

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

**Vorkommen und Transkription des ToxB-Gens in
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

Vorgelegt von
Gregor Rassi Warai

aus Minden
2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Schmitz

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

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. dent. B. Ehmke

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2013

Aus dem Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

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

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

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. dent. B. Ehmke

Zusammenfassung
von Gregor Rassi Warai

**Vorkommen und Transkription des ToxB-Gens in
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157**

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 führen zu wässrigen, meist blutigen Durchfällen. Als Komplikation kann es zu einem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) kommen. Aufgrund einer fehlenden spezifischen Therapie sind durch EHEC verursachte Einzelerkrankungen und Ausbrüche sehr gefürchtet. EHEC besitzen eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren, welche genetisch unterschiedlich lokalisiert sind. Auf dem ca. 90 kb großen Plasmid pO157, welches nahezu in allen EHEC O157:H7 vorhanden ist, befindet sich ein ca. 9,5 kb großes Gen, welches für ToxB kodiert. ToxB ist für eine gesteigerte Erregeradhärenz verantwortlich.

In dieser Arbeit wurde *toxB* mittels PCR in allen EHEC O157:H7 (n=18), nicht aber in Sorbitol-fermentierenden (SF) O157:H⁻ (n=17) nachgewiesen. Anschließend wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse die charakteristische Schmelztemperatur von 74,3°C für *toxB* PCR-Produkte ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *toxB* temperatur- und pH-Wert-abhängig ist. Die höchste Expression erfolgte im basischen Milieu bei einem pH-Wert von 8,3 und einer Temperatur von 37°C. Im Vergleich hierzu war die mRNA-Expression des *toxB* bei 30°C im sauren Milieu erniedrigt. Ob die gesteigerte Transkription des *toxB* auch zu einer gesteigerten Adhärenz führt, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2013

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:
Vorkommen und Transkription des ToxB-Gens in
enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) O157

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

unter der Anleitung von:

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

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Aachen, 18.3.2013

Ort, Datum

Name: Gregor Rassi Warai
(in Druckbuchstaben)

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Einleitung zu EHEC	1
1.2 Klinik	3
1.3 Therapie.....	3
1.4 Pathophysiologie	4
1.5 <i>toxB</i> im Plasmid pO157	5
2 ZIELSETZUNG	6
3 MATERIAL UND METHODEN	7
3.1 Material.....	7
3.1.1 Herkunft der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	7
3.1.2 Geräte	7
3.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	8
3.2 Methoden.....	10
3.2.1 Nachweis des <i>toxB</i> mittels PCR	10
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	11
3.2.3 Verfahren zur RNA-Gewinnung	11
3.2.4 Optimierung der Primerkonzentration und der Templatmenge	16
3.2.5 One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der <i>toxB</i> -Transkription	18
3.2.6 One-Step Real-time RT-PCR Datenanalyse	20
4 ERGEBNISSE	22
4.1 PCR Nachweis von <i>toxB</i> in Stx-produzierenden <i>E. coli</i> O157:H7 und SF O157:H-	22

4.2	Kontrolle der RNA-Proben auf DNA-Kontamination mittels Real-Time PCR	23
4.3	Schmelzkurvenanalyse	24
4.4	Optimierung der Primerkonzentration und der Templatemenge	25
4.5	One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von <i>toxB</i> bei verschiedenen pH-Werten und konstanter Temperatur von 22°C bei EDL933	26
4.6	One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von <i>toxB</i> bei verschiedenen pH-Werten und konstanter Temperatur von 30°C bei EDL933	28
4.7	One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von <i>toxB</i> bei verschiedenen pH-Werten und konstanter Temperatur von 37°C bei EDL933	30
5	DISKUSSION	32
6	LITERATURVERZEICHNIS	36
7	ANHANG	42
7.1	Abkürzungsverzeichnis	42
7.2	Abbildungsverzeichnis	43
7.3	Tabellenverzeichnis	44
8	LEBENS LAUF	45
9	DANKSAGUNG	46

1 Einleitung

1.1 Einleitung zu EHEC

Theodor Escherich beschrieb 1885 das nach ihm benannte Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als erstes spezifisches Darmbakterium (27, 32). *E. coli* gehört zur Familie der Enterobakterien und ist ein fakultativ anaerobes, gramnegatives Stäbchenbakterium. Es besiedelt den Intestinaltrakt der meisten Warmblüter und ist somit ein Teil der physiologischen Darmflora (27, 32). *E. coli* lässt sich von den obligat pathogenen Arten abgrenzen. Diese gehören nicht zur physiologischen Darmflora und lassen sich in fünf Gruppen einteilen: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxinogene *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) (38).

Tabelle 1: *E. coli* Pathogenitätsgruppen, Epidemiologie, Klinik und Betroffene (38)

Pathogenitätsgruppe	Epidemiologie	Klinik	Betroffene
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	weltweit, verstärkt in Entwicklungsländern	wässrige Durchfälle, gewöhnlich mit Erbrechen und leichtem Fieber	v. a. Neugeborene und Säuglinge, selten Erwachsene
Enterotoxinogene <i>E. coli</i> (ETEC)	subtropische, warme Länder (Reisediarrhoe)	wässrige Durchfälle, selten mit Fieber und Erbrechen	Säuglinge, Kleinkindern, Erwachsene
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	weltweit	wässrige und schleimige Durchfälle, evtl. leichtes	alle Altersgruppen, Immunsupprimierte

		Fieber, Erbrechen und Blut im Stuhl	
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	warme Länder	ruhrähnliche, wässrig-schleimige Durchfälle, selten mit Blut im Stuhl und Fieber	alle Altersgruppen
Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	verstärkt in Industriestaaten	wässrig-blutige Durchfälle, evtl. hämorrhagische Colitis und HUS	v. a. Kinder unter 5 Jahren, Erwachsene

EHEC kommen typischerweise im Darm von Wiederkäuern vor, vor allem bei Rindern (9, 26), Schafen (33) und Ziegen (8), aber auch bei Wildwiederkäuern (31, 44). Wiederkäuer gelten als wichtigstes Reservoir und Hauptinfektionsquelle für EHEC beim Menschen (9, 26, 33, 63).

Die Übertragung durch kontaminierte Lebensmittel stellt vor allem in den Industrieländern ein Problem dar. So befinden sich die Erreger in nicht pasteurisierten Fruchtsäften (7) und Rohmilch (1), in fäkaliengedüngtem Gemüse (17, 29), in rohem und unzureichend gegartem Fleisch (59), sowie in fäkal verunreinigtem Wasser (28).

1.2 Klinik

Ein Hauptmerkmal der EHEC ist die Fähigkeit zur Produktion von Shiga Toxinen (Stx). Stx tragen maßgeblich zu der schweren extraintestinalen Komplikation, dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), bei (7, 5, 3). Im klinischen Verlauf einer EHEC-Infektion, für die auf Grund der Säureresistenz der EHEC weniger als 100 Keime ausreichen (22, 59), kommt es nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 3 bis 4 Tagen bei ca. einem Drittel der Erkrankten zu einem wässrigen Durchfall, der von abdominalen Krämpfen begleitet wird (49). Im weiteren Verlauf entwickelt sich in 90 % der Fälle ein blutiger Durchfall mit oder ohne Fieber und Erbrechen (6, 30). Bei 10-20% der Patienten bildet sich im weiteren Verlauf eine hämorrhagische Colitis aus (49). Ungefähr 15% der Patienten unter 10 Jahren leidet etwa eine Woche nach Beginn der Durchfallerkrankung an einem HUS (57). Das HUS ist eine schwere Komplikation, die mit einer Thrombozytopenie ($<150.000/\mu\text{l}$), intravasaler Hämolyse (Hb $<10\text{g/dl}$, LDH erhöht, Fragmentozyten) und akutem Nierenversagen (Serum-Kreatinin über dem altersentsprechenden Limit für Normalwerte) einhergeht (25). Das HUS ist der häufigste Grund für akutes Nierenversagen im Kindesalter (40).

1.3 Therapie

Die Behandlung der Krankheitssymptome kann nur symptomatisch erfolgen (2). Dazu gehören eine Elektrolyt- und Volumensubstitution in Form von Infusionen (56). Patienten mit Verdacht auf eine EHEC-Infektion sollten keine Antibiotika einnehmen, da das Risiko, ein HUS zu entwickeln, bei einer Infektion mit *E. coli* O157:H7 und gleichzeitiger Antibiotikaeinnahme für Kinder (64) und Erwachsene (19) steigt. Ebenso erhöht sich das Risiko bei der Einnahme von Motilitätshemmern (6, 16). Liegt ein HUS vor, werden in der Regel forcierte Diurese, und bei globaler Niereninsuffizienz, eine Hämo- oder Peritonealdialyse eingesetzt. Die Behandlung sollte in spezialisierten Zentren erfolgen (49).

1.4 Pathophysiologie

Nach der oralen Aufnahme des EHEC-Erregers und dem Passieren des sauren Mageninhaltes kommt es zu einer durch Intimin vermittelten Adhärenz der EHEC an das Darmepithel („attachment“) und zur Zerstörung der Mikrovilli der Mukosazellen („effacement“). Dieser Mechanismus wird als A/E-Läsion bezeichnet und geht mit einer anschließenden Aggregation von polarisiertem Aktin und weiteren Zytoskelettstrukturen einher (61). Intimin ist dabei, zusammen mit dem durch ein Typ-III-Sekretionssystem in die Wirtszelle aktiv eingeschleusten Rezeptor Tir (Translocated intimin receptor), an den Intimin bindet, für eine feste Erregeradhärenz verantwortlich (36). Intimin und das Typ-III-Sekretionssystem werden von der chromosomalen Pathogenitätsinsel LEE (Locus of Enterocyte Effacement) kodiert.

Mit dem Absterben der Darmmukosazellen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, die eine Invasion von Granulozyten zur Folge hat. Nach einer parazellulären Translokation von Stx bindet dieses an Granulozyten. Über die Blutbahn gelangt es so zum mikrovaskulären Nierenendothel. Dort bindet die pentamere B-Untereinheit des AB₅-Holotoxins hochspezifisch an das Glykosphingolipid Globotriaosylceramid (Gb3Cer). Es kommt zu einer Rezeptor-vermittelten Endozytose des Toxins und einer proteolytischen Spaltung der A-Untereinheit. Das so entstandene A1-Fragment gelangt zum Endoplasmatischen Retikulum und hemmt die Proteinbiosynthese durch Inaktivierung der Ribosomen, indem es einen Adeninrest der 28s ribosomalen RNA abspaltet. Mit der Inhibition der Elongation der Peptidkette stirbt die Zelle (41).

Der Gb3Cer-Rezeptor wird auch in anderen mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert. Neben dem Nierenendothel findet man ihn auch im Darm, im Gehirn auf Thrombozyten, renalen Tubuluszellen und Monozyten. Zirkulierende proinflammatorische Zytokine, speziell TNF- α und IL-1 β , welche durch die Stx-Wirkung auf Monozyten direkt durch diese produziert werden, potenzieren die Wirkung auf Endothelzellen, indem sie eine Expression des Gb3Cer-Rezeptors in diesen Zellen induzieren (41).

Die Interaktion der Stx mit Thrombozyten und dem mikrovaskulären Nierenendothel, sowie die mechanische Verletzung der Erythrozyten durch passieren der mikrothrombotisch vernarbten renalen Kapillaren (39, 66, 42), verursacht maßgeblich das HUS.

1.5 *toxB* im Plasmid pO157

Weitere Pathogenitätsfaktoren sind auf dem ca. 90 kb großen Plasmid pO157 kodiert. Dieses Plasmid ist nahezu in allen EHEC O157:H7 vorhanden (53). Es trägt die Gene zur Steuerung der Produktion von EHEC-Hämolysin (EHEC-*hly*) (51, 52) und anderen vermeintlichen Pathogenitätsfaktoren, wie Katalase-Peroxidase (*katP*) (11) und eine Serinprotease (*espP*) (12). Durch die Sequenzierung des gesamten Plasmids pO157 konnte ein weiteres mutmaßliches Virulenzgen nachgewiesen werden. Im EHEC O157 wird es L7095 (13) und im RIMD 0509952-Stamm *toxB* genannt (35). Dieses Produkt des 9,5 kb großen *toxB*-Gens zeigt 20% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem Toxin B von *Clostridium difficile* (4, 35). Es ist an der Adhärenz der EHEC O157 an Caco-2 Zellen beteiligt, indem es die Produktion und/oder die Sekretion der Typ-III-sekretierten Proteine EspA, EspB und Tir, und somit auch die Bildung von Mikrokolonien fördert (18, 20, 58). Außerdem weist ToxB erhebliche Homologien zu den Adhärenzfaktoren Efa1 von *E. coli* O111:H- und dem Produkt des *lifA*-Gens aus EPEC auf (37). Wird *toxB* aus dem Plasmid pO157 entfernt, so vermindert sich zwar die Fähigkeit zur Adhärenz der EHEC O157 an Epithelzellen (60), die aber nicht völlig aufgehoben wird (23).

2 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollten die Auswirkungen verschiedener Umweltbedingungen auf die Transkriptionsmenge des ToxB-Gens in EHEC O157:H7 des Stammes EDL933 untersucht werden. Dazu sollten die Erreger in Nährmedien mit unterschiedlichen pH-Werten und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert werden. Die Quantifizierung der RNA-Expression sollte mittels Real-Time RT-PCR durchgeführt werden, um auf die Transkriptionsmenge rückschließen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der verwendeten *E. coli*-Stämme

Die untersuchten Stämme sind aus der Stammsammlung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. H. Karch, Institut für Hygiene der WWU Münster. Alle EHEC-Stämme sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Ergebnisse für den Stx-Genotyp, den Nachweis der eae- und EHEC-hly-Gene sowie die Fähigkeit der Stämme zur Fermentation von Sorbitol wurden von Herrn Prof. Karch zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Geräte

pH-Meter	Schott, Labor-PH-Meter CG842
Schüttel-Inkubator	B. Braun, Melsungen, Certomat R/H
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg 5404 R
Waagen	Ohaus, Scout II
Vortexer	Bender und Hobein, Schweiz
Densimat	Biomérieux, Nürtingen
Flachbodengläser	Schott AG, Mainz
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
iCycler IQ5	BioRad, München
Thermocycler TGradient 96	Biometra, Göttingen
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Photoimager	BioRad, München
Elektrophoresekammer	Biozym, Hessisch Oldendorf

3.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

TSB Medium

(Tryptone Soya Broth):

17 g Tryptone

3 g Peptone

2,5 g Glucose

5 g NaCl

2,5 g K₂HPO₄

1000 ml steriles dest. H₂O

Der pH-Wert (5; 6; 7,3; 8,3) des TSB Mediums wurde mit steriler 1N HCl oder 1N NaOH eingestellt

Sorbit-MacConkey-Agar (SMAC-Agar):

1000 ml Aqua dest.

20 g Pepton

10 g Sorbit

1,5 g Gallensalze

5 g Natriumchlorid

15 g Agar

0,03 g Neutralrot

0,001 g Kristallviolett

pH-Wert= 7,1 +/- 0,2

2x SensiMix One-Step Kit PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

2x SYBR Green Lösung

50x SensiMix One-Step

50 mM MgCl₂

RNase Inhibitor

DEPC-H₂O

dNTP-Mix

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

(Desoxyribonukleotide)**peqGOLD Taq-DNA-** PEQLAB Biotechnologie, Erlangen**Polymerase**

10x Reaktionspuffer Y
5x Enhancer Solution P
dNTP-Mix (10mM)
Taq-DNA-Polymerase

RNA-freies Wasser Roche**Evagreen** PEQLAB Biotechnologie, Erlangen**DNase I** Roche**RNeasy-Mini-Kit:** Qiagen, Hilden

RLT-Puffer
Lysozym
RNeasy-Mini-Säule
RW1-Puffer
RPE-Puffer
Collection Tube (1,5 ml; 2 ml)

Ethanol (96-100 vol.%) Roche**TE-Puffer (pH 8,0)**

10 mM Tris HCl
1 mM EDTA

96-well 0.2 ml Thin-Wall PCR Plates BioRad**Microseal B Film** BioRad

3.2 Methoden

3.2.1 Nachweis des *tox*B mittels PCR

Die PCR wurde mittels InstaGene™-Matrix aufgereinigter DNA durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden zu 2,5 µl der Template-DNA-Lösung pipettiert, wobei der Gesamtansatz ein Volumen von 25 µl hatte.

PCR - Ansatz Mastermix:

Steriles destilliertes Wasser	12,7 µl
10x Reaktionspuffer (peqLab)	2,5 µl
5x Enhancer Solution P (peqLab)	5,0 µl
Magnesiumchlorid	0,75 µl
<i>tox</i> B.911F (aus 30 pmol/µl)	0,5 µl
<i>tox</i> B.1468R (aus 30 pmol/µl)	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM) (peqLab)	0,5 µl
Taq- DNA-Polymerase (peqLab)	0,1 µl

Die Reaktionsmischung wurde für die Amplifikation in ein PCR- Reaktionsgefäß pipettiert und in den Thermocycler überführt.

Tabelle 2: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen

Primer	Target	Sequenz (5' - 3')	PCR-Bedingungen*			Referenz
			Denaturierung	Annealing	Elongation	
<i>tox</i> B.911F	<i>tox</i> B	ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 60 s	(55)
<i>tox</i> B.1468R		TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C				

*Initial 5 min bei 94°C, dann 30 Zyklen, finale Elongation für 5 min bei 72°C.

Die Amplifikate des gewünschten Genabschnittes wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierzu wurden 10 µl des PCR-Ansatzes verwendet. Das zu erwartende PCR-Produkt hatte eine Größe von 602 bp.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gele wurden, in Abhängigkeit von der zu erwartenden Basenpaarlänge der DNA-Fragmente, in Konzentrationen von 1,5 % folgendermaßen präpariert: Die entsprechende Menge an Agarose für ein 1,5%-iges Gel wurde unter Erhitzen des TBE-Puffers gelöst und anschließend bis zur Verwendung bei 55°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Gele wurden im Gießblock gegossen und nach Erstarren in der Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer überschichtet. Volumina von 10 µl der Probenansätze wurden mit 2 µl 5-fach Probenpuffer gemischt und in die Gelkammern überführt. Für die Größenordnung der Amplifikate wurde eine Referenzmischung von DNA mit Fragmenten bekannter Größen mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V und die Dokumentation mit einem Photoimager im Trans-UV Modus durchgeführt.

3.2.3 Verfahren zur RNA-Gewinnung

3.2.3.1 Vermehrung der EHEC vom Wildtyp EDL933 (O157:H7) bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen

Zunächst wurde eine EDL933 Kolonie von einer SMAC Agarplatte in 2 ml TSB-Medium mit pH 7,3 suspendiert. Aus diesem beimpften Flüssigmedium wurden je 5 µl EDL933 Kultur in jeweils 2 ml TSB-Medium mit den pH-Werten 5, 6, 7,3 und 8,3 überführt. Diese vier Suspensionen mit unterschiedlichen pH-Werten wurden bei 22°C (Raumtemperatur), 30°C und 37°C unter Schütteln (180 rpm) über Nacht inkubiert. Aus den 12 Proben zu je 2ml Nährmedium kamen je 500µl in 10ml TSB-Medium mit den jeweils entsprechenden pH-Werten 5, 6, 7,3 und

8,3 bei je 22°C (Raumtemperatur), 30°C, 37°C für 2-3,5 Stunden in den Schüttelinkubator (180 rpm), bis der OD-600nm Wert ca.0,8 ergab.

Tabelle 3: Inkubierte EHEC-O157:H7-Proben

Probenbezeichnung	pH-Wert	Temperatur (°C)
A1	5	37
A2	6	37
A3	7,3	37
A4	8,3	37
B1	5	30
B2	6	30
B3	7,3	30
B4	8,3	30
C1	5	22
C2	6	22
C3	7,3	22
C4	8,3	22

3.2.3.2 Ernten der Bakterien

Das Ernten der Bakterien geschah durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 5000xg und 4°C und anschließender Dekantierung und Entfernung des Überstandes. Die entstandenen Bakterienpellets wurden bei -70°C gelagert.

3.2.3.3 Isolierung der RNA

1. Nach Auftauen des Bakterienpellets, aus denen die RNA isoliert werden sollte, erfolgte die Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von der Firma Qiagen aus Hilden in zwei Durchgängen zu je 6 Proben. Im ersten Durchgang erfolgte die Isolierung der RNA aus den Proben A1, A2, A3, A4, B1 und B2, und im zweiten Durchgang die der Proben B3, B4, C1, C2, C3 und C4 (siehe Tabelle 2).

2. Durch Anschneiden mit dem Finger wurden die Pellets gelöst und mit 100 μl TE-Puffer, welcher 400 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym enthält, resuspendiert.

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. In dieser Zeit baute das Lysozym die Bakterienzellwand ab.

3. Es wurden 350 μl Lysepuffer (RLT-Puffer) ($10 \mu\text{l ml}^{-1}$ β -Mercaptoethanol) zur Probe zugegeben und mit Hilfe des Vortex stark gemischt.

Diese Lösung wurde für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet.

4. Es wurden 250 μl Ethanol (96-100%) zur Lösung hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren vermischt.

5. Eine RNeasy-Mini-Säule wurde in ein 2ml Collection Tube aus dem RNeasy-Mini-Kit platziert und 700 μl der Probe aufgetragen.

Bei maximaler Drehzahl wurde für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Der Rest der Probe wurde hinzugeben und erneut zentrifugiert.

Die Collection Tube wurde für den nächsten Schritt wieder verwendet.

6. 700 μl des RW1-Puffers wurden auf die RNeasy-Mini-Säule gegeben und bei höchster Drehzahl für 15 Sekunden zentrifugiert.

Die Collection Tube mitsamt dem Durchfluss wurde verworfen.

7. Die RNeasy-Mini-Säule wurde auf einem neuem 2 ml Collection Tube aus dem RNeasy-Kit platziert und 500 μl RPE-Puffer hinzugegeben.

Nun wurde erneut bei maximaler Drehzahl für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

8. Die RNeasy-Mini-Säule wurde auf die zuletzt verwendeten 2 ml Collection Tube gesetzt und wiederum 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben.
Ein erneutes Zentrifugieren bei maximaler Drehzahl für 2 Minuten und Verwerfen des Durchflusses folgte.
9. Der Trocknungsvorgang wurde durch erneutes Zentrifugieren bei maximaler Drehzahl für 1 Minute wiederholt, um ein Verschleppen des RPE-Puffers zu vermeiden.
10. Die RNeasy-Mini-Säule wurde in eine neue 1,5 ml Collection Tube aus dem Kit überführt, 40 µl RNA-freies Wasser pro Probe hinzugegeben und für eine Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert.
11. Der 10. Arbeitsschritt wurde wiederholt.
12. Die optische Dichte der erlangten Probe wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm, mit 2 µl des RNA-Eluates und 98 µl RNA-freiem Wasser gemessen.
Das neue RNA-Eluat entspricht nun einer Verdünnung von 1:50.

Berechnung der RNA-Konzentration:

$OD_{260nm} \times 40 \times 50 \text{ Verdünnungsreihe (1:50)} = X \text{ ng/}\mu\text{l}$

Um die gewünschte RNA-Konzentration jeder Probe zu erlangen, wurde das Volumen an RNA-freiem Wasser ermittelt, welches hinzugefügt werden sollte.

Gewünschte RNA-Konzentration:

88 µl RNA-Lösung von 200 ng/µl

Das entstandene Template mit einer Konzentration von 200 ng/µl wurde bei -20°C eingefroren.

3.2.3.4 DNase-Behandlung

Zunächst wurde das RNA-Eluat mit DNase behandelt, um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu beseitigen. Nur so konnte die Real-Time RT-PCR verwertbare Daten liefern.

DNase-Ansatz für eine Probe:

- RNA-Probe: 88 µl RNA-Lösung mit einer Konzentration von 200 ng/µl
- 10 µl Inkubationspuffer
- 1 µl DNase I, RNase-free (Roche)

Um die DNase zu aktivieren, wurde sie bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten.

3.2.3.5 Kontrolle der RNA-Proben auf DNA-Kontamination mittels Real-Time PCR

Es sollte nach der DNase-Behandlung keine DNA mittels PCR mehr nachweisbar sein. Die Kontrolle erfolgte mittels Real-Time PCR für das Haushaltsgen *gapA* unter Verwendung der Primer GapA_for. und GapA_rev.. Die Real-Time PCR wurde in dem folgenden Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl inklusive Template durchgeführt:

Tabelle 4: Real-Time PCR-Ansatz

	Volumen (µl)
Steriles dest. H ₂ O	9,1
Primer1 GapA_for. (aus 5 pmol/µl) (200 nM)	0,8
Primer2 GapA_rev. (aus 5 pmol/µl) (200 nM)	0,8
dNTP-Mix (10 mM) (peqLab)	0,4
10xReaktionspuffer Y (peqLab, 20 mM)	2

MgCl ₂)	
5xEnhancer Solution P (peqLab)	4
MgCl ₂ (25 mM)	0,8
Taq-DNA-Polymerase 5 units/μl (peqLab)	0,1
Evagreen	1
Gesamtvolumen	19

Mit den 19 μl Ansatz, welcher unter anderem das Haushaltsgen *gapA* beinhaltetete, wurden 12 Proben mit 1 μl RNA von EDL933 (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4), 2 Positivkontrollen mit 1 μl der DNA von EDL933 und 2 Negativkontrollen mit 1 μl H₂O untersucht.

3.2.4 Optimierung der Primerkonzentration und der Templatmenge

Um die ideale Primerkonzentration für den PCR-Ansatz zu ermitteln, wurden die Primer in Konzentrationen von 200 nM und 400 nM getestet.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Primer	Nukleotidsequenz (5'→3')	Zielgen	PCR-Produkt- länge (bp)	Referenzen
toxB1363-F toxB1468-R	GGG GAT AGA TTT CAA CTG AGA G TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C	<i>toxB</i>	165	In dieser Arbeit
GapA_for. GapA_rev.	GTT GTC GCT GAA GCA ACT GG AGC GTT GGA AAC GAT GTC CT	<i>gapA</i>	171	(10)

Der Real-Time RT-PCR-Ansatz zur Ermittlung der Primerkonzentration und der Templatemenge wurde, wie in der folgenden Tabelle ersichtlich ist, zusammengestellt:

Tabelle 6: Real-Time RT-PCR-Ansatz zur Ermittlung der Primerkonzentration (200 nM) und der Templatemenge

	Ansatzvolumina pro Template (μl)
Steriles dest. H ₂ O	5,6 (6,6 μl bei 1 μl RNA)
2xSYBR Green Lösung	10
Primer: 1. toxB1363-F (aus 5 pmol/ μl) 1. toxB1468-R (aus 5 pmol/ μl) 2. GapA_for (aus 5 pmol/ μl) 2. GapA_rev (aus 5 pmol/ μl)	0,8 (200 nM)
50xSensiMix One-Step	0,4
RNase Inhibitor	0,4
gesamt	18 (19 μl bei 1 μl RNA)

Tabelle 7: Real-Time RT-PCR-Ansatz zur Ermittlung der Primerkonzentration (400 nM) und der Templatemenge

	Ansatzvolumina pro Template (μl)
Steriles dest. H ₂ O	5 (6 μl bei 1 μl RNA)
2xSYBR Green Lösung	10
Primer: 1. toxB1363-F (aus 5 pmol/ μl) 1. toxB1468-R (aus 5 pmol/ μl)	1,6 (400 nM)

2. GapA_for. (aus 5 pmol/μl)	
2. GapA_rev. (aus 5 pmol/μl)	
50xSensiMix One-Step	0,4
RNase Inhibitor	0,4
gesamt	18 (19 μl bei 1 μl RNA)

Von der RNA wurde einmal 1 μl zu dem 19 μl-Ansatz und einmal 2 μl zu dem 18 μl-Ansatz verwendet, um die optimale Templatemenge zu ermitteln. Dies war wichtig, damit die verwendete Primermenge im richtigen Verhältnis zur Templatemenge stand. Zur Durchführung wurden die Ansätze einmal mit den Primern für das Gen *toxB* versehen und ein Ansatz wurde mit den Primern für das Haushaltsgen *gapA* versehen. Diese beiden Ansätze wurden einmal mit je 2 μl Template (A1 - A4; 37°C) und einmal mit je 1 μl Template (A1 - A4; 37°C) versehen. Zusätzlich gab es noch jeweils eine Kontrolle ohne Template.

3.2.5 One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der *toxB*-Transkription

Grundprinzip der Real-Time RT-PCR ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR dient dazu, bestimmte DNA-Sequenzen selektiv zu vervielfältigen.

Der gesamte Ablauf gliedert sich in 5 Schritte:

1. Reverse Transkription
2. Denaturierung
3. Denaturierung, Hybridisierung, Elongation
4. Schmelzkurvenanalyse
5. Abkühlung

1. Da die PCR nur mit DNA und nicht mit RNA funktioniert, muss die mRNA (messenger-RNA), welche für die Expression der gesuchten Gene steht, zuerst in cDNA (complementary-DNA) umgeschrieben werden. Dieser erste Schritt

erfolgte durch die Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase bei 49°C für 30 Minuten. Die so gewonnene cDNA repräsentiert nun quantitativ die in der Probe enthaltene mRNA, sodass im weiteren Verlauf quantitative Rückschlüsse auf die Genexpression erfolgen können.

2. Danach erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelhelix in zwei Einzelstränge, indem der Ansatz für 10 Minuten auf 95°C erhitzt wird. Diese Einzelstränge dienen bei den nächsten Schritten als Matrize für die Polymerisationsreaktionen.

3. Anschließend beginnt der zyklische Ablauf der Polymerasekettenreaktion, der sich 35mal wiederholt. Durch die mehrfachen Wiederholungen dieses Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der durch vorwärts und rückwärts arbeitenden Primern festgelegten Nukleotidsequenz.

Der erste Schritt startet mit der Denaturierung für 10 Sekunden bei 95°C. Hierbei werden die im Zyklus immer wieder neu gebildeten DNA-Doppelstränge voneinander getrennt. Danach wird im zweiten Schritt, durch eine Temperatursenkung auf 57°C für 30 Sekunden, das Anlagern der Primer an die einzelsträngige DNA-Sequenz (Hybridisierung, Primer-Annealing) eingeleitet.

Wichtig ist die sorgfältige Auswahl der Annealing-Temperatur der jeweiligen hochspezifischen Primer. Diese Temperatur wird durch die Länge und Sequenz der Primer bestimmt. Wird sie zu niedrig gewählt, können sich die Primer unter Umständen auch an nicht zu hundert Prozent komplementären Sequenzen binden und so zu unspezifischen Produkten („Geisterbanden“) führen. Wird sie zu hoch gewählt, kommt es durch die thermische Bewegung der Primer zu einer ineffizienten Produktbildung. Daher sollte die Temperatur etwa 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenz liegen.

Nun synthetisiert die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* im dritten Schritt komplementäre DNA-Stränge (Elongation).

Diese Primerverlängerung findet für 30 Sekunden bei 72°C statt.

4. Im folgenden Zyklus beginnt die Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird in 81 Schritten, im Abstand von jeweils 10 Sekunden, die Fluoreszenzintensität

gemessen. Die Temperatur steigt innerhalb des gesamten Zyklus' von 55°C auf 95°C. Bei jedem Schritt erhöht sie sich um 0,5°C.

5. Im letzten Abschnitt werden die Proben auf 25°C abgekühlt.

Die Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der *toxB*-Transkription wurde mit dem folgenden Ansatz durchgeführt:

Tabelle 8: Real-Time RT-PCR-Ansatz zur quantitativen Ermittlung der *toxB*-Transkription

	Volumen (µl) 1x für <i>gapA</i>	Volumen (µl) 1x für <i>toxB</i>
Steriles dest. H ₂ O	5,6	4,8
2xSYBR Green Lösung	10	10
Primer1 (aus 5 pmol/µl)	0,8	1,2
Primer2 (aus 5 pmol/µl)	0,8	1,2
50xSensiMix One-Step	0,4	0,4
RNase-Inhibitor	0,4	0,4
Gesamtvolumen	18 µl	18 µl

Von der RNA kam jeweils 2 µl Template zum Ansatz hinzu. Alle 12 Proben wurden einer Doppelbestimmung unterzogen, damit anhand der Standardabweichung, mögliche Fehler aufgedeckt werden, wie sie zum Beispiel beim Pipettieren auftreten können.

3.2.6 One-Step Real-time RT-PCR Datenanalyse

Das Ziel der Real Time RT-PCR besteht nicht ausschließlich darin, die mit Hilfe der reversen Transkriptase gewonnenen cDNA-Fragmente aus der mRNA-Vorlage zu vervielfältigen, sondern zusätzlich ihre Quantifizierung zu ermöglichen. Dieses geschieht mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR-Green. Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein, wodurch die

Fluoreszenz dieser Farbstoffe um ein Vielfaches ansteigt. Die Zunahme der DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Während der Real-Time PCR wurden in Echtzeit Messwerte aufgenommen, aus denen mit Hilfe der Bio-Rad iQ5 Software Version 2.0 (Biorad, München, Deutschland) ein Diagramm erstellt wurde. In diesem Diagramm wurde die Fluoreszenz, abgeglichen gegen die Hintergrundfluoreszenz, über die zeitlich aufeinander folgenden PCR-Zyklen aufgetragen und der sogenannte „threshold-cycle“ (Ct-Wert) ermittelt. Dieser Schwellenwert (Ct-Wert) gibt an, in welchem Zyklus die Fluoreszenz einer gemessenen Probe erstmalig deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

Geht man davon aus, dass die PCR mit 100 % Effizienz arbeitet, würde sich in jedem PCR-Zyklus die cDNA verdoppeln. Durch die Verwendung des Ct-Wertes wird die Transkriptmenge nun jeweils zu Beginn der exponentiellen und damit quantifizierbaren Phase der Amplifikation gemessen.

Zur Auswertung der Daten wurde die relative Quantifizierung mit Hilfe der **$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert-Methode** (34) angewendet.

Bei dieser Methode wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe die Ausgangsmenge ermittelt. Für diese Normalisierung wurde der Ct-Wert des Haushaltsgens *gapA* vom Ct-Wert des Zielgens *toxB* subtrahiert. Die daraus resultierenden ΔCt -Werte sind nun normalisiert und stellen das Expressionsverhältnis zwischen dem konstanten Haushaltsgen *gapA* und dem reguliertem Zielgen *toxB* dar.

Im zweiten Schritt wurde der ΔCt -Wert der Proben mit den pH-Werten 5, 6 und 8,3 von dem ΔCt -Wert der Proben mit dem pH-Wert 7,3 abgezogen. Hierdurch erhielten die Proben mit dem pH-Wert 7,3 den Faktor 1 und dienten somit als Kontrollproben.

Bei dieser „*delta-delta CT-Wert-Methode*“ erlangt man den relativen Expressionsunterschied zwischen der Probe mit dem pH-Wert von 7,3 (Kontrollprobe) und den Proben mit den pH-Werten von 5, 6 und 8,3.

4 Ergebnisse

4.1 PCR Nachweis von *toxB* in Stx-produzierenden *E. coli* O157:H7 und SF O157:H-

Mittels PCR ließ sich in allen nicht Sorbitol fermentierenden Stx-produzierenden *E. coli* O157:H7 das ToxB-Gen nachweisen. Alle SF O157:H- waren *toxB* negativ.

Tabelle 9: PCR-Nachweis von *toxB* in Stx-produzierenden *E. coli* O157:H7 und SF O157:H-

Stamm	Serotyp	Klinik	Genotyp				Phänotyp Sorbitol Fermen- tation
			<i>stx</i>	<i>eae</i>	EHEC- <i>hly</i>	<i>toxB</i>	
EDL933	O157:H7	HUS	1+2	+	+	+	-
3232/96	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
4391/96	O157:H7	HUS	1+2	+	+	+	-
6334/96	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
7898/96	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
3010/96	O157:H7	Diarrhoe	2	+	+	+	-
4011/96	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
4597/96	O157:H7	Diarrhoe	2	+	+	+	-
5900/96	O157:H7	Diarrhoe	2	+	+	+	-
6831/96	O157:H7	Diarrhoe	2	+	+	+	-
2575/97	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
4589/97	O157:H7	Diarrhoe	2	+	+	+	-
2857/98	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
3205/98	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
1867/99	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
2483/00	O157:H7	HUS	2	+	+	+	-
0865/99	O157:H7	Diarrhoe	2	+	+	+	-
4544/99	O157:H7	Diarrhoe	1+2	+	+	+	-
296/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
1533/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
1995/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
15998/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
2471/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
3072/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
3816/96	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
16110/96	O157:H-	Diarrhoe	2	+	+	-	+
340/97	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
3573/98	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
4368/98	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+

2696/99	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
4100/99	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
5376/99	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
DN301/00	O157:H-	HUS	2	+	+	-	+
2518/00	O157:H-	Diarrhoe	2	+	+	-	+
3317/00	O157:H-	Diarrhoe	2	+	+	-	+

4.2 Kontrolle der RNA-Proben auf DNA-Kontamination mittels Real-Time PCR

Abbildung 1 stellt die Amplifikationskurve für die Kontrolle der RNA-Proben auf DNA-Kontamination mittels Real-Time PCR dar. Die Amplifikationskurve zeigt die Anzahl der durchlaufenen Zyklen in Bezug zur Fluoreszenzintensität (abgeglichen gegen die Hintergrundfluoreszenz), welche für die Anzahl der Amplifikationsprodukte steht. Die schwarzen Kurven, welche die RNA-Proben darstellen, lassen keine Amplifikationen erkennen. Die Proben sind somit frei von DNA-Kontaminationen. Die roten Kurven zeigen eine Amplifikation ab dem 16. Zyklus. Sie stellen die Positivkontrollen mit der DNA aus EDL933 dar.

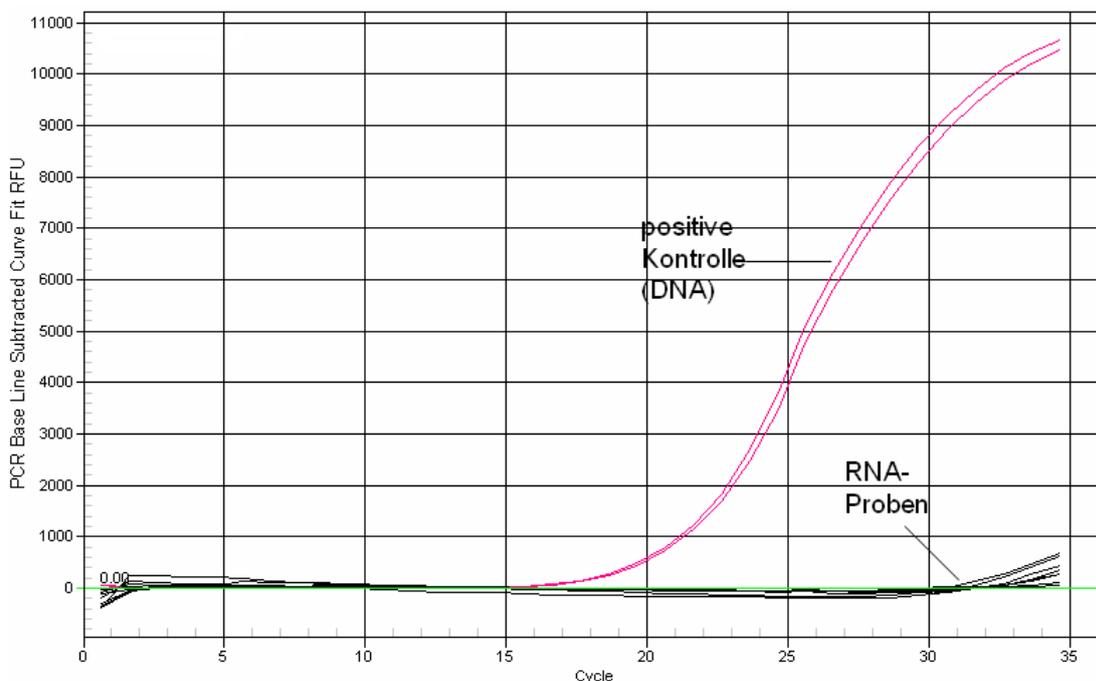


Abbildung 1: Amplifikationskurven, Kontrolle auf DNA-Kontamination mittels Real-Time PCR

4.3 Schmelzkurvenanalyse

Abbildung 2 zeigt die spezifischen Schmelzkurven für die DNA-Doppelstränge des *ToxB*- und des *GapA*-Gens. Durch die Schmelzkurvenanalyse wird die charakteristische Schmelztemperatur der PCR-Produkte bestimmt. Die Schmelzkurve erstellt sich wie folgt. Im unmittelbaren Anschluss an die Real-Time PCR wird die Temperatur kontinuierlich erhöht und dabei die Fluoreszenzintensität bestimmt. Mit der Temperaturzunahme trennen sich die DNA-Doppelstränge. Durch die Tatsache, dass jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur aufweist, welche von der Länge und der Sequenz der Nukleinsäurekette abhängig ist, ließen sich alle PCR-Produkte, auch vermeintliche Primerdimere, nachweisen. Primerdimere sind die Produkte von unspezifischen Annealingreaktionen. Diese können entstehen, wenn die Nukleotidsequenz der zu amplifizierenden cDNA zufällig bis auf wenige Nukleotide in einem fremden Abschnitt außerhalb der zu amplifizierenden cDNA mit den vorgesehenen Primern komplementär ist. Die Schmelztemperatur für *toxB* liegt bei 74,3°C und die für *gapA* bei 81°C. Die Tatsache, dass sich keine weiteren Schmelzkurven zeigten und die Kontrolle ohne Template (NTC - No Template Control) keine Schmelzkurven ergab, bestätigt das hervorragende Design der hochspezifischen Primer.

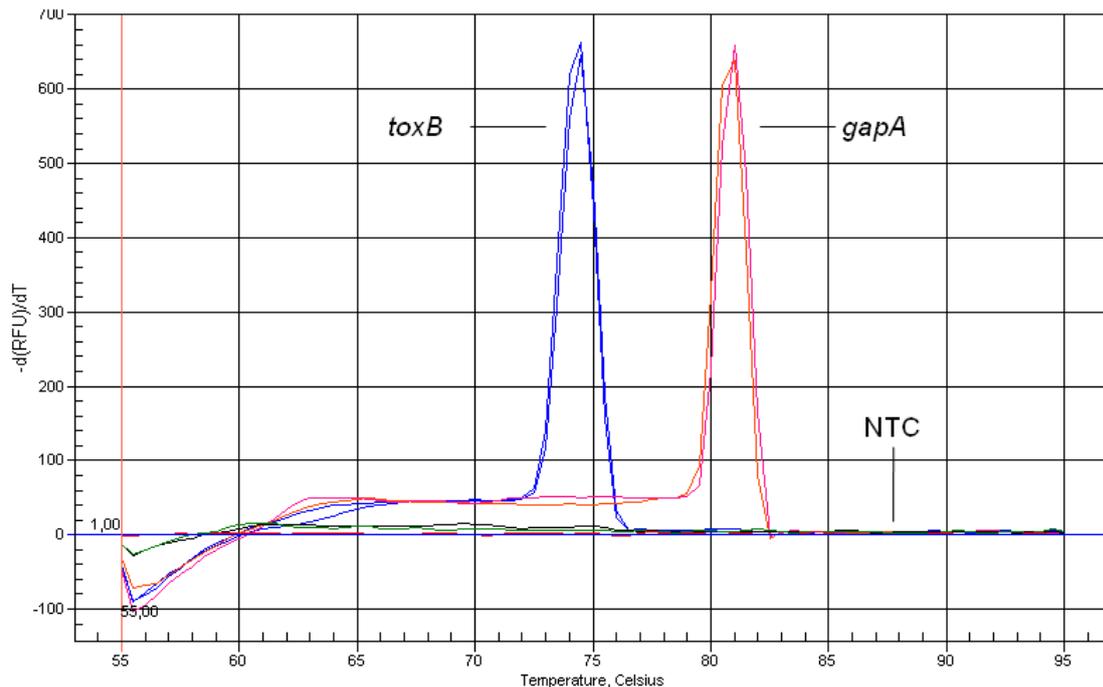


Abbildung 2: Schmelzkurven für *toxB* und *gapA*

4.4 Optimierung der Primerkonzentration und der Templatemenge

Für jede Template/Primer-Kombination erfolgte zuerst eine Optimierung der PCR-Bedingungen hinsichtlich maximaler Effizienz bei minimaler Bildung von unspezifischen PCR-Produkten (z. B. Primerdimere). Hierzu wurden geeignete Primerkonzentrationen (im Bereich von 200 bis 400 nM) ausgetestet. Die Amplifikation unterschiedlicher Templatemengen wurde mit 1 μ l und 2 μ l RNA getestet.

Die erzielten Daten zeigten, dass ein Templatevolumen von 2 μ l für die Aktivität der verwendeten Primer (200 nM) bessere Ergebnisse im Hinblick auf die Amplifikation brachten. Bei der folgenden Real-Time RT-PCR wurden also ein Templatevolumen von 2 μ l und eine Primerkonzentration von 200 nM verwendet. Die Abbildung 3 zeigt die Amplifikationskurven der One Step Real-Time RT-PCR zur Optimierung der PCR-Bedingungen.

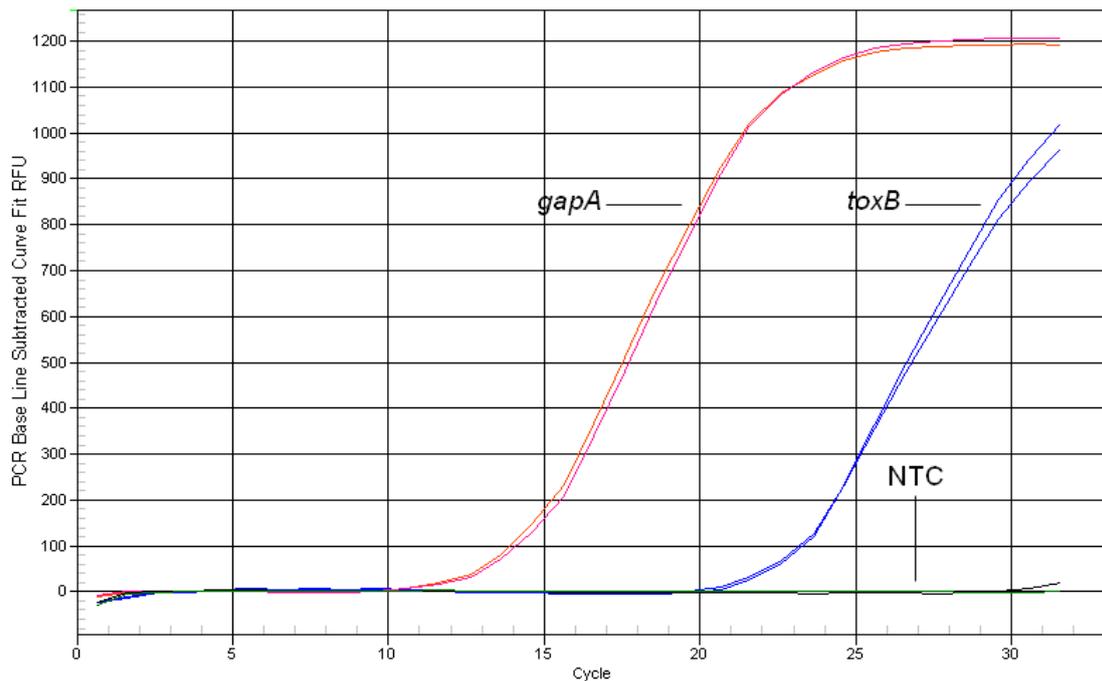


Abbildung 3: Amplifikationskurven der One Step Real-Time RT-PCR zur Optimierung der PCR-Bedingungen

Die Amplifikationskurve zeigt die Fluoreszenzintensität (abgeglichen gegen die Hintergrundfluoreszenz), die für die Anzahl der Amplifikationsprodukte steht, in Bezug zur Anzahl der durchlaufenen Zyklen. Die Kontrolle ohne Template und mit den Primern für *gapA* und *toxB* zeigt keinerlei Amplifikation.

4.5 One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von *toxB* bei verschiedenen pH-Werten und konstanter Temperatur von 22°C bei EDL933

Die One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von *toxB* wurde von Proben des Stammes EDL933 durchgeführt, welche bei den pH-Werten 5, 6, 7,3 und 8,3, jeweils bei den Temperaturen 22°C, 30°C und 37°C inkubiert wurden. Hierbei wurde die quantitative mRNA-Expression von *toxB* der pH-Werte 5, 6 und 8,3 in Bezug auf den

physiologischen pH-Wert von 7,3, jeweils bei konstanter Temperatur von 22°C, 30°C und 37°C ermittelt.

Da für alle 12 Proben, welche die verschiedenen Umweltbedingungen repräsentieren, drei Untersuchungen mittels One Step Real-Time RT-PCR durchgeführt wurden, konnten für die Ergebnisse auch Standardabweichungen berechnet werden.

Tabelle 10: Transkriptionsverhältnis von *toxB* bei unterschiedlichen pH-Werten bezogen auf den pH-Wert 7,3 und konstanter Temperatur von 22°C

Bedingung	Gen	RNA-Expressionsverhältniss pH 5, 6 und 8,3 zu pH 7,3	Standardabweichung der Expression
EDL933 pH 5	<i>toxB</i>	1,06	0,09
EDL933 pH 6	<i>toxB</i>	1,09	0,16
EDL933 pH 7,3	<i>toxB</i>	1,00	0,14
EDL933 pH 8,3	<i>toxB</i>	1,07	0,03

Die Abbildung 4 zeigt die relative mRNA-Expression von *toxB* bei 22°C und einem pH-Wert von 5, 6 und 8,3 im Vergleich zur Kontrollprobe (pH-Wert 7,3), die als Bezugswert den Faktor 1 erhielt. Bei 22°C wurde in Bezug auf die mRNA-Expression bei den 4 pH-Werten kein signifikanter Unterschied ermittelt.

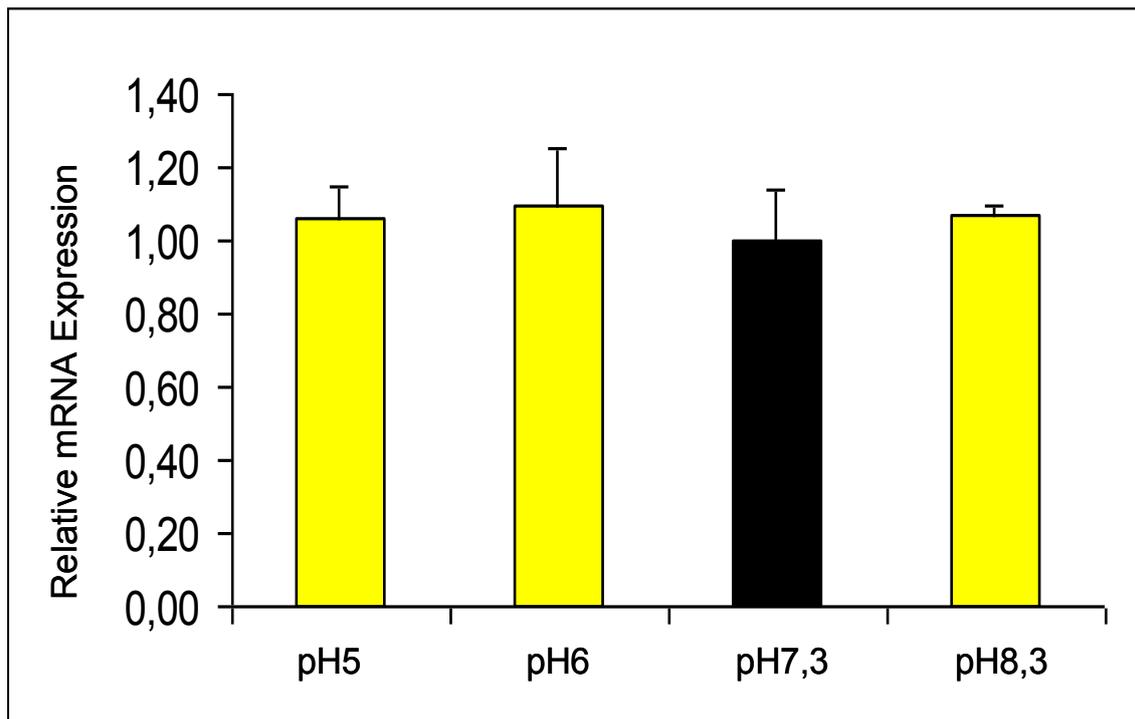


Abbildung 4: Relative mRNA-Expression von *toxB* bei unterschiedlichen pH-Werten und konstanter Temperatur von 22°C

4.6 One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von *toxB* bei verschiedenen pH-Werten und konstanter Temperatur von 30°C bei EDL933

Für die mRNA-Expression der Proben von *toxB* bei 30°C und den pH-Werten 5 und 6 konnte in Relation zu den Kontrollproben mit dem pH-Wert 7,3 eine um das 0,5- und 0,45-Fach reduzierte mRNA-Expression und somit eine signifikant niedrigere Expressionsrate gemessen werden. Bei dem pH-Wert 8,3 zeigte sich keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle (siehe Tabelle 11 und Abbildung 5).

Tabelle 11: Transkriptionsverhältnis von *toxB* bei unterschiedlichen pH-Werten bezogen auf den pH-Wert 7,3 und konstanter Temperatur von 30°C

Bedingung	Gen	RNA-Expressionsverhältniss pH 5, 6 und 8,3 zu pH 7,3	Standardabweichung der Expression
EDL933 pH 5	<i>toxB</i>	0,50	0,06
EDL933 pH 6	<i>toxB</i>	0,45	0,11
EDL933 pH 7,3	<i>toxB</i>	1,00	0,05
EDL933 pH 8,3	<i>toxB</i>	1,06	0,16

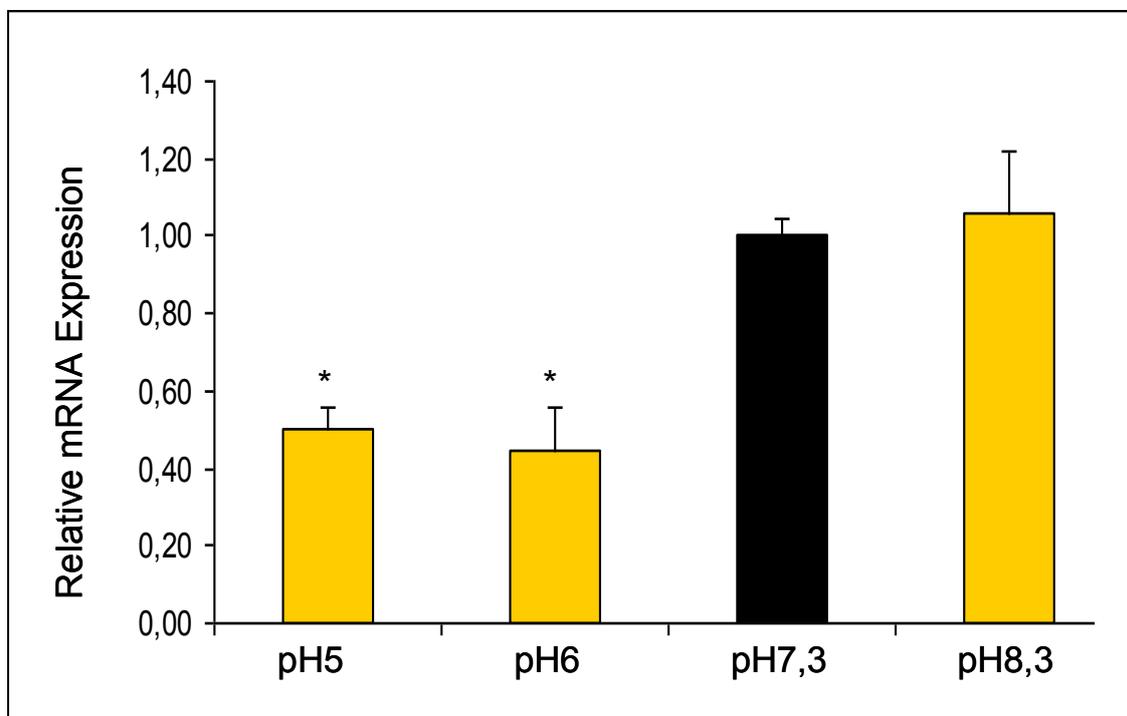


Abbildung 5: Relative mRNA-Expression von *toxB* bei unterschiedlichen pH-Werten und konstanter Temperatur von 30°C, * das Ergebnis ist gemäß Student'schem t-Test signifikant

4.7 One-Step Real-Time RT-PCR zur quantitativen Ermittlung der mRNA-Expression von *toxB* bei verschiedenen pH-Werten und konstanter Temperatur von 37°C bei EDL933

Tabelle 12 und Abbildung 6 zeigen die Ergebnisse der relativen mRNA-Expression von *toxB* bei einer physiologischen Temperatur von 37°C. Die Transkription des *ToxB*-Genes ist bei den pH-Werten von 5 und 6 um das 1,23- und 1,29-Fache, im Vergleich zu den Proben mit dem pH-Wert 7,3, erhöht.

Wesentlich deutlicher steigt die Transkriptionsrate bei einem pH-Wert von 8,3 in Bezug zu den Proben mit dem pH-Wert von 7,3. Hier konnte eine signifikante Steigerung um das 2,84-Fache nachgewiesen werden. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde unter Verwendung des Student'schen t-Tests durchgeführt. Hierfür gilt: wenn $p < 0.5$ ist das Ergebnis als signifikant anzusehen.

Tabelle 12: Transkriptionsverhältnis von *toxB* bei unterschiedlichen pH-Werten bezogen auf den pH-Wert 7,3 und konstanter Temperatur von 37°C

Bedingung	Gen	RNA- Expressionsverhältniss pH 5, 6 und 8,3 zu pH 7,3	Standardabweichung der Expression
EDL933 pH 5	<i>toxB</i>	1,23	0,13
EDL933 pH 6	<i>toxB</i>	1,29	0,18
EDL933 pH 7,3	<i>toxB</i>	1,00	0,23
EDL933 pH 8,3	<i>toxB</i>	2,84	0,28

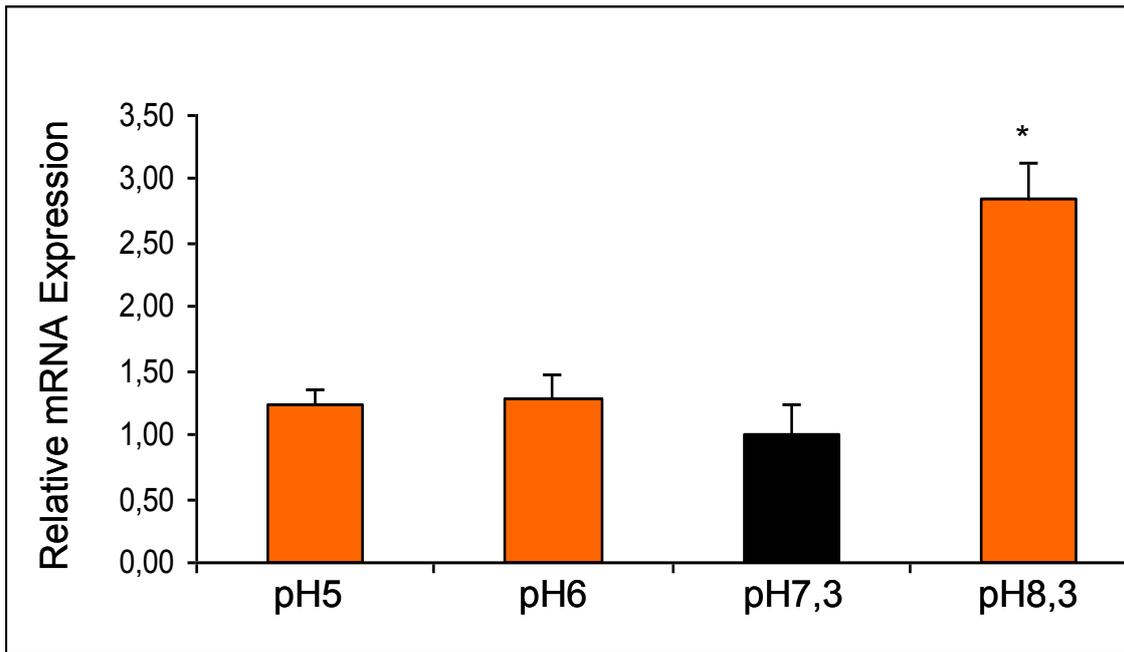


Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von *toxB* bei unterschiedlichen pH-Werten und konstanter Temperatur von 37°C, * das Ergebnis ist gemäß Student'schem t-Test signifikant

5 Diskussion

Die relative Quantifizierung der Real-Time RT-PCR, bei der die Konzentration des Transkriptes von dem Zielgen *toxB* in Relation zum unregulierten Haushaltsgen *gapA* gesetzt wurde, wurde mit SYBR-Green durchgeführt. Die Verwendung des Fluorophoren SYBR-Green hat den Vorteil, dass er ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis erzeugt. Außerdem ist die Signalstärke hoch, weil mehrere Fluorophormoleküle an jedes doppelsträngige DNA-Molekül binden. Da diese Bindungen unspezifisch sind, kann man nicht zwischen korrektem Produkt und Artefakt unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die RNA-Proben zuerst mittels Real-Time PCR auf DNA-Kontamination untersucht. Zusätzlich gelang mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse, bei der im unmittelbaren Anschluss an eine Real-Time PCR die Temperatur kontinuierlich erhöht und dabei die Fluoreszenzintensität gemessen wurde, eine weitere Kontrolluntersuchung auf Artefakte. Durch die Trennung der DNA-Doppelstränge und die Fluoreszenzabnahme bei Verlust des SYBR-Green Farbstoffs kann man jedem PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur zuordnen und auch vermeintliche Primer-Dimere nachweisen. Somit sind die mit diesem Verfahren gewonnenen Ergebnisse von höchster Validität (65).

Bakterien unterliegen bei einem Wechsel ihres Milieus vielen Faktoren, die einen Selektionsdruck hervorrufen. Vor allem EHEC sind in der Lage, sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen, indem sie selektiv unterschiedlich lokalisierte Geninformationen abrufen können. Der Umfang dieser Informationen ist mitbestimmend für die Virulenz der Erreger. EHEC O157:H7 besitzen verschiedenste Virulenzfaktoren. Die Gene, welche für diese Virulenzfaktoren kodieren, befinden sich zum Teil auf intrachromosomalen Pathogenitätsinseln, auf lambdoiden Phagen oder sie sind plasmidkodiert (53). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression für das plasmidkodierte ToxB-Gen in EHEC O157:H7 durch ein basisches Milieu mit einem pH-Wert von 8,3 bei 37°C, gegenüber der Inkubation bei einem pH-Wert von 7 bei 37°C, um das 2,84-Fache gesteigert wird. Die Antwort auf die Frage, warum eine geringe Erhöhung des pH-Wertes von 7 auf 8,3 eine so

große Steigerung der *toxB*-Transkription bei 37°C zur Folge hat, scheint so einfach wie plausibel: Da die Transkription von Virulenzfaktoren Energie benötigt, bringt es für EHEC nur einen Selektionsvorteil, wenn diese Transkription für sie von Nutzen ist. Im menschlichen Darm, den EHEC als Wirt nutzt, herrscht eine Temperatur von ca. 37°C und im Duodenum ein pH-Wert von 8,3. Da ToxB für eine erhöhte Erregeradhärenz verantwortlich ist (60), werden EHEC unter diesen Umständen nicht so einfach aus dem menschlichen Darm gespült. Allerdings setzt diese These voraus, dass auf eine erhöhte *toxB*-Transkription auch eine gleichermaßen erhöhte *toxB*-Translation erfolgt. Dieses müsste in zukünftigen Versuchen gezeigt werden.

Des Weiteren zeigt die mRNA-Expression der Proben von *toxB* bei 30°C und den sauren pH-Werten 5 und 6, in Relation zu den Kontrollproben mit dem pH-Wert 7,3, eine um das 0,5- und 0,45-Fache Reduzierung. Diese Reduktion scheint EHEC außerhalb ihres Wirtes einen Vorteil zu verschaffen, da sie somit Energie sparen, indem sie auf die mRNA-Expression von *toxB* größtenteils verzichten. Es gilt also durch weitere Forschung auf diesem Gebiet herauszufinden, ob bei einer Inkubation der EHEC O157:H7 bei 30°C und den sauren pH-Werten 5 und 6, in Relation zu den Kontrollproben mit dem pH-Wert 7,3, in Folge der verminderten mRNA-Expression von *toxB*, ebenfalls die ToxB-Synthese um die Hälfte abfällt.

In einer Studie von Slanec und Schmidt wurden ebenfalls EHEC des Stammes EDL 933 unter anderem auf die Expression von *toxB* bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Sie fanden heraus, dass die Synthese von ToxB in Gehacktem bei 48°C, im Gegensatz zur Synthese bei 37°C, signifikant erhöht war (54). Da ToxB für eine erhöhte Erregeradhärenz verantwortlich ist (60), könnte dieser Umstand erklären, warum unzureichend gegartes Fleisch eine so hohe Gefahr birgt.

Klar ist, dass weitere Untersuchungen, die sich auf die RNA-Expression von Virulenzfaktoren beziehen, Grundlagenwissen schaffen könnte, welches Zusammenhänge besser verständlich machen und so zu einem verbesserten Therapieansatz bei EHEC-Infektionen führen, oder die Prävention verbessern könnte. Vielleicht könnte so auch die Frage, warum Menschen an einer

Infektion mit EHEC O157:H7 erkranken, Wiederkäuer, welche als Hauptreservoir für EHEC angesehen werden (9, 26, 33, 63), und Wildwiederkäuer (31, 44) jedoch nicht erkranken, geklärt werden. Welche Bedeutung die Forschung auf diesem Gebiet besitzt zeigen unter anderem die jüngsten Geschehnisse.

Zwischen Mai und Juli 2011 kam es vor allem in Norddeutschland zu einer Vielzahl von Erkrankungen mit blutiger Diarrhöe und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) im Zusammenhang mit Infektionen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) des Serotyps O104:H4. Dem Ausbruch zugerechnet wurden insgesamt 855 Erkrankungen an HUS und 2.987 Fälle von akuter Gastroenteritis (46). Insgesamt 53 Patienten, darunter 18 EHEC-Erkrankte mit Gastroenteritis und 35 HUS-Patienten, fielen dem Ausbruch zum Opfer (48).

Schon 1982 waren EHEC nachweislich für Erkrankungen in den USA verantwortlich (45). In den folgenden Jahren kam es immer wieder weltweit zu Erkrankungen mit Todesfolge. 1984 starben nachweislich 4 Personen in den USA (50), 1986 12 in Kanada (15) und 1992 ein Kind in Deutschland (43). 1996 verzeichnet Japan dann die weltweit größte EHEC-Epidemie mit etwa 8000 Erkrankungen und 4 Toten (62).

Seit dieser weltweit größten EHEC-Epidemie ist bekannt welches pathogene Potential die EHEC besitzen. Zusätzlich zu den Todesfällen kommt eine noch größere Zahl an Patienten hinzu, welche nach diesen Infektionen eine Niereninsuffizienz, sowie neurologische Störungen davon tragen. Bei dem jüngsten Ausbruch im Jahr 2011 in Deutschland wurden ungefähr 50 Prozent der HUS-Patienten dialysepflichtig und ein ähnlich hoher Anteil entwickelte neurologische Symptome (47).

Um eine Epidemie frühzeitig stoppen zu können, muss die Infektionsquelle bekannt sein. Allerdings erweist sich die Suche nach den Quellen als schwierig. Die Gründe hierfür sind die geringe Infektionsdosis der EHEC von unter 100 Keimen (22, 59) im Zusammenhang mit den Praktiken der Landwirtschaft verbundenen, theoretisch möglichen Omnipräsenz der Erreger. Die Fäkalien von Wiederkäuern, die als Hauptreservoir für EHEC gelten, werden weltweit in

der Landwirtschaft zur Düngung der Felder verwendet und gelangen so auch in umliegende Gewässer (21). Es gibt immer neue EHEC-Erreger mit differentem pathogenem Potential. So zeigt der Vergleich des Robert Koch-Institutes mit 696 Fällen von HUS, die von 2001 bis 2010 übermittelt wurden, dass die Ausbruchs-HUS-Fälle deutlich älter sind. So sind nur etwa 2% der Ausbruchsfälle unter 5 Jahre alt, gegenüber 69% der HUS-Fälle der Vorjahre, in denen HUS vornehmlich ein pädiatrisches Problem darstellte (46). Begründen kann man diesen Wandel derzeit nur durch Vermutungen.

Es gilt, adäquate Therapien zu entwickeln, sowie neu auftretende Keime ihrem pathogenen Potential zuordnen zu können, um entsprechend reagieren zu können. Somit könnte man zum Beispiel aus der Tatsache, dass Shiga-Toxin produzierende *E. coli* kein Sorbitol fermentieren können, gleichzeitig auf das nicht Vorhandensein des ToxB-Genes schließen. Vielleicht würde es einen Therapievorteil bringen, wenn man im Umkehrschluss in der Initialphase einer Infektion mit Shiga-Toxin produzierende *E. coli*, welche Sorbitol fermentieren können, einen Wirkstoff einsetzt, welcher ToxB so beeinflusst, sodass keine gesteigerte Erregeradhärenz mehr hervorgerufen wird. Ebenso könnte an einem Wirkstoff geforscht werden, welcher bei einer EHEC-Infektion Shiga-Toxin effektiv aus dem Patientenkörper eliminiert oder inaktiviert.

Die Tatsache das mögliche EHEC auf der einen Seite ungehindert von der Landwirtschaft durch fäkale Düngung der Felder, fäkale Verunreinigung in der Fleischproduktion oder gar durch Insekten (47) auf den Menschen übertragen werden können, wobei andererseits mit dem Erreger nur in Laboren mit der zweithöchsten Sicherheitsstufe geforscht wird, scheint absurd. Hier könnte man einen Ansatz für die Forschung finden präventive Techniken zu entwickeln. Vielleicht ist eine Behandlung der Exkreme von domestizierten Wiederkäuern, bevor Felder damit exponiert werden, sinnvoll. Oder man versucht gezielt durch Forschung an Nahrungszusätzen oder Nahrungsumstellung der Wiederkäuer, Fäkalien frei von EHEC zu halten. Das eine Nahrungsumstellung bei Rindern zu einer Reduktion von EHEC in deren Exkrementen führt ist bereits erwiesen (14).

6 Literaturverzeichnis

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Barroso, L. A., Wang, S. Z., Phelps, C. J., Johnson, J. L., and Wilkins, T. D., 1990. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res.* 18:4004.
5. 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.
6. Bell, B. P., Griffin, P. M., Lozano, P., Christie, D. L., Kobayashi, J. M. and Tarr, P. I., 1997. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 100: E12.
7. 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
8. Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minarikova, H., Jikova, E., Karmali, M. A., Laubova, J., Sikulova, J., Preston, M. A., Khakhria, R., Karch, H., Klazarova, H., Nyc, O., 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol. Infect.* 119:299-305.
9. Bielaszewska, M., Schmidt, H., Liesegang, A., Prager, R., Rabsch, W., Tschäpe, 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.
10. Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emödy, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V. F., Uden, G., 2005. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the

- transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. Microbiology 151:3287-3298.
11. Brunder, W., Schmidt, H., and Karch, H., 1996. KatP, a novel catalaseperoxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiology 142:3305–3315.
 12. Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H., 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. Mol. Microbiol. 24:767–778.
 13. Burland, V., Shao, Y., Perna, N. T., Plunkett, G., Sofia, H. J. and Blattner, F. R., 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Res. 26:4196–4204.
 14. Callaway, T. R., Elder, R. O., Keen, J. E., Anderson, R. C. and Nisbet, D. J., 2003. Forage Feeding to Reduce Preharvest *Escherichia coli* Populations in Cattle, a Review. Journal of Dairy Science Vol. 86, No. 3, 2003
 15. Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A., Lior, H., 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. New Engl. J. Med. 24:1496-1500
 16. 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
 17. Como-Sebeti, K., Reagan, K. S., Alaire, S., Parrott, K., Simonds, C. M., Hrabowy, S. et al., 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts- Michigan and Virginia, June-July 1997. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 46:741-744.
 18. DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S. and Finley, B.B., 1999. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. Infect. Immun. 67:2389–2398.
 19. Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P.S., Chaudhuri, A. K. and 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.
 20. Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A. U., Krämer, S., Deibel, C., Guzmán, C. A., and T. Chakraborty, T., 1998. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangement depend on filamentous EspA-containing surface appendages. Mol. Microbiol. 30:147–161.
 21. Faith, N. G., Shere, J. A., Brosch, R., Arnold, K. W., Ansay, S. E., Lee, M. - S., Luchansky, J. B., and Kaspar, C. W., 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 62:1519–1525.

22. Foster, J. W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat. Rev. Microbiol. 2:898-907.
23. Fratamico, P. M., Bhaduri, S. and Buchanan, R. L., 1993. Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-MDa plasmid and on 60-Mda plasmid-cured derivatives. J. Med. Microbiol. 39:371-381.
24. García, A., Fox, J. G., Besser, T. E., 2010. Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health perspective. ILAR J. 51:221-32.
25. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M. and 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.
26. Geue, L., Segura-Alvarez, M., Conraths, F. J., Kuczius, T., Bockemühl, J., Karch, H., Gallien, P., 2002. A long-term study on the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. Epidemiol. Infect. 129:173-185.
27. Hahn, H., Kaufman, S. H. E., Schulz, T. S., Suerbaum, S., 2009. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Verlag, 6.Auflage
28. Holme, R., 2003. Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. Water. Sci. Technol. 47:1-6.
29. Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kuda, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H. and Kumagai, S., 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. Appl. Environ. Microbiol. 64:1532-1535.
30. Karch, H., Tarr, P. I. and Bielaszewska, M., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int. J. Med. Microbiol. 295:405-418.
31. Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D. H., Hancock, D. D., Balan, V. K., Zhao, T., Doyle, M. P., 1997. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. JAMA 277:1229-1231.
32. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, 2008. Pathogenic *E.coli*
33. Kudva, I. T., Hatfield, P. G., Hovde, C. J., 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. J. Clin. Microbiol. 34:431-433.
34. Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. Methods 25:402-408.
35. Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C. H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C. G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S. and Shinagawa, H., 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. DNA

- Res. 5:1–9.
36. 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. U.S.A.* 92:1664-1668.
 37. Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., and Caprioli, A., 2003. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 71:3343–3348.
 38. Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201
 39. Paton, J.C.; Paton, A.W. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11:450-479.
 40. Pistor, K., Bachmann, H. J., Bläker, F., Bulla, M., Dippell, J., Hake, H., Holtvoeth, W., Kirsch, W., Lennert, T., Müller-Wiefel, D. E., Offner, G., Olbing, H., Schüler, H. W., Stehr, K., Straub, E., Tewes, I., 1978. Akutes Nierenversagen im Kindesalter. *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 126:328-30.
 41. Proulx, F., Seidman, E. G. and Karpman, D., 2001. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.* 50:163-171.
 42. Ray, P. E., Liu, X.H. Pathogenesis of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome, 2001. *Pediatr. Nephrol.* 16:823-839.
 43. Reida, P., Wolff, M., Pohls, H.-W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksic, S., Karch, H., Bockemühl, J., 1994. An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children Day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination *Zbl. Bakt.* 281:534-543
 44. Rice, D. H., Hancock, D. D. and Besser T. E., 1995. Verotoxigenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. *The Veterinary Record* 137:524.
 45. Riley, L. W., Robert, S. R., Steven, D. H., McGee, H. B., Wells, J. G., Betty, R. D., Richard, J. H., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
 46. Robert Koch-Institut, 2011. Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Im Internet verfügbar unter www.rki.de.
 47. Robert Koch-Institut, 5. März 2012. Ergebnisse des Workshops: „Experiences from the STEC O104:H4 outbreak in Germany and research needs for STEC“ *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 9.
 48. Robert Koch-Institut, 2011. Informationen zum EHEC-/HUS-Ausbruchsgeschehen von Mai bis Juli 2011 in Deutschland – Ende des Ausbruchs. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 31.

49. Robert Koch-Institut, Berlin. Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*. Ratgeber Infektionskrankheiten, aktualisierte Fassung vom Januar 2008.
50. Ryan, C. A., Tauxe, R. V., Hisek, G. W., Wells, J. G., Stoez, P. A., McFadden, H. W., Smith, P. W., Wright, G. F., Blake, P. A., 1986. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J. Infect. Dis.* 154:631-638.
51. Schmidt, H., Karch, H. and L. Beutin L., 1994. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol. Lett.* 117:189–196.
52. Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63:1055–1061.
53. Schmidt, H., Bitzan, M. and Karch, H., 2001. Pathogenic aspects of Shiga toxin-producing *E. coli* infections in humans, p. 241–262. *In* G. Duffy, P. Garvey, and D. McDowell (ed.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Food & Nutrition Press, Inc., Trumbull, Conn.
54. Slanec, T., Schmidt, H., 2011. Specific expression of adherence-related genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 after heat treatment in ground beef. *J. Food Prot.* 74:1434-40.
55. Tarr, C. L., Large, T. M., Moeller, C. L., Lacher, D. W., Tarr, P. I., Acheson, D. W. and Whittam, T. S., 2002. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 70:6853–6859.
56. Tarr, P. I. and Neill, M. A., 2001. *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 30:735-751.
57. Tarr, P. I., Neill, M. A., Clausen, C. R., Watkins, S. L., Christie, D. L. and Hickman, R. O., 1990. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J. Infect. Dis.* 162:553-556.
58. Tatsuno, I., Kimura, H., Okutani, A., Kanamaru, K., Abe, H., Nagai, S., Makino, K., Shinagawa, H., Yoshida, M., Sato, K., Nakamoto, J., Tobe, T., and Sasakawa, C., 2000. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells. *Infect. Immun.* 68:5943–5952.
59. 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.
60. Toth, I., Cohen, M. L., Rumschlag, H. S., Riley, L. W., White, E. H., Carr, J. H.,

- Bond, W. W. and Wachsmuth, I. K., 1990. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infect. Immun.* 58:1223–1231.
61. Trabulsi, L. R., Keller, R. and Tardelli Gomes, T. A., 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:508-513.
62. Watanabe, H., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K., Tambura, K., 1996. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan 1996. *Lancet* 348:831-832.
63. Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. P., Martin, M. L., Griffin, P. M., Ostroff, S. M., 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxinproducing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29:985-989.
64. Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins S. L. and 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.
65. Zhang, W., Bielaszewska M., Friedrich A. W., Kuczius T. and Karch H., 2005. Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:558-561.
66. Zoja, C., Buelli, S., Morigi, M., 2010. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Pathophysiology of endothelial dysfunction, *Pediatr. Nephrol.* 25:2231-2240.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A/E	attachment/effacement
bp	Basenpaare
β-ME	β-Mercaptoethanol
μl	Mikroliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EHEC- <i>hly</i>	EHEC-Hämolysin Gen
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
EspP	extracellular serine protease
espP	Serinprotease Gen
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
GapA	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase A
gapA	Gen, kodiert für Glycerinaldehyd-3- phosphat Dehydrogenase A
Gb3Cer	Globotriaosylceramid
Hb	Hämoglobin
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
<i>katP</i>	Katalase-Peroxidase Gen
kb	Kilobasenpaare
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LEE	locus of enterocyte effacement
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NTC	No Template Control
OD	Optische Dichte

PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkriptase
SMAC	Sorbitol MacConkey Agar
STEC	Shiga Toxinproduzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
ToxB	Protein, kodiert von dem Gen <i>toxB</i>
<i>toxB</i>	Gen, kodiert für das Protein ToxB
TSB	Tryptone Soya Broth
UKM	Universitätsklinikum Münster

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung **01**: Amplifikationskurven, Kontrolle auf DNA-Kontamination mittels Real-Time PCR
- Abbildung **02**: Schmelzkurven für *toxB* und *gapA*
- Abbildung **03**: Amplifikationskurven der One Step Real-Time RT-PCR
- Abbildung **04**: Relative mRNA-Expression von *toxB* bei 22°C
- Abbildung **05**: Relative mRNA-Expression von *toxB* bei 30°C
- Abbildung **06**: Relative mRNA-Expression von *toxB* bei 37°C

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle **01**: *E. coli* Pathogenitätsgruppen, Epidemiologie, Klinik und Betroffene
- Tabelle **02**: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen
- Tabelle **03**: Inkubierte EHEC-O157:H7-Proben
- Tabelle **04**: Real-Time PCR-Ansatz
- Tabelle **05**: verwendete Primer
- Tabelle **06**: Real-Time RT-PCR-Ansatz zur Ermittlung der Primerkonzentration (200nM) und der Templatemenge
- Tabelle **07**: Real-Time RT-PCR-Ansatz zur Ermittlung der Primerkonzentration (400 nM) und der Templatemenge
- Tabelle **08**: Real-Time RT-PCR-Ansatz zur quantitativen Ermittlung der *toxB*-Transkription
- Tabelle **09**: PCR Nachweis von *toxB* in Stx-produzierenden *E. coli* O157:H7 und SF O157:H-
- Tabelle **10**: Häufigkeit der Transkription von *toxB* bei 22°C bezogen auf die Kontrollprobe mit dem pH-Wert 7,3
- Tabelle **11**: Häufigkeit der Transkription von *toxB* bei 30°C bezogen auf die Kontrollprobe mit dem pH-Wert 7,3
- Tabelle **12**: Häufigkeit der Transkription von *toxB* bei 37°C bezogen auf die Kontrollprobe mit dem pH-Wert 7,3

8 Lebenslauf

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. H. Karch für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. med. dent. B. Ehmke danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Für die Geduld und ständig freundlich und hilfreiche Betreuung durch Frau Dr. med. W. Zhang spreche ich ihr meinen ganz besonderen Dank aus.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium für Zahnmedizin ermöglicht, und somit den Grundstein dieser Arbeit gelegt haben.

Bei meiner Freundin Nadja Plum möchte ich mich für die ständig neue Motivation zu dieser Arbeit bedanken.