

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

Vorkommen und Struktur der Pathogenitätsinsel LPA
in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Hamburger, Julia Christina
aus Düsseldorf
2005

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

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Ch. von Eiff

ZUSAMMENFASSUNG

Vorkommen und Struktur der Pathogenitätsinsel LPA in Shiga Toxin-produzierenden
Escherichia coli
Julia Christina Hamburger

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) können wässrige Durchfälle, eine hämorrhagische Kolitis und das sich extraintestinal manifestierende hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen. Bei den meisten STEC-Stämmen trägt eine als LEE (Locus of Enterocyte Effacement) bezeichnete Pathogenitätsinsel die Gene für ein Typ III-Sekretionssystem und ein als Intimin bezeichnetes Adhäsion. Wenig ist bisher über STEC-Stämme bekannt, denen die Pathogenitätsinsel LEE fehlt. Anstelle von LEE ist im Genom zahlreicher STEC-Stämmen eine als LPA (Locus of Proteolysis Activity) bezeichnete Pathogenitätsinsel integriert. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Verbreitung der LPA-spezifischen Gene *iha*-, *btuB*- und *espl* untersucht. *iha* kodiert für ein Adhäsion, *espl* für eine Serinprotease und *btuB* für ein Vitamin B12 Rezeptor- und Transporterprotein. Die Untersuchungen zur Verbreitung dieser Markergene zeigten, dass *iha*, *espl* und *btuB* bei 20 von 34 STEC-Stämmen unterschiedlicher Serotypen gleichzeitig vorkommen. Dies deutet darauf hin, dass LPA zwischen *E. coli*-Stämmen ausgetauscht wird. Ein derartiger Austausch könnte eine Triebfeder für die Evolution der Pathogenität von STEC darstellen. Eine weitergehende Charakterisierung dieser LPA-positiven Stämme ergab, dass ihnen das Intimin-Gen fehlt. Die Stämme beherbergen ausschließlich die für die Shiga Toxin-Variante Stx2d kodierenden Gene entweder alleine oder in Kombination mit *stx1c*. Die weiteren molekularbiologischen Analysen ergaben, dass von dem *btuB*-Gen mehrere Allele existieren, die wir als *btuBI* und *btuBII* bezeichnen. Durch Southern-Hybridisierung konnten wir zeigen, dass die *btuB*-Allele in einer oder zwei Kopien im Genom vorliegen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine PCR-Strategie entwickelt, mit der verschiedene Allele der *btuB*-Gene differenziert nachgewiesen werden können. Die weite Verbreitung der LPA in Intimin-negativen STEC, ihre mögliche Funktion in der Pathogenese und die räumliche Nähe der Virulenzgene macht diese Region zu einem interessanten zukünftigen Forschungsgebiet.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2005

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serum Albumin)
CTP	Cytidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
M	molar, mol/l
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
p.A.	pro analysi
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNAse	Ribonuklease
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>stx</i>	Shiga Toxin-Gen
Stx	Shiga Toxin
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Tritidintriphosphat
U	Unit
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteile
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>E. coli</i> als Krankheitserreger	1
1.2 Die Pathogenese von STEC-Erkrankungen	2
1.3 STEC besitzen Pathogenitätsfaktoren	3
1.4 Die molekulare Struktur der Pathogenitätsinsel LPA	4
1.5 Fragestellung	5
2. Experimentalteil	6
2.1 Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien	6
2.1.1 Geräte	6
2.1.2 Chemikalien	7
2.1.3 Sonstige Materialien	7
2.2 Bioreagenzien	7
2.3 Medien	8
2.4 Bakterienstämme	8
2.5 Methoden	10
2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	10
2.5.2 Gelelektrophorese	12
2.5.3 Extraktion chromosomaler DNA	12
2.5.4 Restriktion von chromosomaler DNA	14
2.5.5 DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nylonmembran	15
2.5.6 Herstellung eine <i>btuB</i> -Sonde	15
2.5.6.1 Amplifikation von DNA durch PCR	15
2.5.6.2 Aufreinigung der PCR-Produkte	16
2.6.6.3 Markierung der DNA-Sonde	16

2.5.7 Southern-Blot Hybridisierung	17
2.5.8 DNA-Sequenzierungen	18
3. Ergebnisteil	
3.1 Nachweis der Intimin- und Shiga Toxin- Gene	20
3.2 Untersuchungen zur Struktur der Pathogenitätsinsel LPA	20
3.3 Verbreitung der LPA bei Shiga Toxin-produzierenden <i>E. coli</i> unterschiedlicher Serotypen	20
3.4 Nachweis unterschiedlicher Allele des <i>btuB</i>	22
3.5 Nachweis der verschiedenen <i>btuB</i> durch Southern-Blot Hybridisierung	28
4. Diskussion	31
5. Literaturnachweis	36
6. Lebenslauf	45
7. Danksagungen	46

1. Einleitung

Die molekulare Analyse der Pathogenität von *Escherichia coli* hat gezeigt, dass sich diese Bakterien durch die Fähigkeit zum horizontalen Gentransfer besonders schnell an neue Lebensbedingungen adaptieren können. Dies hat zur Evolution verschiedener Pathotypen innerhalb dieser Bakterienart geführt. Heute kennen wir bei dieser Bakterienspezies ein breites Spektrum von pathogenen Wirkungstypen, die die unterschiedlichsten Krankheitsbilder auslösen: uropathogene *E. coli*, Sepsis-assoziierte *E. coli*, *E. coli* als Auslöser von Neugeborenenmeningitiden und verschiedene darmpathogene *E. coli*. Zu diesen gehören die Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC).

1.1 *E. coli* als Krankheitserreger

STEC verursachen wässrige Durchfälle und die hämorrhagische Kolitis, aus der sich ein lebensbedrohliches hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) entwickeln kann (5, 7, 8, 9, 17, 18, 39). Das klassische HUS ist die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter und ist durch einen biphasischen Verlauf gekennzeichnet. Auf die enterale Symptomatik folgen nach kurzem Intervall die charakteristischen hämatologischen und nephrologischen Veränderungen. Das hämolytisch-urämische Syndrom ist definiert als Trias aus einer mikroangiopathischen hämolytischen Anämie, Thrombozytopenie und Niereninsuffizienz (29). Es ist die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter. Nach kurzem enteralem Intervall folgen Symptome wie Erbrechen, Bauchschmerzen, Lethargie, Blässe, Ikterus, Petechien und schließlich akutes Nierenversagen, eventuell auch zentralnervöse Symptome wie Krämpfe, Koma, Ataxie und Paresen assoziiert mit Hirnödemen eines Hirnödems oder cerebrale Ischämien und auch eine Pankreatitis, ein ARDS oder ein toxischer Myokardschaden (14, 15, 18, 20, 24). Abzugrenzen davon ist eine inkomplette Form des HUS, bei dem die Patienten eine Thrombozytopenie mit oder ohne Anämie entwickeln, die Nierenfunktion aber bis auf eine Mikrohämaturie beziehungsweise Proteinurie unbeeinträchtigt

bleibt (13, 44, 51). Die meisten Patienten erholen sich rasch nach der akuten Episode, es kommt aber trotzdem manchmal zur Defektheilung. So behalten einige eine chronische Niereninsuffizienz (30, 37) oder einen Diabetes mellitus, neurologische Defizite, Kolonstrikturen, Gallensteine, sekundäre arterielle Hypertonie oder Urinauffälligkeiten unspezifischer Signifikanz (15).

Nach einer enteralen Symptomatik, meist mit blutigen Durchfällen einhergehend, folgen ca. eine Woche später die charakteristischen hämatologischen und nephrologischen Veränderungen.

1.2 Die Pathogenese von STEC-Erkrankungen

Die mikroangiopathische Hämolyse mit Fragmentation der Erythrozyten und der Thrombozytensturz im peripheren Blut als Folge der Bildung intravaskulärer Mikrothromben wird pathogenetisch auf die Läsion kapillarer Endothelzellen zurückgeführt (4, 12, 38, 45, 54). In Bezug auf die Pathogenese der Erkrankung und die klinische Präsentation lassen sich zwei Phasen der EHEC-Infektion beschreiben. Die enterale Infektion wird durch die hohe Säureresistenz der EHEC begünstigt (26). Die Bakterien adhärieren am Darmepithel, sind aber nicht wie Salmonellen und Shigellen invasiv und werden deshalb nur extrem selten in Blutkulturen nachgewiesen. Als wichtige Serovare wurden in Deutschland O157:H7, O157:H⁻, O26:H11 und O103:H2, O145:H28 und O111:H⁻ identifiziert (27, 30, 37, 38). Als wichtigstes Reservoir für EHEC gelten Rinder und andere Wiederkäuer (2, 10, 21, 23, 37). Neben der Infektionsmöglichkeit über kontaminierte Lebensmittel oder über kontaminiertes Trinkwasser (33, 34) hat die direkte, fäkal-orale Übertragung von Mensch zu Mensch eine große Bedeutung (40, 49, 56). Eine kausale Therapie der durch EHEC verursachten Krankheitsbilder gibt es bisher nicht und Impfstoffe sind nicht verfügbar. Antibiotika, die während der Durchfallerkrankung verabreicht werden, erhöhen das Risiko, ein HUS zu entwickeln (70).

1.3 STEC besitzen Pathogenitätsfaktoren

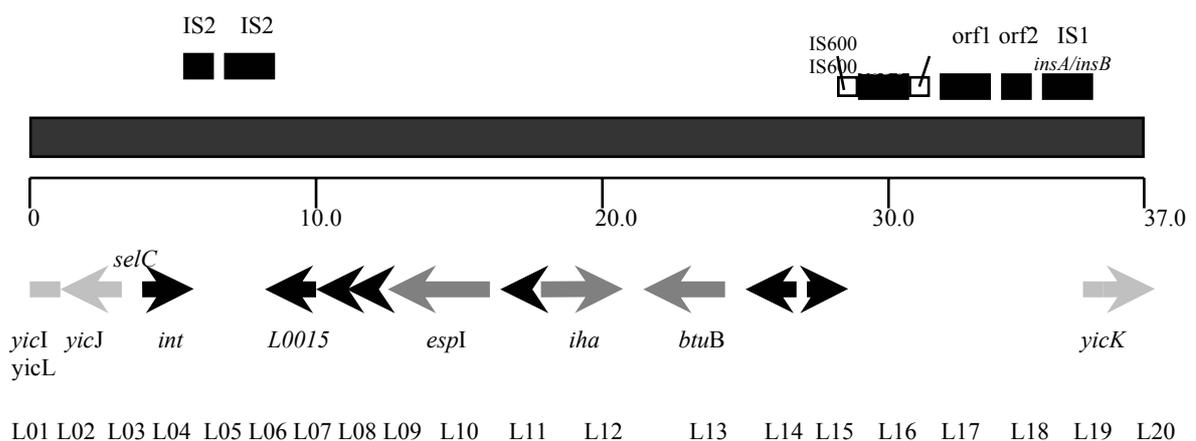
Als Hauptpathogenitätsfaktor von STEC gilt die Bildung von Shiga-Toxinen (27, 35, 47, 72). Es handelt sich hierbei um potente Inhibitoren der eukaryotischen Proteinbiosynthese, die als rRNA-N-Glykosidasen wirken. Entsprechend ihrer biologischen Aktivität werden Stx zur Familie der Ribosomen-inaktivierenden Proteine gezählt, zu denen auch das Pflanzengift Rizin gehört (12). Stx sind extrem potente Zellgifte. Zusätzlich scheint das als Intimin bezeichnete Adhäsin an der Pathogenese direkt beteiligt zu sein. Die für die Produktion des Intimins verantwortliche genetische Information liegt auf einer als LEE bezeichneten Pathogenitätsinsel im Chromosom der STEC. Pathogenitätsinseln sind durch die Präsenz von mehreren Pathogenitätsgenen und mobilen Elementen (Insertionselementen, Integrasen), die Lokalisation nahe an tRNA-Genen sowie ein veränderter G+C-Gehalt gegenüber dem Restgenom definiert. Ein Merkmal nahezu aller STEC ist die Bildung sogenannter „Attaching and Effacing“-Läsionen an Enterozyten (38, 71). Diese Adhärenz führt zur Zerstörung des Bürstensaums am Darmepithel. Hierbei gelangen die Bakterien sehr nah, ca. 10 nm, an die Plasmambran der Enterozyten. Unter der Anheftungsstelle lösen sich die Mikrovilli auf. An dieser Stelle bilden die Enterozyten einen becherförmigen eingestülpten Sockel aus, an dem die Bakterien festhaften. Für die Adhärenz ist ein Protein verantwortlich, das Intimin. Es handelt sich um ein 97 kDa großes Protein der äußeren Membran. Intimin wird von *eae* kodiert, einer 35 kb großen Region des EHEC-Genoms, dem LEE-Locus (Locus of enterocyte effacement), einem Genabschnitt, der als Pathogenitätsinsel definiert ist und nur in pathogenen Stämmen vorkommt. Das durch *eae* kodierte Protein Intimin ist dabei zusammen mit dem durch ein Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle eingeschleusten Rezeptor Tir (translocated intimin receptor) für eine feste Erregeradhärenz verantwortlich.

Der räumliche Zusammenhang der auf Pathogenitätsinseln lokalisierten Gene erlaubt deren koordinierte Expression.

1.4 Die molekulare Struktur der Pathogenitätsinsel LPA

Allerdings werden zunehmend STEC-Stämme identifiziert, denen das Intimin fehlt. Bei diesen Stämmen ist an Stelle der Pathogenitätsinsel LEE eine als LPA bezeichnete Pathogenitätsinsel in *selC* integriert (62). Wichtige Gene der LPA sind *iha*, *btuB* und *espI*. Das *iha* kodiert für ein Adhäsion, *btuB* für einen Vitamin B12 Rezeptor und *espI* für eine Serinprotease.

Abb.1: Struktur der Pathogenitätsinsel LPA



Bei den Adhäsionen und Serinproteasen der STEC handelt es sich um potentielle Pathogenitätsfaktoren (16, 50, 62, 64, 75).

1.5 Fragestellung

STEC unterscheiden sich von ihren harmlosen, nicht pathogenen Verwandten der physiologischen Darmflora durch den Besitz von Virulenzgenen. Bei vielen STEC-Stämmen wurde beobachtet, dass diese Virulenzgene nicht im Genom verstreut, sondern dicht gepackt auf einem Segment des Genoms zu finden sind. Diese Segmente werden als Pathogenitätsinseln bezeichnet.

Über die Verbreitung und Struktur der kürzlich bei STEC-Stämmen identifizierten Pathogenitätsinsel LPA ist noch wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung von *E. coli*-Stämmen, die diese Pathogenitätsinsel in ihrem Genom beherbergen. Als Markergene für die Untersuchungen sollten die für potenzielle Pathogenitätsfaktoren kodierenden Gene (*iha*, *btuB* und *espl*) verwendet werden. Darüber hinaus sollte die Genomvariabilität LPA-positiver Stämme analysiert werden. Anhand klinischer STEC-Isolate sollte die Bedeutung dieser Pathogenitätsinsel untersucht werden, um zu einem besseren Verständnis der Genomplastizität und der Evolution dieser Bakterien zu kommen.

2. Experimentalteil

2.1 Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien

2.1.1 Geräte

Brutschränke	Heraeus, Hanau, verschiedene Modelle
Elektrophoresekammern	BioRad, München, mini-Protean-II-Dual Slab
Elektrophorese-Netzteile	BioRad, München, Modelle 3000Xi, 300, Biometra, Göttingen, Modelle P23, P24
Foto-Dokumentationsanlage	Intas, Göttingen, Micro-Cam 3000
Heizplatte	MR 3001, heidolph instruments
Hybridisierungssofen	WTB, Binder, Tübingen
Lumi-Imager F1	Boehringer, Mannheim
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main, Micromat
pH-Meter	Schott, Labor-PH-Meter CG842
Schüttel-Inkubator	B. Braun, Melsungen, Certomat R/H
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermocycler	T Personal, Whatman Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, comfort
Tischinkubator	Eppendorf, Hamburg, Thermostat 5320
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5417 R
UV-DNA-Linker	UVP CL-1000, Crosslinker
Vortexer	Merck, Darmstadt, Modell Test Tube Shaker MELB1719
Waagen	Ohaus, Scout II
Wipp-Schüttler	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Modell 348/1
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg 5404 R

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht abweichend vermerkt, in p.A.-Qualität von den Firmen Biomol GmbH (Hamburg), New England Biolabs, Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-ARK GmbH (Darmstadt) bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

Agarose Seakem ME	Biozym, Hess. Oldendorf
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	BioRad, Hercules (CA/USA)

2.1.3 Sonstige Materialien

DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics,
Mannheim Filterpapier 3 MM	Chromatography Paper, Whatman
Hybridisierungsröhrchen	Amersham Pharmacia Biotech,
Microspin™ G-50 Columns	Freiburg
Mikropipetten 20, 100 und 1000µl	Eppendorf, Hamburg: Modell Research
96er Mikrotitrierplatten	Nunc, Wiesbaden
Nylonmembran	Roti Nylonplus, Roth, Karlsruhe
QIAQUICK PCR purification kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.2 Bioreagenzien

dNTP-Set	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
1 kb DNA-Ladder	Invitrogen
Klenow Enzym	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Lysozym	Serva GmbH, Heidelberg
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzym <i>Bam</i> HI	New England Biolabs,
SawadyTaq-DNA-Polymerase	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.3 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.

Sorbit-MacConkey-Nährboden (SMAC-Agar):

Pepton	2% (w/v)
Sorbit	1% (w/v)
Gallensalze Nr.3	0,15% (w/v)
Natriumchlorid	0,5% (w/v)
Neutralrot	0,003% (w/v)
Kristallviolett	0,0001% (w/v)
Agar	1,5% (w/v)

Der pH-Wert des Mediums lag bei 7,2.

2.4 Bakterienstämme

Im Rahmen der Arbeit wurden insgesamt 34 *E. coli*-Stämme 18 verschiedener Serotypen untersucht (siehe Tabelle 1: Stämme und Serotypen).

Sie wurden aus Stuhlproben von Patienten mit Diarrhöe und asymptomatischen Trägern in den Jahren 1996 bis 2000 in Würzburg isoliert. 15 isolierte Stämme waren von Patienten mit Diarrhöe, 19 Stämme wurden von asymptomatischen Menschen isoliert (27).

Dazu kommen als Referenzstämme der *E. coli* O157:H7 Stamm EDL 933, *E. coli* C600 und *E. coli* 2348/69 O127:H6.

Die Stämme wurden aus den Stammkulturen auf SMAC-Agar ausgestrichen.

Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

Tabelle 1: Charakteristika der verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Serotyp	Klinik
3143/97	O22:H8	asymptomatisch
4828/97	O40:H ⁻	asymptomatisch
3199/98	O40:H8	Diarrhöe
5293/98	O40:H8	asymptomatisch
5300/98	O40:H8	asymptomatisch
6480/96	O40:H8	asymptomatisch
0521/99	O76:H19	Diarrhöe
24196/97	O86:H ⁻	asymptomatisch
808/97	O90:H ⁻	Diarrhöe
3937/97	O91:H ⁻	asymptomatisch
4595/97	O91:H ⁻	asymptomatisch
4735/98	O91:H ⁻	Diarrhöe
4797/97	O91:H ⁻	asymptomatisch
1060/98	O113:H4	Diarrhöe
1823/98	O113:H4	Diarrhöe
4756/98	O113:H4	asymptomatisch
4736/98	O128:H ⁻	asymptomatisch
0653/99	O128:H2	Diarrhöe
2455/99	O128:H2	Diarrhöe
3115/97	O128:H2	asymptomatisch
3117/98	O128:H2	Diarrhöe
3171/97	O128:H2	Diarrhöe
3172/97	O128:H2	Diarrhöe
3600/97	O128:H2	asymptomatisch
6481/96	O146 :H ⁻	asymptomatisch
4789/97	O146:H21	asymptomatisch
4789/97a	O146:H21	asymptomatisch
0120/00	O146:H28	Diarrhöe
0165/00	O146:H28	Diarrhöe
0519/99	ONT:HNT	Diarrhöe
0520/99	ONT:H32	asymptomatisch
4941/97	ONT:H45	asymptomatisch
4831/97	Orauh:H ⁻	asymptomatisch
6451/98	Orauh:HNT	Diarrhöe
C600	NA	
2348/69	O127:H6	
EDL 933	O157:H7	

NA: nicht angegeben

NT: nicht typisierbar

2.5 Methoden

2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um das Vorhandensein eines Gens im Genom eines Stammes nachzuweisen, wurden verschiedene PCR-Verfahren durchgeführt. Dabei ist von folgendem Standardansatz ausgegangen worden. Als DNA Template wurde entweder isolierte DNA (siehe DNA-Extraktion), oder die Suspension einer einzelnen, auf einem Nährboden frisch angezüchteten Kolonie in 50 µl 0,9%iger Saline eingesetzt. Für eine Reaktion wurden in ein 0,2 µl PCR-Reaktionsgefäß folgende Reagentien pipettiert.

Gesamtansatz Mastermix: 50µl

10x Reaktionspuffer Y(peqlab)	5µl
5x Enhancer Solution P(peqlab)	10µl
dNTP-Mix (10mM Stammlösung, peqlab)	1µl
Upstream Primer (aus 30mM Stammlösung)	1µl
Downstream Primer (aus 30mM Stammlösung)	1µl
Taq-DNA-Polymerase (peqlab)	0,26µl
DNA-Template:	
chromosomale DNA	1µl
oder Bakteriensuspension	5µl
Aqua dest.	auf 50 µl auffüllen

PCR Primer und Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: PCR-Primer und Bedingungen

Primer	Nukleotidsequenz der Primer 5'-3'	Ziel	PCR-Bedingungen für je 30 Zyklen				Länge des PCR- Produktes (bp)	Referenzen
			Denaturierung	Annealing	Elongation			
espl-I	ATG GAC AGA GTG GAG ACA G	espl	94°C	52°C	72°C	60s	560	Schmidt <i>et al.</i> , 2001 (62)
espl-II	GCC ACC TTT ATT CTC ACC A		30s	60s	60s			
iha -I	CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC	iha	94°C	56°C	72°C	90s	1305	Schmidt <i>et al.</i> , 2001 (62)
iha-II	GTA TGG CTC TGA TGC GAT		30s	60s	90s			
btuB-I	GCC CCT TCC CAC TGT TTA CT	für <i>btuB</i> auf LPA	94°C	55°C	72°C	90s	1032	Schmidt <i>et al.</i> , 2001 (62)
btuB-II	GGT ATT GAT TGA TGG AGT GCG		30s	60s	90s			
btuB-a	ACC GGG CTG CAA CAA GTC G	<i>btuB</i> aus <i>E.coli</i> K12	94°C	57°C	72°C	60s	362	In dieser Arbeit
btuB-b	CCC TTA ATC CGC GCT TTC CCT		30s	60s	60s			
btuB-c	TCG CTT CAT TGC TTC CTA CG	<i>btuB</i> aus <i>E.coli</i> K12	94°C	52°C	72°C	40s	469	In dieser Arbeit
btuB-d	AAC GGT TTG ATA AGG ATA AG		30s	60s	60s			
VT2-cm	AAG AAG ATA TTT GTA GCG G	Stx2d	94°C	55°C	72°C	60s	256	Piérard <i>et al.</i> , 1998 (53)
VT2-f	TAA ACT GCA CTT CAG CAA AT		30s	60s	60s			
SK1	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	eae	94°C	52°C	72°C	60s	863	Schmidt <i>et al.</i> , 1994 (60)
SK2	CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G		30s	60s	60s			

2.5.2 Gelelektrophorese

Für die Analyse von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele in verschiedenen Agarose-Konzentrationen von 0,5 bis 2,0% verwendet. Die jeweilige Menge an Agarose wurde in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgekocht und gegossen. Die zu kontrollierenden Ansätze wurden mit 10-fach DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 1,5 V/cm² Gel durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande etwa $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen hatte. Nach circa 20 Minuten Färbebad in Ethidiumbromid wurde es unter UV-Licht begutachtet und gegebenenfalls zur Dokumentation fotografiert

10x TBE-Puffer:

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

DNA-Probenpuffer (10-fach):

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

2.5.3 Extraktion chromosomaler DNA

Bakterien wurden auf SMAC-Agar ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert. Eine Kolonie wurde in LB-Flüssigmedium geimpft und bei 37°C im Schüttel-Inkubator bei 180 rpm über Nacht belassen. Dann wurde 1 ml Kultur zentrifugiert (5.000 rpm, 15 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde in 5 ml Puffer 1 aufgenommen. Nach mindestens einstündiger Inkubation bei -20 °C musste 0,5 ml Lysozymlösung den gefrorenen Zellen zugesetzt und unter Invertieren aufgetaut werden. Daraufhin wurde der Ansatz für 45 Minuten auf Eis belassen. Nach Zugabe von 1 ml STEP-Lösung wurde der Ansatz im Wasserbad inkubiert

(1h, 50°C). Anschließend wurden 4µl RNase und 10 ml steriles Wasser zugegeben, gut umgeschwenkt und für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde die Suspension in ein SS34 Teflonröhrchen gegeben und mit 6 ml Phenol gut gemischt und zentrifugiert (10.000 rpm, 15 min). Die wässrige Phase wurde mit Hilfe einer gekappten Pipettenspitze entnommen und in einen 250 ml großen Erlenmeyerkolben mit 2,5 VT 96% Ethanol überführt. Durch Umschwenken wurde die Lösung von einem trüben in einen klaren Zustand gebracht. Danach war das fädige Präzipitat sichtbar, welches mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen überführt und mit 70% Ethanol gewaschen wurde. Die so erhaltene DNA wurde darin je nach DNA-Menge mit 400 bis 700 µl Aqua bidest gelöst. Dann wurde noch in je 100µl aliquotiert. Um etwaige RNA-Reste zu entfernen, wurden der DNA-Lösung 7 µl RNase zugesetzt

Puffer 1:

Tris/HCl	50 mM, pH 8,0
EDTA	50 mM, pH8,0

Lysozymlösung:

Lysozym	10 mg/ml	(frisch angesetzt)
Tris/HCl pH 8,0	0,25 M	

STEP-Lösung:

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
EDTA	400 mM
SDS	0,5%
Proteinase K	0,1% (kurz vor Verwendung zugeben)

RNaseA-Lösung:

1 % in 50 mM Na-Acetat pH 5,0

(20 Minuten aufkochen, um DNase Aktivität zu beseitigen)

2.5.4 Restriktion von chromosomaler DNA

Die Restriktion der Bakterien-DNA erfolgte mit dem Enzym *Bam* HI.

Ansatz: 20 μ l

15 μ l extrahierte DNA

2 μ l BSA (10fach)

2 μ l *Bam* HI Puffer

1 μ l *Bam* HI.

Der Ansatz wurde nach kurzem Zentrifugieren für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte der Auftrag auf ein 0,8% Agarosegel in einer Elektrophoresekammer. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei ca. 36 Volt.

2.5.5 DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nylonmembran

An die Elektrophorese und Färbung des Gels mit Ethidiumbromid schloss sich die Übertragung auf eine Nylonmembran an. Die Denaturierung des Gels erfolgte für 1 h in DNA-Lösung I bei Raumtemperatur unter Wechseln des Puffers nach 30 min. und die Neutralisation 1 h in DNA-Lösung II bei gleichen Bedingungen.

In der Zwischenzeit wurden eine Nylonmembran und drei Lagen 3MM-Filterpapier gleich groß zurechtgeschnitten. Das Gel kam auf eine Brücke aus 3MM-Filterpapier, die über einer Glasscheibe hing und auf beiden Seiten in eine Schale mit 10xSSC-Puffer reichte und auch damit benetzt war. Etwaige Luftblasen zwischen der Glasplatte und dem Papier wurden mit Hilfe einer Meßpipette ausgestrichen. Auf das Gel kam die Membran und darauf die drei Lagen Filterpapier. Die Membran und das Filterpapier mussten mit 2 x SSC in einer weiteren Plastikwanne befeuchtet und anschließend exakt gerade auf das Gel gelegt werden, so dass alle vier Ecken übereinander lagen. Alle Arbeitsschritte sollten mit Handschuhen bzw. Pinzette ausgeführt werden, um die Gefahr der Kontamination der Membran auszuschließen. Ein etwa 5 cm dicker Stapel Papiertücher wird auf die Größe des Gels geschnitten und mit einem etwa 500 g schweren Gewicht auf die Papiere aufgelegt. Die Transferzeit

beträgt 16h. Nach dem Blotten wird das Papier über der Membran abgenommen und die Taschen des darunterliegenden Gels auf der Membran markiert. Die Membran wird vom Gel getrennt, für 5 min in 6 x SSC getaucht und anschließend für ca. 30 min bei Raumtemperatur auf einem 3 MM Papier getrocknet. Danach erfolgt die Fixierung der DNA durch Belichtung der Membran in einem UV-Crosslinker bei 2x1100 Joule. Die Membran ist nun bereit für die Hybridisierung mit einer markierten Sonde (59).

20x SSC:

NaCl	3.0 M
Na-Citrat	0,3 M

DNA-Lösung I (Denaturierungslösung):

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

DNA-Lösung II (Neutralisierungslösung):

Tris/HCL (pH 8,0)	1,0 M
NaCl	1,5 M

2.5.6 Herstellung einer *btuB*-Sonde

2.5.6.1 Amplifikation von DNA durch PCR

Zunächst musste eine herkömmliche PCR mit 50 µl Ansätzen aus dem Bakterienstamm durchgeführt werden, aus dem die Sonde entstehen soll. In diesem Fall wurden zwei verschiedene Sonden hergestellt, aus zwei Stämmen mit zwei verschiedenen Primerpaaren (62):

Stamm 1:	<i>E. coli</i> 4797/97
Primerpaar 1:	btuB-I/btuB-II (siehe Primertabelle)

Stamm 2: C 600
Primerpaar 2: btuB-c/btuB-d (siehe Primertabelle)

2.5.6.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung wurde das Quiaquick-PCR-purification Kit:

Als erstes werden die jeweils gleichen PCR-Ansätze in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen zusammengegeben und mit der 5fachen Menge an PB-Puffer vermischt und zentrifugiert (610000 rpm, 0s). Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird verworfen. Dann werden 750µl PE-Puffer, zugegeben und zweimal zentrifugiert (60s, 10000 rpm). Die DNA wird vom Filter gelöst durch zentrifugieren mit 50 µl Aqua bidest. Je nach Stärke der bei einer Probelektrophorese ermittelten Bande des aufgereinigten PCR-Produktes ergibt sich die für die Markierung weiterverwendete Menge.

2.5.6.3 Markierung der Sonden-DNA

15 µl aufgereinigte DNA, etwa 3-5 µg, werden für 10 Minuten bei 96 °C denaturiert und 10 Minuten auf Eis abgekühlt. In einem weiteren Reaktionsgefäß werden 2 µl Hexanucleotid-Mix (Roche), 2 µl dNTP labeling kit(Roche), die DNA, und 1 µl Klenow Enzym(Boehringer) zusammenpipettiert, kurz zentrifugiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA beendet. Nach weiterer Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eisgekühltem Ethanol wird kurz mit dem Vortexer gemischt und die DNA durch Lagerung bei -70°C über 60 Minuten ausgefällt. Der Ansatz wird zentrifugiert (13000 rpm, 45 min, 4 °C) und das resultierende Pellet in 40 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird luftgetrocknet und in 50 µl Aqua bidest für 5 Minuten bei 37°C resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20°C.

DIG-DNA Labeling and Detection Kit:

Blocking-Reagenz

10x Hexanucleotid-Mix

10x dNTP Markierungsmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, DIG-dUTP)

Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat vom Schaf (Fab-Fragmente)

Klenow-Enzym (2 units/ μ l)

2.5.7 Southern-Blot Hybridisierungen

Vor der Hybridisierung wird die Membran mit der DNA-Seite nach innen gerollt in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Dazu kommt die Hybridisierungslösung. Die Membran wird etwa 1 h bei 68°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wird frische Hybridisierungslösung (2,5 ml pro 100 cm² Membran) mit 50 μ l markierter DNA dazugegeben. Die Sonde wurde vorher denaturiert durch 10 min. aufkochen.

Das Hybridisierungsröhrchen wird über Nacht bei 60 °C im Hybridisierungsofen inkubiert.

Die hybridisierte Membran wird zweimal 5 min bei Raumtemperatur in 50 bis 80 ml 2 x SSC, 0,1 % SDS pro 100 cm² in einer Plastikwanne auf dem Schüttel-Inkubator gewaschen. Anschließend wird zweimal 15 min bei 60 °C mit einer 0,04 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Der Filter ist daraufhin für die Färbung bereit.

Der Filter wird ca. 1 min in Puffer 1 gewaschen und im Anschluß für 30 min in ca. 100 ml Puffer 2 inkubiert. Nach erneutem kurzem Waschen in Puffer 1 wird der Filter für 30 min in 20 ml einer 1:5000 Verdünnung des Antikörper-Konjugates inkubiert. Als nächstes erfolgt zweimal 15 min Waschen der Membran in Puffer 1. Danach wird die Membran für 2 min in 20 ml Puffer 3 äquilibriert und im Dunkeln in 10 ml Färbelösung in einer verschweißten Plastiktasche inkubiert. Wenn die Banden sichtbar sind, wird die Färbereaktion durch Waschen in destilliertem Wasser gestoppt. Der Filter wird bei Raumtemperatur getrocknet.

Hybridisierungslösung:

5 x SSC

0,1 % N-laurylsarcosin, Natriumsalz

0,02 % SDS

1 % Blockingreagenz in sterilem Wasser gelöst
durch 1 Stunde Inkubation bei 60-70°C

Puffer 1:

100 mM Tris-HCl; pH 7,5

150 mM NaCl

Puffer 2:

0,5 % Blocking-Reagenz in Puffer 1, 1 h gelöst bei 70°C

Puffer 3:

100 mM Tris-HCl; pH 9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

Antikörper-Konjugat(DIG DNA Labeling and detection Kit)

Färbelösung:

45 µl NBT

35 µl X-phosphat

10 ml Puffer 3

2.5.8 DNA-Sequenzierungen

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurden 300 bis 500 Basepaare sequenziert.

Zur Sequenzierung wird der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit eingesetzt. Er enthält folgende Komponenten:

Terminator-Prämix:

Dye-Terminatoren (A, C, G, T)

dATP, dCTP, dTTP, dITP

Tris/HCl pH 9,0

MgCl₂

thermostabile Pyrophosphatase

Ampli*Taq*-DNA-Polymerase

Die Sequenzanalyse wurde auf einem Sequenziergerät (ABI Prism 377, Perkin-Elmer) der Fa. Applied Biosystems durchgeführt. Die benötigten Reagenzien stammten aus dem *Taq* Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). Die Methodik des weitgehend automatisierten Verfahrens richtete sich nach den Herstellerangaben.

Die Sequenzanalysen wurde mit der DNAsis-Software (Version 2.0, Hitachi-Software) und dem Internetprogramm NCBI Blast durchgeführt.

3. Ergebnisteil

3.1 Nachweis der Intimin- und Shiga Toxin- produzierenden Gene

Insgesamt wurden 34 *E. coli* Stämme untersucht, die 18 unterschiedlichen Serotypen zugeordnet werden konnten. Zuerst wurden Segmente der für Intimin -, Stx_{2d} - und Stx_{1c} - kodierenden Gene mit der PCR amplifiziert. Die hierzu verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2 aufgeführt. Jeweils von einem der PCR-Fragmente wurde die Nukleotidsequenz bestimmt, um die Spezifität des amplifizierten Genabschnittes zu zeigen. Die Ergebnisse der *stx*- und *eae*- PCR sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Stämme *stx*_{2d} positiv sind, aber nur in 20 Stämmen das *stx*_{1c} vorkommt.

3.2 Untersuchungen zur Struktur der Pathogenitätsinsel LPA („Locus of Proteolysis Activity“)

Zunächst wurde untersucht, ob die Markergene der Pathogenitätsinsel LPA immer gemeinsam vorkommen. Hierzu wurden PCR -Analysen mit den Primern *espl*-I/*espl*-II, *iha*-I/*iha*-II und *btuB*-I/*btuB*-II durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass die entsprechenden Gene nur in zwei Kombinationen vorkommen, entweder beherbergten die Stämme das *iha* alleine oder es trat gemeinsam mit *espl* und *btuB* auf. Es zeigte sich, dass *espl* immer gemeinsam mit *btuB* und *iha* vorkommt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

3.3 Verbreitung der LPA bei Shiga – Toxin – produzierenden *E. coli* unterschiedlicher Serotypen

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass die Markergene der LPA bei insgesamt 18 unterschiedlichen Serotypen vorkommen (Tabelle 3). Da diese Stämme unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden, ist eine klonale Ausbreitung unwahrscheinlich. Das Vorkommen von

LPA-assoziierten Genen in STEC unterschiedlicher Serotypen kann auch bedeuten, dass diese Pathogenitätsinsel zwischen den Stämmen ausgetauscht wird.

Tabelle 3: Vorkommen von Markergenen (*espl*, *iha*, *btuB*) der Pathogenitätsinsel LPA

<i>E. coli</i> Stamm	Serotyp	<i>espl</i> PCR	<i>iha</i> PCR	<i>btuB</i> PCR	<i>eae</i> PCR	<i>stx</i> PCR
3143/97	O22:H8	-	-	-	-	1c+2d
4828/97	O40:H ⁻	-	-	-	-	2d
3199/98	O40:H8	-	+	-	-	2d
5293/98	O40:H8	-	-	-	-	2d
5300/98	O40:H8	-	-	-	-	2d
6480/96	O40:H8	-	-	-	-	2d
0521/99	O76:H19	-	-	-	-	1c+2d
24196/97	O86:H ⁻	-	-	-	-	2d
808/97	O90:H ⁻	+	+	+	-	1c+2d
3937/97	O91:H ⁻	+	+	+	-	1c+2d
4595/97	O91:H ⁻	+	+	+	-	2d
4735/98	O91:H ⁻	+	+	+	-	1c+2d
4797/97	O91:H ⁻	+	+	+	-	2d
1060/98	O113:H4	+	+	+	-	1c+2d
1823/98	O113:H4	+	+	+	-	1c+2d
4756/98	O113:H4	+	+	+	-	1c+2d
4736/98	O128:H ⁻	+	+	+	-	1+2d
0653/99	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
2455/99	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
3115/97	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
3117/98	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
3171/97	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
3172/97	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
3600/97	O128:H2	+	+	+	-	1c+2d
6481/96	O146 :H ⁻	+	+	+	-	1c+2d
4789/97	O146:H21	+	+	+	-	1c+2d
4789/97a	O146:H21	+	+	+	-	1c+2d
0120/00	O146:H28	-	+	-	-	2d
0165/00	O146:H28	-	+	-	-	2d
0519/99	ONT:HNT	-	-	-	-	2d
0520/99	ONT:H32	-	+	-	-	2d
4941/97	ONT:H45	+	+	+	-	1c+2d
4831/97	Orauh:H ⁻	-	+	-	-	2d

6451/98	Orauh:HNT	-	-	-	-	2d
C600	NA	-	-	-	-	NA
2348/69	O127:H6	-	-	-	+	NA
EDL 933	O157:H7	-	+	-	+	1+2

3.4 Nachweis unterschiedlicher Allele des *btuB*

Die komplette Sequenzierung des Genoms von *E. coli* K12 und die Sequenzierung des O157:H7 Stammes EDL 933 zeigte, dass beide Stämme ein *btuB* besitzen. Diese sind komplett identisch. Ein weiteres *btuB* aus *E. coli* O91 weist lediglich 75 % Nukleotidhomologie zu den oben genannten Genen auf. Unser Ziel war es daher, eine PCR-Strategie zu entwickeln, mit der die unterschiedlichen *btuB* – Allele spezifisch nachgewiesen werden können. Die in Abbildung 2 dargestellte PCR-Strategie vermag dies zu leisten. Unter Verwendung der Primer *btuB*-a/*btuB*-b lässt sich das chromosomal kodierte *btuB* (I) spezifisch amplifizieren. Dies ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Primer laufen in den Spuren 2, 5, 8 und 11. Der 5`Primer befindet sich an Position 1087 bp und der 3`Primer an Position 1428 bp. Das Genprodukt ist 362bp groß (siehe Abbildung 2).

Um das für die Pathogenitätsinsel LPA spezifische *btuB* (II) nachzuweisen, wurden die Primer *btuB*-I/*btuB*-II verwendet. Das *btuB* auf der LPA ist 1845 Basenpaare groß wie aus Abbildung 2 ersichtlich. Der 5` Primer *btuB*-I befindet sich an der Position 291 bp des Gens, der 3`Primer an der Position 1303bp. Das bei der PCR amplifizierte PCR-Produkt ist 1032 bp groß. In Abbildung 5 laufen diese Primer für *btuB* II in den Spuren 1, 4, 7 und 10.

Das in allen *E. coli*-Stämmen vorkommende *btuB* wurden mit dem Primerpaar *btuB*-c/*btuB*-d nachgewiesen. Auch dieses Gen ist 1845 Basenpaare groß.

Der verwendete 5`Primer *btuB*-c befindet sich an der Position 1251bp, der 3`Primer an der Position 1700 bp. Das bei dieser PCR-amplifizierte Produkt ist 469 bp groß (siehe Abb.2).In der Abbildung 5 laufen diese Primer in den Spuren 3, 6, 9 und 12.

Das PCR Ergebnis zeigt in der Tabelle 4 im direkten Vergleich, dass alle Stämme bei der PCR mit dem Primerpaar *btuB*-c/*btuB*-d positiv sind. Mit dem

Primerpaar btuB-a/btuB-b sind 28 Stämme positiv. Mit dem LPA-spezifischem Primerpaar btuB-I/btuB-II waren 20 Stämme positiv.

Die Abbildung 5 zeigt dazu Beispielstämme mit den jeweiligen Genkombinationen.

Stamm *E. coli* 4797/97 weist bei allen drei Primerpaaren positive Banden auf, der *E. coli* Stamm 520/99 zeigt sich nur mit dem Primerpaar 3 positiv. *E. coli* Stamm 3143/97 stellt sich negativ für die LPA-spezifischen Primer 3 dar, aber für die anderen beiden positiv, der Referenzstamm C600 zeigt dasselbe Bild.

Abb.2: PCR-Strategie zum Nachweis der für BtuB kodierenden Gene

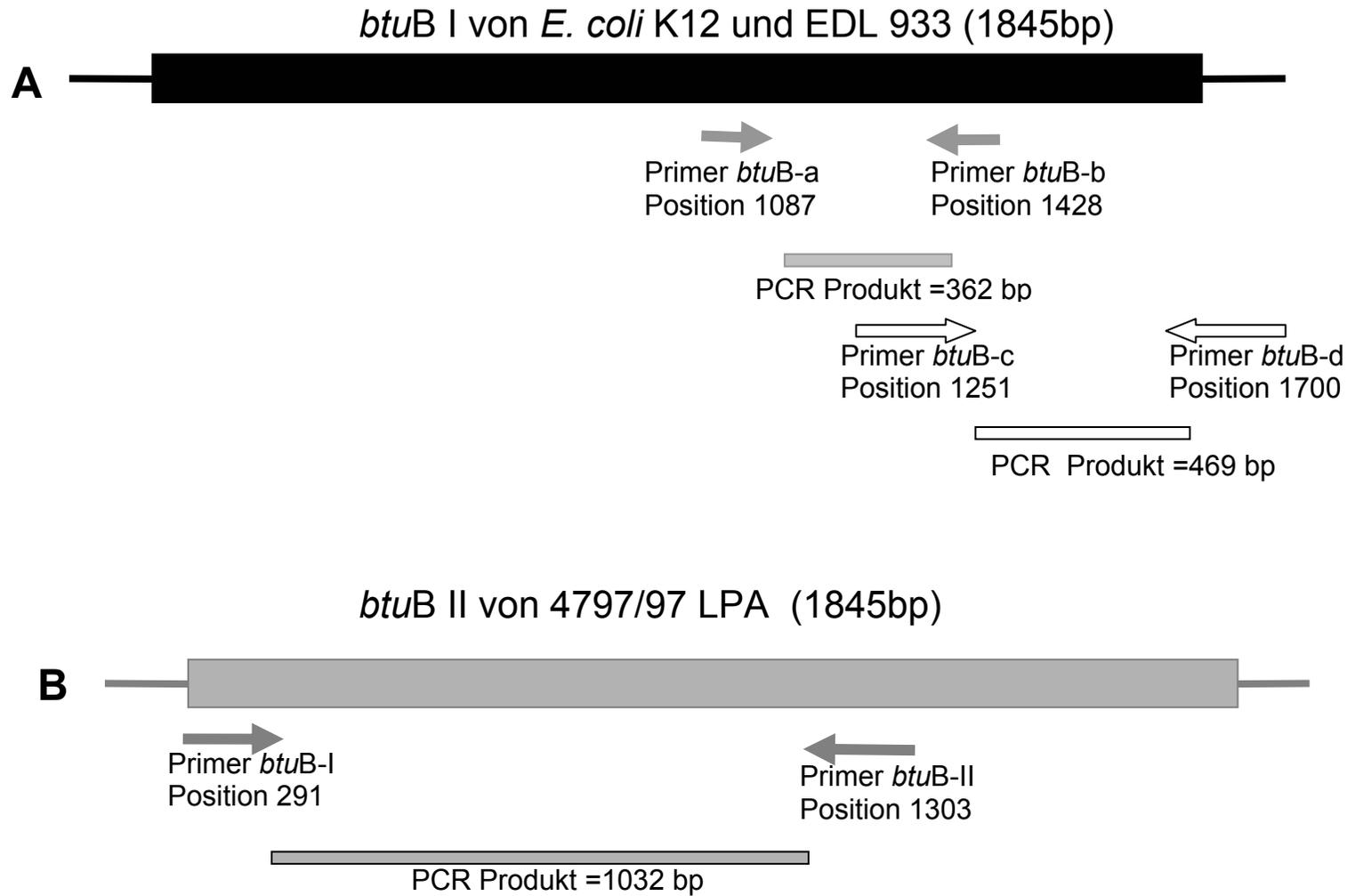


Tabelle 4: Nachweis unterschiedlicher Allele des *btuB*

<i>E. coli</i> - Stamm	Serotyp	<i>btuB</i> PCR	<i>btuB</i> PCR K12 (1)	<i>btuB</i> PCR K12 (2)
3143/97	O22:H8	-	+	+
4828/97	O40:H ⁻	-	+	+
3199/98	O40:H8	-	+	+
5293/98	O40:H8	-	+	+
6480/96	O40:H8	-	+	+
5300/98	O40:H8	-	+	+
0521/99	O76:H19	-	+	+
24196/97	O86:H ⁻	-	-	+
808/97	O90:H ⁻	+	+	+
3937/97	O91:H ⁻	+	+	+
4595/97	O91:H ⁻	+	+	+
4735/98	O91:H ⁻	+	+	+
4797/97	O91:H ⁻	+	+	+
1060/98	O113:H4	+	+	+
1823/98	O113:H4	+	+	+
4756/98	O113:H4	+	+	+
0653/99	O128:H ⁻	+	+	+
2455/99	O128:H2	+	+	+
3115/97	O128:H2	+	+	+
3117/98	O128:H2	+	+	+
3171/97	O128:H2	+	+	+
3172/97	O128:H2	+	+	+
3600/97	O128:H2	+	+	+
4736/98	O128:H2	+	+	+
6481/96	O146 :H ⁻	+	+	+
4789/97a	O146:H21	+	+	+
4789/97	O146:H21	+	+	+
0120/00	O146:H28	-	-	+
0165/00	O146:H28	-	-	+
0519/99	ONT:HNT	-	-	+
0520/99	ONT:H32	-	-	+
4941/97	ONT:H45	+	+	+
6451/98	Orauh:H ⁻	-	-	+
4831/97	Orauh:HNT	-	-	+
C600	NA	-	+	+
2348/69	O127:H6	-	-	+
EDL 933	O157:H7	-	+	+

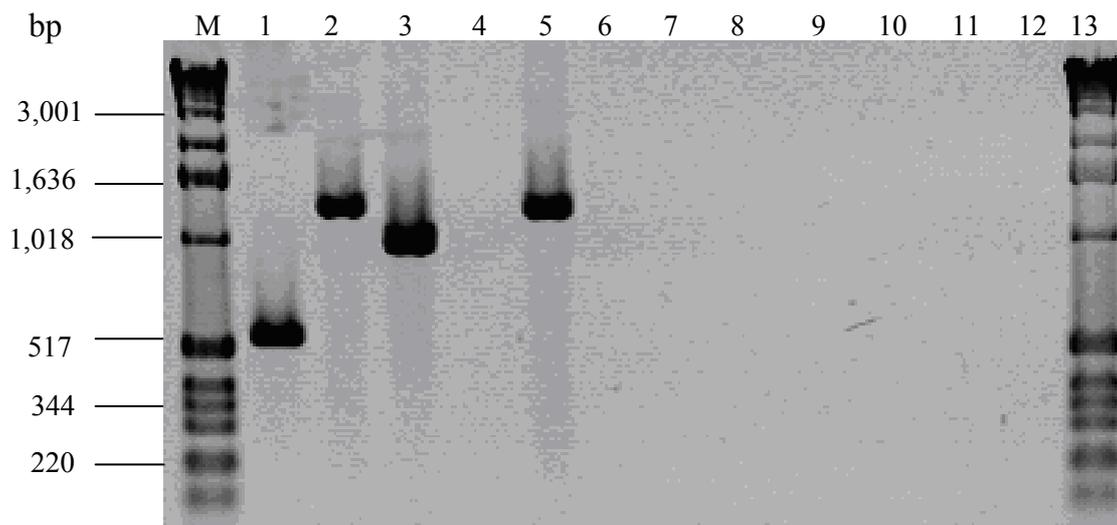


Abb.4: Nachweis der aus der *espi*-PCR (Spur 1,4 ,7 und 10), der *iha*-PCR (Spur 2 ,5 ,8 und 11) und der *btuB*-PCR (Spur 3 ,6 ,9 und 12) resultierenden DNA-Fragmente.

Folgende Stämme wurden analysiert:

E. coli 4797/97 (Spur 1,2,3)

E. coli 0520/99 (Spur 4,5,6)

E. coli 3143/97 (Spur 7,8,9)

E. coli C600 (Spur 10,11,12)

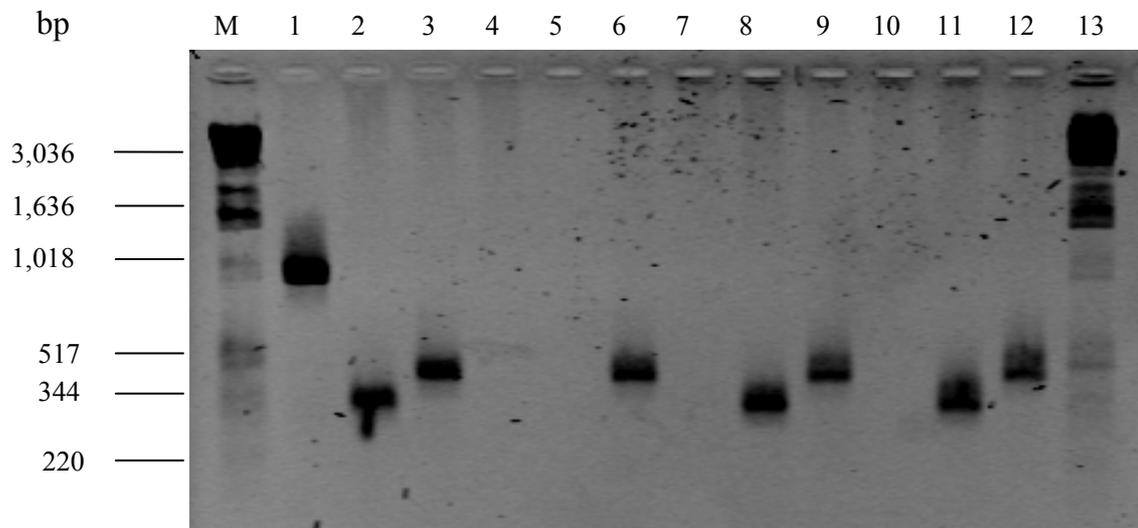


Abb.5: Darstellung der unterschiedlichen Allele des *btuB* im Agarosegel

Verwendete Stämme:

- Stamm *E. coli* 4797/97 in den Spuren 1-3
- Stamm *E. coli* 0520/99 in den Spuren 4-6
- Stamm *E. coli* 3143/97 in den Spuren 7-9
- Stamm *E. coli* C600 in den Spuren 10-12

Die hier verwendeten *btuB*-Primer zeigen im direkten Vergleich, dass die *btuB*-Gene an unterschiedlichen Stellen exprimiert werden.

Die *btuB*-Primer spezifisch für die LPA befinden sich in den Spuren 1, 4, 7 und 10,

die *btuB*-Primer für die chromosomale DNA befinden sich in den Spuren 2, 5, 8 und 11 und die Universal-*btuB*-Primer sind in den Spuren 3, 6, 9 und 12 gelaufen.

3.5 Nachweise der verschiedenen *butB* durch Southern-Blot-Hybridisierung

Um die Lokalisation des *btuB* zu bestimmen, wurde die chromosomale DNA aller untersuchten Stämme isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. Dann wurde die DNA mit zwei verschiedenen *btuB*-Sonden hybridisiert. Bei der Hybridisierung mit der *btuB*-Sonde 1 wiesen alle 34 Stämme einschließlich der Referenzstämme zwischen 11 und 12 Kilobasen(kb) ein Bandenmuster auf.

In Abbildung 6 sind 4 Stämme stellvertretend für die 34 untersuchten abgebildet.

Die Stämme sind so kombiniert, dass alle Markergenkombinationen aus dem Ergebnis der PCR der LPA vorkommen(für *espl*, *iha* und *btuB*)

Stamm 1, *E. coli* 4797/97 ist bei allen Markergenen in der PCR positiv.

Stamm 2, *E. coli* 520/99 ist nur bei *iha* in der PCR positiv.

Stamm 3, *E. coli* 3143/97 ist bei allen Markergenen in der PCR negativ

Stamm 4, *E. coli* C600 wurde als Referenzstamm eingesetzt. Er ist wie erwartet ebenfalls bei den Markergenen in der PCR negativ.

Bei der Hybridisierung mit der Sonde 2, der LPA spezifischen Sonde, fand sich dasselbe Ergebnis wie in der vorangegangenen PCR mit den verwendeten Primern.

20 Stämme waren positiv. Sie wiesen bei circa 10 kb ein Signal auf. 14 Stämme zeigten kein Bandenmuster, sie waren also negativ.

Als Beispiel für diese Hybridisierung steht Abbildung 7.

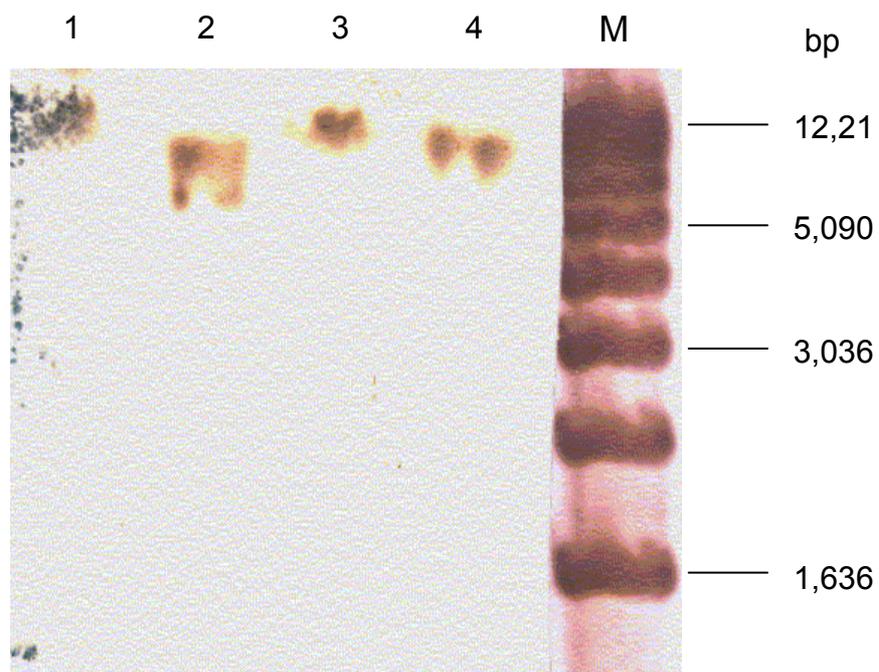


Abb.6: Southern Blot –Hybridisierung unter Verwendung der *btuB*-Sonde

Chromosomale DNA folgender Stämme wurden hybridisiert:

1. *E. coli* 4797/97
2. *E. coli* 0520/99
3. *E. coli* 3143/97
4. *E. coli* C600

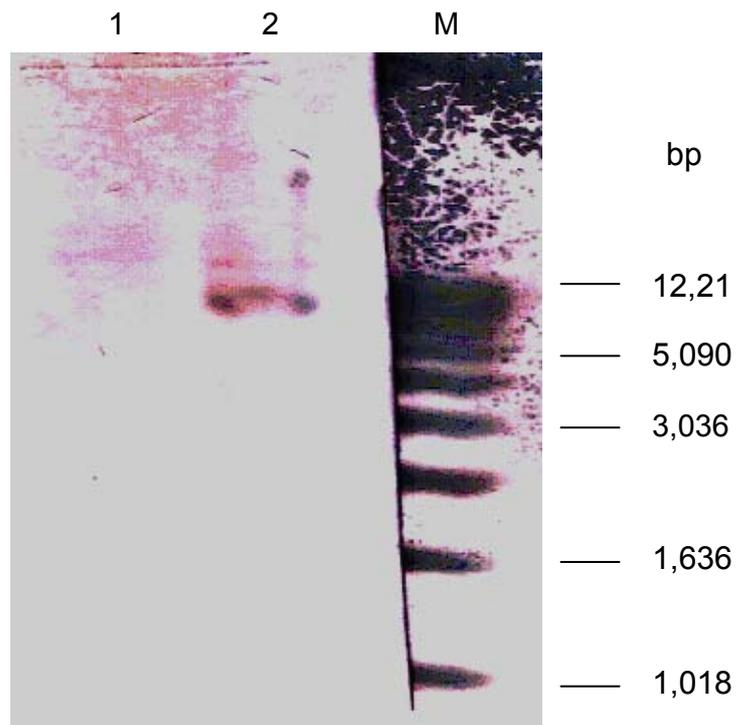


Abb.7: Southern Blot mit LPA spezifischer *btuB*-Sonde

Verwendete *E. coli*-Stämme:

1. *E. coli* 520/99
2. *E. coli* 4797/97

4. Diskussion

Die Koevolution von Wirt und Erreger muss als dynamischer Prozess verstanden werden, der einem großen Selektionsdruck unterliegt. So ist zu verstehen, dass immer wieder neue Erregertypen bzw. Pathovarietäten einer Bakterienart auftauchen, die mit konventionellen mikrobiologisch-diagnostischen Methoden nicht erfasst werden (22, 52, 53, 55, 61). Seit 1982 werden STEC zunehmend als Erreger von Diarrhöen und hämorrhagischer Kolitis identifiziert (2, 3, 21, 46, 57). Diese Infektionen treten in Deutschland in allen Altersgruppen auf; Kleinkinder und ältere Menschen sind besonders gefährdet (3, 27, 28, 30, 36, 37, 40, 43, 57). STEC besitzen eine hohe Infektiosität. Als Übertragungswege gelten rohe Lebensmittel, kontaminiertes Wasser, Tierkontakte und Schmierinfektionen. Neben dem Serotyp O157:H7 verursachen eine Vielzahl weiterer Serotypen wie O26:H11, O111:H2, O103:H2, O145:H28 blutigen Durchfall und HUS (30). Die meisten durch STEC verursachten Darmerkrankungen unterscheiden sich klinisch nicht von durch andere bakterielle oder virale Erreger hervorgerufenen Infektionen. Bei einer Infektion mit STEC bekommen aber 10-15% der Erkrankten nach einigen Tagen mit wässrigem Durchfall blutigen Stuhl, ein Zeichen für eine schwere Infektion, einige auch die gefürchtete Komplikation, das hämolytisch-urämische Syndrom(HUS). Speziell für den Stamm STEC O157:H7 liegt die Infektionsdosis bei unter hundert Organismen (69). Nach einer Inkubationsphase von drei bis vier Tagen (7) bekommen die Patienten wässrigen Durchfall. Nach einigen Tagen wechselt der Durchfall zu einer blutigen Diarrhöe (in über 90% bei nachgewiesener O157:H7-Infektion (70)).

Bei *E. coli*-Stämmen konnte man zeigen, dass spezifische Gene, deren Produkte für die Toxinbildung, Adhärenz oder Invasivität verantwortlich sind, durch einen Gentransfer erworben wurden. Plasmide und Bakteriophagen dienen als wichtige mobile Träger von Virulenz-assoziierten Genen (16, 25, 32, 41). Auch sogenannte Pathogenitätsinseln sind an der Ausbreitung von Pathogenitätsgenen beteiligt. Pathogenitätsinseln sind durch die Präsenz von

mehreren Pathogenitätsgenen und mobilen Elementen (Insertionselementen, Integrasen), die Lokalisation nahe an tRNA-Genen sowie durch einen veränderten G+C-Gehalt gegenüber dem Restgenom definiert. Der räumliche Zusammenhang der auf Pathogenitätsinseln lokalisierten Gene erlaubt deren koordinierte Expression (31). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Verbreitung der kürzlich bei STEC identifizierten LPA untersucht (62).

Die Pathogenitätsinsel LPA kodiert für ein sezerniertes 110 kDa Protein. Hierbei handelt es sich um einen Vertreter der Klasse der Autotransporter-Proteine (62). Prototyp der Autotransporterproteine ist die IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*. Derartige Proteine tragen am C-Terminus eine Domäne, die den Transport des Proteins durch die äußere Membran bewerkstelligt, indem sie eine Pore bildet. Neben dem speziellen Transportmechanismus konnte die mögliche Funktion des Proteins (EspI) noch nicht geklärt werden. Allerdings zeigte sich, dass EspI als Serinprotease wirkt. EspI weist auch hohe Sequenzhomologie zu Exoproteinen von *Shigella flexneri* (SepA, Mucinase und SigA), STEC (EspP) und vogelpathogenen *E. coli* (Tsh) auf, allerdings konnte keines der Substrate dieser Proteasen von EspI gespalten werden (62). Dagegen konnte eine proteolytische Aktivität gegenüber Schweine-Pepsin A und Apolipoprotein A1 nachgewiesen werden. Sie könnten an der Zerstörung von Wirtsgewebe beteiligt sein, entweder direkt durch den Abbau von Strukturproteinen oder indirekt durch eine Deregulierung von Wirtsproteasen, z.B. durch Spaltung von Protease –Inhibitoren. So kann die plasmidkodierte Serinprotease EspP in aktivierter Form den humanen Gerinnungsfaktor V abbaut. Gerinnungsfaktor V ist ein großes Plasmaglykoprotein, das für die schnelle Thrombinbildung und eine normale Hämostase notwendig ist (16).

Das von der LPA kodierte Rezeptor- und Transporterprotein BtuB ist hierbei am besten charakterisiert. BtuB gehört zur Familie der Vitamin B12-bindenden Membranproteine. Im Gegensatz zu *Salmonella typhimurium* ist *E. coli* nicht in der Lage, Vitamin B12 zu synthetisieren. Es muss exogen aufgenommen werden. Dies erfolgt über Bindeproteine, von denen BtuB am besten untersucht ist. Nach der Bindung des Vitamin B12 an BtuB erfolgt ein TonB-vermittelter, energieabhängiger Transport in das Zellinnere (17, 19, 58). Bei Bakterien mit

zwei Zellmembranen sind diese Transport-ATPasen in der inneren Membran lokalisiert, während sich in der äußeren Membran ein Hilfssystem befindet, das die zu transportierenden Metabolite aufnimmt und an die Transportproteine weiterreicht.

Von dem in dem Laborstamm K12 vorkommenden BtuB-Protein ist bekannt, dass es auch Colicine (A und E) bindet (58, 65). Diese gehören zu der Gruppe der Bakteriocine. Die Fähigkeit zur Produktion dieser antibakteriell wirksamen Substanzen ist bei *E. coli* weit verbreitet. Die letale Aktion erfolgt intrazellulär über eine Blockade der Proteinbiosynthese (58). Die Colicine stimmen in ihrer Primärstruktur weitgehend überein, unterscheiden sich aber bezüglich ihrer Rezeptorspezifität. BtuB wird im Krieg der Mikroben auch für andere Zwecke mißbraucht: Es ist die Eingangspforte für die DNA einiger Phagen (BF23) (6). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten bei zahlreichen Stämmen zwei für BtuB kodierende Gene nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass dies ein Selektionsvorteil für *E. coli* darstellt. Im Falle eines Defektes oder Verlustes könnte die zweite intakte Kopie des Gens die Funktion übernehmen. Da die BtuB-Proteine unter einem starken Selektionsdruck (Colicine, Bakteriophagen) stehen, können nur Stämme auf Dauer überleben, die das Rezeptorprotein mutieren.

Wir haben festgestellt, dass *E. coli* Stämme, die LPA beherbergen, immer *stx2d* besitzen. Kürzlich wurde gezeigt, dass innerhalb der beiden Haupttoxine zahlreiche Toxinvarianten existieren, die als Stx1c, Stx1d, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f bezeichnet werden (27, 28, 53, 61, 74). Hierbei zeigen neuere Untersuchungen, dass es eine Assoziation zwischen bestimmten Stx-Subtypen und der Schwere des Krankheitsbildes gibt. So lassen sich bei blutigen Diarrhöen, Enterokolitiden und dem HUS vor allem Stx2, Stx2c und Stx1 nachweisen. Der Nachweis von Stx2d und Stx2e ist meist mit einem weniger schweren Krankheitsbild wie wässrigen Durchfällen oder keiner Symptomatik assoziiert (27, 28, 63, 73, 74). Nach einer parazellulären Translokation binden Shiga Toxine an Granulozyten und werden von diesen aus dem Darm über die Blutbahn zu den glomerulären Endothelzellen transportiert (66, 67, 68). In

zukünftigen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Stx-Varianten gleichermaßen an Granulozyten und Endothelzellen binden wie die klassischen Stx1- und Stx2-Toxine. Obwohl die Shiga Toxine im Zentrum der Untersuchungen zur Pathogenese der hämorrhagischen Kolitis und des HUS stehen, ist nicht geklärt, inwieweit auch andere STEC-spezifische Determinanten am Krankheitsgeschehen beteiligt sind (38). Hierfür sprechen Beobachtungen, wonach auch Shiga Toxin-negative STEC aus Stuhlproben von Patienten mit hämorrhagischer Kolitis und HUS isoliert wurden (1). Ausgehend von der Sequenzierung des Genoms der EHEC O157 (32, 52) und der zu erwartenden Sequenzierung weiterer STEC-Stämme, stellt sich die Frage nach der Struktur und der Funktion der sezernierten Proteine und ihrer Liganden auf der Oberfläche von Endothelzellen (Membranproteine, Glykosphingolipide, u.a.).

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Shiga Toxine nach Schädigung des Darmepithels zu den Gefäßen translozieren, um dort an Leukozyten zu binden, mit denen sie zum Nierenepithel transportiert werden können (67, 68). Dies wird als eine mögliche Erklärung für die systemischen Komplikationen im Nierenendothel vermutet. Wir vermuten, dass die von unserer Arbeitsgruppe bei STEC-Stämmen erstmals beschriebenen Serinproteasen EspP (16) und EspI (62) als wichtige Virulenzfaktoren fungieren. Sie könnten an der Zerstörung von Wirtsgewebe beteiligt sein. Sie spielen einerseits in der Auseinandersetzung mit dem Wirt in der Konkurrenz um Vitamin B12 eine wichtige Rolle, andererseits stellen diese Proteine aber auch Rezeptoren dar für Colicine, d.h. bakterizid wirksame Substanzen. Ob durch Mutationen in den BtuB eine Colicinresistenz bewirkt wird und dabei die Funktionalität des Proteins für die Vitamin B12 – Bindung und Aufnahme verloren geht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Ein derartiges Szenario könnte jedoch das Vorkommen unterschiedlicher Allele erklären. Die putative Virulenz und räumliche Nähe der Gene *espI*, *btuB* und *iha* macht diese Region zum interessantesten Stück der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten neuen Pathogenitätsinsel. Eine PCR-Untersuchung zur Verbreitung dieser

Gene zeigte, dass diese Region bei LEE-negativen STEC weit verbreitet ist. Inwieweit diese Pathogenitätsinsel einen Einfluss auf die Virulenz von STEC hat, muss noch untersucht werden

Neu auftretende STEC Stämme haben sich offensichtlich durch sukzessiven Erwerb genetischer Elemente (inter- und intraspezifischer Genaustausch) entwickelt (11, 25, 27, 48, 61, 72). Die Untersuchung solcher evolutionärer Prozesse, die zur Entstehung der darmpathogenen *E. coli* und ihrer sprunghaft steigenden Virulenz geführt haben, kann dazu beitragen, neue diagnostische Methoden und Therapie zu entwickeln. Zahlreiche Aspekte zur Pathogenese der STEC-Infektion und ihrer Komplikationen, zur Entwicklung einer wirksamen Prophylaxe und kausalen Therapie – um einige Ziele zu nennen - bedürfen jedoch auch in Zukunft intensiver Forschungsanstrengungen.

5.Literaturnachweis

1. Allerberger, F., Dierich, M. P., Gruber-Moesenbacher, U., Liesegang, A., Prager, R., Hartmann, G., Rabsch, W., Tschape, H., Karch, H., 2000. Nontoxicogenic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- associated with a family outbreak of diarrhoea. Wien. Klin. Wochenschr. 112, 846-850.
2. Allerberger, F., Friedrich, A. W., Grif, K., Dierich, M. P., Dornbusch, H., Mache, C. J., Nachbaur, E., Freilinger, M., Rieck, P., Wagner, M., Caprioli, A., Karch, H., Zimmerhackl, L. B., 2003. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- infection and consumption of unpasteurized cow's milk. Int. J. Infect. Dis. 7, 42-45.
3. Ammon, A., Petersen, L. R., Karch, H., 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H- J. Infect. Dis. 179, 1274-1277.
4. Andreoli, S. P., Trachtman, H., Acheson, D. W. K., Siegler, R. L., Obrig, T. G., 2002. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. Pediatr. Nephrol. 17, 293-298.
5. Banatvala, N., Griffin, P. M., Greene, K. D., Barrett, T. J., Bibb, W. F., Green, J. H., Wells, J. G., 2001. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. J. Infect. Dis. 183, 1063-1070.
6. Bassford, P.J.Jr., Kadner R.J., Schnaitmann, C.A.,1977. Biosynthesis of the outer membrane receptor for vitamin B12, colicins, and bacteriophage BF23 by *Escherichia coli*: kinetics phenotypic expression after the introduction of bfe+ and bfe- alleles. J. Bacteriol. 129, 265-75
7. Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J., Wells, J. G., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. JAMA 272, 1349-1353.
8. Bell, B. P., Griffin, P. M., Lozano, P., Christie, D. L., Kobayashi, J. M., Tarr, P. I., 1997. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a

- large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. Pediatrics 100, E12.
9. Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Wells, J. G., Griffin, P. M., 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. JAMA 269, 2217-2220.
 10. Bielaszewska, M., Schmidt, H., Liesegang, A., Prager, R., Rabsch, W., Tschape, H., Cizek, A., Janda, J., Blahova, K., Karch, H., 2000. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains and a source of human diseases. J. Clin. Microbiol. 38, 3470-3473.
 11. Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschape, H., Schmidt, M. A., Karch, H., 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. Infect. Immun. 72, 1812-1816.
 12. 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.
 13. Bokete, T. N., Whittam, T. S., Wilson, R. A., Clausen, C. R., O'Callahan, C. M., Moseley, S. L., Fritsche, T. R., Tarr, P. I., 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. J. Infect. Dis. 175, 1382-1389.
 14. Brandt, J. R., Fouser, L. S., Watkins, S. L., Zelikovic, I., Tarr, P. I., Nazar-Stewart, V., Avner, E. D., 1994. *Escherichia coli* O 157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. J. Pediatr. 125, 519-526.
 15. Brandt, J. R., Joseph, M. W., Fouser, L. S., Tarr, P. I., Zelikovic, I., McDonald, R. A., Avner, E. D., McAfee, N. G., Watkins, S. L., 1998. Cholelithiasis following *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Pediatr. Nephrol. 12, 222-225.
 16. Brunder, W., Schmidt H., Karch H., 1997, EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human

- coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 24, 767-78.
17. Cadiex N., Phan P.G., Cafiso D.S., Kadner R.J., 2003. Differential substrate-induced signalling through the TonB-dependent transporter BtuB. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 100, 10688-93
 18. Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzoni, G., Karch, H., 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 578-579.
 19. Chimento D.P., Kadner R.J., Wiener M.C., 2003. The *Escherichia coli* outer membrane cobalamin transporter BtuB: structural analysis of calcium and substrate binding, an identification of orthologous transporters by sequence/structure conservation. *J. Mol. Biol.*, 332, 999-1014.
 20. Cimolai, N., Basalyga, S., Mah, D. G., Morrison, B. J., Carter, J. E., 1994. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin. Nephrol.* 42, 85-89.
 21. Crump, J. A., Sulka, A. C., Langer, A. J., Schaben, C., Crielly, A. S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D. M., Hunter, S. B., Hoekstra, R. M., Wong, S. K., Griffin, P. M., Van Gi, 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N. Engl. J. Med.* 347, 555-560.
 22. Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., Hacker, J., 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* 185, 1831-1840.
 23. Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K., Hutchinson, S. J., 2001. The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.* 33, 923-931.
 24. 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.
 25. Feng, P., Lampel, K. A., Karch, H., Whittam, T. S., 1998. Genotypic and

- phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. 177, 1750-1753.
26. Foster, J. W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat. Rev. Microbiol. 2, 898-907.
 27. Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., Karch, H., 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J. Infect. Dis. 185, 74-84.
 28. 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.
 29. 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. JAMA 290, 1360-1370.
 30. 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. J. Infect. Dis. 186, 493-500.
 31. Hacker, J., Kaper J.B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. 54, 641-79
 32. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hatto, 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA Res. 8, 11-22.
 33. Holme, R., 2003. Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. Water. Sci. Technol. 47, 1-6.
 34. Hoshina, K., Itagaki, A., Seki, R., Yamamoto, K., Masuda, S., Muku, T.,

- Okada, N., 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 247-8.
35. Hurley, B. P., Thorpe, C. M., Acheson, D. W., 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 69, 6148-6155.
36. Karch, H., Bohm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S., Heesemann, J., 1993. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- *J. Clin. Microbiol.* 31, 1200-1205.
37. 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.
38. Karch, H., 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin. Thromb. Hemost.* 27, 207-213.
39. Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., Lim, C., 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1, 619-620.
40. Klein, E. J., Stapp, J. R., Clausen, C. R., Boster, D. R., Wells, J. G., Qin, X., Swerdlow, D. L., Tarr, P. I., 2002. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: a prospective point-of-care study. *J. Pediatr.* 141, 172-177.
41. Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., Welch, R. A., 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol. Microbiol.* 45, 277-288.
42. 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. *J. Infect. Dis.* 156, 175-182.

43. Liesegang, A., Sachse, U., Prager, R., Claus, H., Steinruck, H., Aleksic, S., Rabsch, W., Voigt, W., Fruth, A., Karch, H., Bockemuhl, J., Tschape, H., 2000. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H- in Germany - a ten-year study. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 269-278.
44. Lopez, E. L., Contrini, M. M., Devoto, S., de Rosa, M. F., Grana, M. G., Aversa, L., Gomez, H. F., Genero, M. H., Cleary, T. G., 1995. Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J. Pediatr.* 127, 364-367.
45. Matussek, A., Lauber, J., Bergau, A., Hansen, W., Rohde, M., Dittmar, K. E., Gunzer, M., Mengel, M., Gatzlaff, P., Hartmann, M., Buer, J., Gunzer, F., 2003. Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells. *Blood* 102, 1323-1332
46. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.
47. 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.
48. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68, 64-71.
49. Park, 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.
50. Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., Paton, J. C., 2004. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 200, 35-46.
51. Pennings, C. M., Seitz, R. C., Karch, H., Lenard, H. G., 1994. Haemolytic anaemia in association with *Escherichia coli* O157 infection in two sisters. *Eur. J. Pediatr.* 153, 656-658.

52. Perna, N. T., Plunkett, G. 3., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529-533.
53. Piérard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S., 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3317-3322.
54. Proulx, F., Seidman, E. G., Karpman, D., 2001. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.* 50, 163-171.
55. Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., Whittam, T. S., 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64-67.
56. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685.
57. Robert Koch-Institut, 2002. Ein HUS-Ausbruch durch sorbitol-fermentierende EHEC des Serovars O157:H-: Untersuchungsergebnisse und Lehren für die Surveillance. *Epidemiologisches Bulletin* 22, 171-175.
58. Roth, J.R., Lawrence, J.G., Bobik, T.A., 1996. Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 137-81
59. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
60. Schmidt, H., Rüssmann, H., Schwarzkopf, A. Aleksic, S., Heesemann, J., and Karch, H., 1994b. Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zbl. Bact.* 281: 201
61. Schmidt, H., Geitz, C., Tarr, P. I., Frosch, M., Karch, H., 1999b. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* 179, 115-123.

62. Schmidt, H., Zhang, W. L., Hemmrich, U., Jelacic, S., Brunder, W., Tarr, P. I., Dobrindt, U., Hacker, J., Karch, H., 2001. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *se/C* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69, 6863-6873.
63. Sonntag, A., Prager, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Fruth, A., Tschape, H., Karch, H., 2004. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 42, 954-962.
64. Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C. J., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R., Besser, T. E., 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 68, 1400-1407.
65. Taylor, R., Burgner, J.W., Clifton, J., Cramer, W.A., 1998. Purification and characterization of monomeric *Escherichia coli* vitamin B12 receptor with high affinity for colicin E3. *J. Biol. Chem.* 273, 31113-8.
66. Tazzari, P. L., Ricci, F., Carnicelli, D., Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzoni, G., Conte, R., Brigotti, M., 2004. Flow cytometry detection of Shiga toxins in the blood from children with hemolytic uremic syndrome. *Cytometry* 61B, 40-44.
67. Te Loo, D. M., Monnens, L. A., van Der Velden, T. J., Vermeer, M. A., Preyers, F., Demacker, P. N., van Den Heuvel, L. P., van Hinsbergh, V. W., 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 95, 3396-3402.
68. Te Loo, D. M., van Hinsbergh, V. W., van den Heuvel, L. P., Monnens, L. A., 2001. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 800-806.
69. Tilden, J. J., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B., Hollingsworth, J., Morris, J. G. J., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health* 86, 1142-1145.
70. 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.
71. Yu, J., Kaper, J. B., 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol. Microbiol. 6, 411-417.
 72. Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Liesegang, A., Tschape, H., Schmidt, H., Bitzan, M., Karch, H., 2000a. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. J. Clin. Microbiol. 38, 2134-2140.
 73. Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Bockemühl, J., Schmidt, H., Scheutz, F., Karch, H., 2000b. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. J. Clin. Microbiol. 38, 2989-2993.
 74. Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczus, T., Karch, H., 2002a. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 40, 1441-1446.
 75. Zhang, W. L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., Schmidt, H., 2002b. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 40, 4486-4492.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2002 bis Dezember 2004 im Institut im Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster durchgeführt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Karch danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ich danke ganz besonders meiner Betreuerin Dr. W. Zhang für die viele Unterstützung und die unglaubliche Geduld, mit der sie mich jeden Tag unterstützt hat und auch Dr. A. Friedrich, der mich am Anfang eingearbeitet hat.

Ich danke ganz herzlich meiner Familie für die emotionale Unterstützung gerade in der letzten Zeit.