein.

Es ergab sich in den Untersuchungen eine eindeutige Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp. Zu Beginn des Agglutinationstestes, wo kaum eine Agglutination induzierbar war, zeigte sich die "off"-Orientierung. Im weiteren Verlauf nahm die Agglutinationsfähigkeit zu und es folgte ein Phasenwechsel in Richtung "on"-Orientierung.

Bei den Bakterienstämmen mit einem intakten fim-Switch zeigten sich sowohl phänotypisch, als auch genotypisch die zwischen "on"- und "off"-Ausrichtung variable Expression der Typ 1 Fimbrien .

Entgegen den Ergebnissen von Iida et al. (30) konnten wir nachweisen, dass die sorbitfermentierenden Stämme O157:H⁻ einen intakten Switch aufweisen und in der Lage sind, Typ 1 Fimbrien zu exprimieren. Die Phasenvariabilität konnte bestätigt werden. Demgegenüber blieben alle O157:H7 Stämme in der "off"-Ausrichtung. Es zeigte sich kein Phasenwechsel nach einer längeren Inkubationszeit und somit keine Expression der Typ 1 Fimbrien.

Mit unseren Resultaten konnten wir die Forschungsergebnisse von Roe et al. (59), Shaikh et al. (62) und Iida et al. (30) bestätigen.

Mitverantwortlich für die Nicht-Expression der Typ 1 Fimbrien bei den getesteten O157:H7 Stämmen ist eine 16 bp Deletion 5' am Start vom fimA Gen in der Region, welche die Phasen-variable Ausprägung von Typ 1 Fimbrien bedingt (1, 30, 59, 62).

Der fehlende Phasenwechsel und damit das Verbleiben des fim Switches in der "off"-Ausrichtung scheinen für die O157:H7 Stämme von Vorteil zu sein, da EHEC der Serogruppe O157:H7 mit die am häufigsten isolierten Erreger sind (15, 36, 64).

Da Blum et al. bei UPEC feststellten, dass eine Deletion den Erregern einen Selektionsvorteil bietet, könnte dieses auch für die O157:H7 Stämme zutreffen (5). Da die Erkrankung bei Säuglingen, kleinen Kindern, alten und abwehrgeschwächten Menschen schwerer verläuft, scheinen der Immunstatus und der Zustand der Darmflora der Patienten eine Rolle zu spielen (58). In wieweit O157:H7-Stämme bezüglich dieser Faktoren eine bessere Möglichkeit der

Etablierung der Krankheit haben und ob sich die Ergebnisse von UPEC auf die vorliegenden Stämme übertragen lassen, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Weiterhin stellt sich noch die Frage, welcher Mechanismus dazu beiträgt, dass sich O157:H7 Stämme bei Rindern ausbreiten, ohne bei ihnen eine Kolitis oder Diarrhoe auszulösen. Es stellt sich die Frage, in wieweit die fehlende Expression der Typ 1 Fimbrien, eventuell durch eine fehlende Adhärenz an Epithelzellen, den Ausbruch der Krankheit bei den Tieren verhindert. Die Klärung dieser Frage könnte interessant sein in Bezug auf die Etablierung der Erkrankung beim Menschen und auf mögliche Maßnahmen zur Verhinderung des Ausbruchs einer Infektion (30).

Wir konnten zeigen, dass die Expression der Typ 1 Fimbrien bei EHEC, die einen intakten fim-Switch aufweisen, phasenvariabel ist. Der Phasenwechsel, der es ermöglicht, dass innerhalb einer Bakteriengruppe sowohl Organismen mit als auch ohne Fimbrien auftreten, ist abhängig von einem 314 bp invertierbaren DNA-Element, dem sog. "Fim-Switch" (1, 42, 54). Ob sich dieses invertierbare DNA-Element beeinflussen lässt, könnte Thema einer weiteren Untersuchung sein.

Die Inkubation bei 37°C für mehrere Tage im LB-Medium begünstigte die Expression der Fimbrien, wie bereits zuvor erwähnt. Für diese Stämme scheint die Fähigkeit zum Phasenwechsel von Vorteil zu sein und die Pathogenität zu fördern. Die Fimbrien ermöglichen ihnen eine Anhaftung an das Epithel und eine Etablierung der Infektion. Zudem könnte es sein, dass sich die Bakterien den Umgebungsbedingungen durch den Wechsel in die für sie jeweils günstige Phase besser anpassen können. Diesbezüglich sollten weitere Studien auch im Vergleich mit UPEC durchgeführt werden.

Für Prävention und Therapie des durch EHEC verursachten Krankheitsbildes könnten die vorliegende Studie und die Fortführungen der Untersuchungen auf diesem Gebiet von Relevanz sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R. and Eisenstein, B. I., 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5724-5727.
2. Benjamin, M. M., Datta, A. R., 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1669-1672.
3. Beutin, L., 1999. *Escherichia* O157 and other types of verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) isolated from humans, animals and food in Germany. In *Escherichia coli* O157 in Farm animal pp. 121-146. Edited by C. S. Stewart & H. J. Flint. Wallingford, UK: CABI Publishing.
4. Bitzan, M. M., Wang, Y., Lin, J., Marsden, P.A., 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. Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H. and Hacker, J., 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. Infect. Immun. 62: 606-614.
6. Bolton FJ., Aird H., 1998. Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: public health and microbiological significance. Br. J. Biomed. Sci. 55: 127-135.
7. Cherla RP., Lee SY., Tesh VL., 2003. Shiga toxins and apoptosis. FEMS Microbiol. Lett. 228: 159-166.
8. Connell, H., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S. and Svanborg, C., 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 9827-9832.
9. Donnenberg, M. S., Tacket, C. O., James, S. P., Losonsky, G., Nataro, J. P., Wasserman, S. S., Kaper, J. B. and Levine, M. M.. " Role of the eaeA gene in experimental enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." J. Clin. Invest. 2001, 107: 539-548.
10. Donnenberg, M. S. and Whittam, T. S. "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." J. Clin. Invest. 2001, 107: 539-548.

11. Dorman, C. J. and Higgins, C. F., 1987. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J. Bacteriol.* 169: 3840-3843.
12. Duguid, J. P., Clegg, S. and Wilson, M. I., 1979. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 12:213-227.
13. Eisenstein, B. I., Sweet, D. S., Vaughn, V. and Friedman, D. I., 1987. Integration host factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6506-6510.
14. 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. *Arch. Dis. Child.* 85, 125-131.
15. Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Karch, H., 2002. Diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *J. Lab. Med.* 26: 183-190.
16. Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, WL., Pulz, M., Kuczus, 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.
17. 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.
18. Fünfstück, R., Jacobsohn, N., Tschäpe, H. and Stein, G., 1997. Beeinflusst der ABO-, P1- und Lewis-Blutgruppenstatus von Patienten mit nicht-obstruktiver chronischer Pyelonephritis die Uropathogenität von *E. coli*?, p. 157-168. In R. Fünfstück, E. Straube, and G. Stein (eds.), *Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte.* Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany.
19. 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. Mikrobiol.* 49, 383-386.

20. Gally, D. L., Leathart, J. and Blomfield, I. C., 1996. Interaction of Fim B and Fim E with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 21:725-738.
21. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyern, 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. *J. Infect. Dis.* 186, 493-500.
22. Gordon, D. M. and Riley, M. A., 1992. A theoretical and experimental analysis of bacterial growth in the bladder. *Mol. Microbiol.* 6: 555-562.
23. Hacker, J. and Kaper, J. B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
24. Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and Goebel, W., 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* 8: 213-225.
25. Hacker, J., Blum-Oehler G., Mühldorfer, I., Tschäpe, H., 1997 . Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Mol. Microbiol.* Mar;23:1089-97.
26. Hacker, J., 1990. Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 151:1-27.
27. Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5. Auflage 2004, S. 238.
28. Hanson, M. S., and Brinton, C. C. Jr., 1988. Identification and characterization of *E. Coli* type-1 pilus tip adhesion protein. *Nature* 332: 265-268.
29. Hess, P., 2003. Genetische und molekularbiologische Analyse von fim Determinanten bei *Citrobacter freundii* und *Escherichia coli*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilian Universität Würzburg.
30. Iida, K.-I., Mizunoe, Y., Wai, S. N., and Yoshida S.-I., 2001. Type 1 Fimbriation and Its Phase Switching in Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, May 2001, p. 489-495.

31. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009, Datenstand: 28. Juni 2010, Robert-Koch-Institut.
32. Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N. and Hultgren, S. J., 1995b. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 2081-2085.
33. Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley, H. L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2: 123-140.
34. Karch, H., Friedrich, A. W., Gerber, A., Zimmerhackl, L. B., Schmidt, M. A., Bielaszewska, M., 2006. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome, Semin. Thromb. Hemost. 32: 105-12.
35. 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.
36. Karch, H., 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome. Semin. Thromb. Hemost. 27: 207-213.
37. Karch, H., Wiss, R., Gloning, H., Emmerich, P., Aleksic, S., Bockemühl, J., 1990: Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*. Dtsch. Med. Wochenschr. 115, 489-495.
38. Karch. H., Tarr, P. I., Bielaszewska, M. : Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int. J. Med. Microbiol. 2005 Oct; 295: 405-18.
39. Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S., and Lior, H., 2004: "The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985." J. Infect. Dis. 189: 556-563.
40. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology: Pathogenic *E. coli*. 2008.
41. Kleanthous, H., Smith, HR., Scotland, SM., Gross, RJ., Rowe, B., Taylor, CM., Milford, DV., 1990. Hemolytic uremic syndroms in the British Isles. 1985-1988: association with verotoxin producing *Escherichia coli*. 2. Microbiological aspects. Arch. Dis. Child. 65: 722-727.

42. Klemm, P., 1984. The *fimA* gene encoding the type-1 fimbrial subunit of *Escherichia coli*- nucleotide-sequence and primary structure of the protein. *Eur J Biochem* 143, 395-399.
43. Klemm, P. and Krogfelt, K. A., 1994. Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*, p. 9-26. In P. Klemm (ed.), *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
44. Krogfelt, K. A., 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial.
45. Kuczus, T., Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Zhang, W. A., 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.*, in press.
46. Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H. and Hultgren, S. J., 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 276: 607-611.
47. Levine, M. M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H. and Wachsmuth, K., 1987. "A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uraemic syndrome." *J. Infect. Dis.* 156: 175-182.
48. Li, B., Koch, W. H. and Cebula, T. A.. 1997. Detection and characterization of the *fimA* gene of *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Cell. Probes.* 11: 397-406.
49. McClain, M. S., Blomfield, I. C. and Eisenstein, B. I., 1991. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:5308-5314.
50. McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. and Kaper, J. B., 1995. " A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1664-1668.

51. Müthing, J., Schweppe, C.H., Karch, H., Friedrich, A. W., 2009. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb. Haemost.* 101: 252-264.
52. Ochoa, T. J., Cleary, T. G., 2003. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16: 259-263.
53. Ofek, I., Mosek, A. and Sharon, N., 1981. Mannose-specific adherence of *Escherichia coli* freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections, and of isolates subcultured from the infected urine. *Infect. Immun.* 34: 708-711.
54. Olse, P. B. and Klemm, P., 1994. Lokalization of promoters in the fim gene cluster and the effect of H-NS on the transcription of fimB and fimE. *FEMS Microbiol Lett* 116, 95-100.
55. Pallesen, L., Madsen, O. and Klemm, P., 1989. Regulation of the phase switch controlling expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3: 925-931.
56. Parc, C. H., Gates, K. M., Vandell, N. M., Hixon, D. L., 1996. Isolation of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (O157 and non-O157) in a community-hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 69-72.
57. Richard H. T., Foster J. W., 2003. Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* 52: 167-186.
58. Robert Koch Institut, Berlin "Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*". Ratgeber Infektionskrankheiten, Stand:11.01.2008.
59. Roe, A. J., Currie, C., Smith, D. G., Gally, D. L., 2001. Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26, *Microbiology* 147, 145-152.
60. Schaeffer, A. J., Schwan, W. R., Hultgren, S. J. and Duncan, J. L., 1987. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. *Infect. Immun.* 55: 373-380.

61. Schembri, M. A., Ussery, D. W., Workman, C., Hasman, H. and Klemm, P., 2002. DNA microarray analysis of fim mutations in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics*. 267: 721-729.
62. Shaikh, N., Holt, N., Johnson, J. R. and Tarr, P. I., 2007. Fim operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an evolutionary and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 273(1): 58-63. Epub. 2007 Jun 6.
63. Synge, B. A., 2000. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a veterinary view. *J. Appl. Microbiol.* 88, 31S-37S.
64. Tarr, P. I., Gordon, C. A., Chandler, W. L., 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrom. *Lancet* 365: 1073-1086.
65. Thankavel, K., Madison, B., Ikeda, T., Malviya, R., Shah, A. H., Arumugam, P. M. and Abraham, S. N., 1997. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J. Clin. Invest.* 100: 1123-1136.
66. Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L., Tarr, P. I., 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* 342, 1930-1936.
67. Yu, J., Kaper, J. B., 1992. Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 6, 411-417.
68. Zhang, W.L., Bielaszewska, M., Bockemühl, J., Schmidt, H., Scheutz, F., Karch, H., 2000a. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1441-1446.

7 Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
bp	Basenpaare
DAEC	Diffus adhärenente <i>E. coli</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
eae	EHEC attaching and effacing - Gen
EAEC	Enteraggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
Gb3 - Rezeptor	Globotriaosylceramid Rezeptor
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria - Bertani Medium
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minute
Mio.	Millionen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg
stx	Shiga Toxin - Gen
STX	Shiga Toxin
Tab.	Tabelle
Taq DNA Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
U	Unit
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
°C	Grad Celsius
%	Prozent

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Karch danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und das entgegengebrachte Vertrauen.

Besonders danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. W. Zhang für ihre liebevolle Unterstützung, ihr stets offenes Ohr und für die wertvollen Gespräche.

Danken möchte ich auch dem ganzen Laborteam, das mir stets freundlich und hilfsbereit zur Seite stand und Herrn Prof. Dr. J. Müthing.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich meiner Familie und allen, die mir während dieser Zeit zur Seite standen und mich in allen Bereichen unterstützt haben, aussprechen.