

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

Phylogenetischer Vergleich von chromosomal-
und plasmid-kodierten Genabschnitten in
enterohämorrhagischen *Escherichia coli*

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Waldmann, Karsten
aus Münster

2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Mellmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Becker
Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

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

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Mellmann

Koreferent: Prof. Dr. med. Karsten Becker

ZUSAMMENFASSUNG

Phylogenetischer Vergleich von chromosomal- und plasmid-kodierten
Genabschnitten in enterohämorrhagischen *Escherichia coli*

Waldmann, Karsten

Escherichia coli ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium, das typischerweise als Kommensale den Gastrointestinaltrakt besiedelt und nur selten Erkrankungen im Menschen verursacht. Jedoch gibt es einige pathogene *E. coli*-Varianten wie die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die spezielle Virulenzfaktoren besitzen, und intrainestinale Erkrankungen auslösen können, darunter das hämolytisch urämisches Syndrom, der häufigste Grund für akutes Nierenversagen im Kindesalter. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem repräsentativen Kollektiv HUS-assoziiierter EHEC (HUSEC) untersucht, in welchem Verhältnis sich das Plasmid und das Chromosom zueinander entwickelt haben. Dazu wurden 41 Stämme hinsichtlich der plasmid-kodierten Gene EHEC-*hlyA* und *espP* untersucht und sequenziert. Diese plasmidalen Sequenzen sowie die konkatenierten Sequenzen der sieben chromosomalen Haushaltsgene aus dem *E. coli*-MLST-Schema wurden auf ihre Phylogenie untersucht um einen Vergleich der Entwicklung durchzuführen. Von den 42 untersuchten HUSEC-Stämmen waren 23 EHEC-*hlyA*-positiv und 14 *espP*-positiv, darunter 12 sowohl EHEC-*hlyA* als auch *espP*-positiv. Der Vergleich der phylogenetischen Bäume ergab, dass die Struktur der plasmidalen Sequenzen gegenüber den chromosomalen Sequenzen keine signifikanten Übereinstimmungen aufweisen. Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass sich in HUSEC die chromosomalen Gene unabhängig von den plasmidalen Genen entwickelt haben.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2014

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Phylogenetischer Vergleich von chromosomal- und plasmid-kodierten
Genabschnitten in enterohämorrhagischen *Escherichia coli*

in dem Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster

unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Mellmann

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.

Münster, 01.04.2014

Karsten Waldmann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Materialien.....	6
2.1.1. Standardgeräte, -chemikalien und -materialien.....	6
2.1.2. PCR-Reagenzien	6
2.1.3. Stammsammlung und Referenzstämme	7
2.2. Methoden	9
2.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	9
2.2.2. Sequenzierung der PCR-Produkte.....	10
2.2.3. Phylogenetische Analysen	11
2.2.4. Vergleich der phylogenetischen Bäume.....	11
3. Ergebnisse	13
3.1. Nachweis von <i>espP</i> und EHEC- <i>hlyA</i> in den HUSEC-Stämmen	13
3.2. Phylogenie der einzelnen Gene.....	15
3.3. Vergleich der phylogenetischen Bäume.....	19
4. Diskussion.....	22
5. Literaturverzeichnis.....	28
6. Lebenslauf	34
7. Danksagung.....	35

1. Einleitung

Escherichia coli ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium (27). Typischerweise besiedelt *E. coli* als Kommensale den Gastrointestinaltrakt und verursacht nur selten Erkrankungen im Menschen (33). Jedoch gibt es einige *E. coli*-Varianten, die spezielle Virulenzfaktoren besitzen, und eine Vielzahl an intra- oder extraintestinalen Erkrankungen auslösen können, insbesondere Diarrhöen, Harnwegsinfekte und Septikämien (20). Der bekannteste Pathogenitätsfaktor bei intestinal-pathogenen *E. coli* ist das Shiga Toxin (Stx). Stx-positive *E. coli* werden als Shiga Toxin produzierende *E. coli* (STEC) bezeichnet (16).

Da nicht alle STEC mit humanen Erkrankungen assoziiert sind und teilweise nur beim Rind nachgewiesen werden (19), aber auch durch den Kontakt zu Rindern sowie den Verzehr von kontaminierte Fleisch übertragen werden können (12,34,45), werden im deutschsprachigen Raum die krankheitsauslösenden STEC enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) genannt. Diese Erreger sind in der Lage, neben wässrigen und blutigen Diarrhöen auch schwere Krankheitsbilder wie die hämorrhagische Kolitis oder das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) hervorzurufen (21,27). Definiert wird das HUS als eine Trias aus mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akuter Nephropathie (40). Klinisch-laborchemisch wird die Diagnose HUS gestellt bei Vorliegen eines Hämatokrits unter 30% mit Nachweis zerstörter Erythrozyten (Fragmentozyten) im Blutausschlag, einer Thrombozytenanzahl von weniger als 150,000/mm³ und einer Kreatininkonzentration, die die obere Grenze des Normwertes für das entsprechende Alter überschreitet (15). Bei der Pathogenese geht man davon aus, dass während einer EHEC induzierten Kolitis Stx und Lipopolysaccharide durch die Darmwand in den Blutkreislauf gelangen und dann an Glykoproteinrezeptoren (Gb3) in Darm und Nieren binden, ein Prozess der unter anderem durch das vom *eae*-Gen (*E. coli* attaching and effacing) kodierte

Adhesin vermittelt wird (48). Die darauf folgende Aufnahme in die Zellen bewirkt eine Inhibition der Proteinproduktion und dadurch eine Schädigung oder die Zerstörung der Zelle sowie eine Ablösung von der Basalmembran (22,40).

Die besondere Fähigkeit der EHEC-Bakterien ein HUS zu verursachen besitzt weltweit große Bedeutung, da EHEC-Infektionen der häufigste Grund für akutes Nierenversagen im Kindesalter sind und in 90% aller HUS-Erkrankungen als Ursache angesehen werden (15,40,46). Während bei schweren klinischen Verläufen und insbesondere beim HUS EHEC des Serotyps O157:H7/H⁻ weltweit dominieren, kann es jedoch regional große Unterschiede geben, was die Serotypenverteilung angeht. In Deutschland werden beispielsweise nur ca. zwei Drittel aller HUS-Fälle durch EHEC O157:H7/H⁻ verursacht, die übrigen Fälle werden durch eine Vielzahl von anderen Serotypen wie z. B. O26:H11/H⁻ oder O145:H28/H⁻ ausgelöst (23). Um die Entstehung von EHEC und die Krankheitsentstehung durch die verschiedenen EHEC-Serotypen besser verstehen zu können, wurde hierzu als repräsentative Stammsammlung die Kollektion von HUS-assoziierten EHEC (HUSEC) etabliert, die die gesamte phylogenetische Breite von HUS-assoziierten EHEC in Deutschland widerspiegelt (32).

Untersuchungen zur Entstehung von pathogenen *E. coli* im Vergleich zu kommensalen *E. coli* haben gezeigt, dass das Genom von *E. coli* nicht fix ist, sondern ständigen Umstrukturierungen unterworfen ist. Dieser Entwicklung durch Genmodifikationen, Genverlusten oder Aufnahme zusätzlicher Gene, insbesondere durch horizontalen Gentransfer, kommt eine bedeutende Rolle für die Variabilität des Genoms sowie der Entstehung neuer *E. coli*-Pathotypen zu (2).

Während Punktmutationen und genetische Umordnung nur zu langsamen Veränderungen im Genom führen, bewirkt der horizontale Gentransfer eine schnelle Umgestaltung durch Insertionen oder Deletionen ganzer Genabschnitte (39). So sind viele Virulenzfaktoren auf übertragbaren Genelementen wie Bakteriophagen, Plasmiden oder Transposons lokalisiert und können daher leicht zwischen Bakterien ausgetauscht werden (17). Sie

besitzen die Fähigkeit sich episomal zu vervielfältigen oder sich in das Chromosom zu integrieren oder herauszulösen, sodass eng verwandte Gene sowohl auf dem Chromosom als auch auf anderen mobilen DNA Elementen existieren können (13).

Neben der Charakterisierung der unterschiedlichen Pathogenitätsmarker spielt die Analyse des Kerngenoms eine wichtige Rolle, um die Evolution einer Spezies besser zu verstehen. Hierzu ist heutzutage die Multilokus Sequenztypisierung (MLST) anerkannter Standard (28). Bei dieser Methode werden stellvertretend für das Kerngenom bei *E. coli* partielle Gensequenzen von sieben verschiedenen Haushaltsgenen bestimmt (47), deren Sequenzen dann für das jeweilige Gen in Allelbezeichnungen umgeschrieben werden. Die Zusammensetzung der verschiedenen Allele (Allelprofil) ergibt dann als Typisierungsergebnis den Sequenztyp (ST).

Weiterhin ist für das umfassende Verständnis der Evolution wichtig zu wissen, in welchem Verhältnis sich chromosomale und plasmidale Gene entwickeln. Eine Möglichkeit ist die parallele und vergleichende Sequenzanalyse von chromosomalen und plasmidalen Genen. In EHEC sind u. a. extrazelluläre Serinproteasen (EspP) oder das EHEC-Hämolyisin (EHEC-HlyA) plasmid-kodierte Regionen, die bereits funktionell umfangreich charakterisiert worden sind und sich aufgrund ihrer Verbreitung über Serotypgrenzen hinweg als Zielregionen für weiterführende phylogenetische Analysen anbieten (6,37). Beide sind auf dem großen Plasmid pO157 nachgewiesen, welches bereits in mehreren EHEC O157:H7 Stämmen komplett sequenziert wurde, dessen pathogenetische Relevanz aber noch nicht völlig geklärt ist (9).

Bei dem EspP handelt es sich um einen Autotransporter, der unter anderem den Koagulationsfaktor V spaltet und somit Einfluss auf die Gerinnung hat. Dadurch könnten die blutigen Durchfälle bei EHEC-Erkrankungen verstärkt werden (6). Weitere Untersuchungen haben bei verschiedenen STEC-Serotypen in über 50% der Fälle *espP* nachgewiesen, darunter zu fast 100% in *E. coli* O157:H7 (5). Zudem wurden vier Allele identifiziert, die

untereinander auf Genebene eine Homologie von 95-99,9% aufweisen. Das Genprodukt zweier Untergruppen, EspP α und EspP γ , zeigten dabei eine Wirkung auf Faktor V, wohingegen EspP β und EspP δ nicht sekretiert wurden oder proteolytisch inaktiv waren (5). Das *espP*-Gen scheint in EHEC Bakterien weit verbreitet zu sein und eine große Heterogenität aufzuweisen, wobei Studien zeigen das *espP*-positive *E. coli* Bakterien von an HUS erkrankten Patienten im Regelfall *espP α* besitzen (5,24).

Auch das Gen EHEC-*hlyA* befindet sich auf dem großen Plasmid pO157 der *E. coli* Bakterien. Das Genprodukt EHEC-HlyA weist eine große Ähnlichkeit mit dem chromosomal kodierten Protein α -Hämolyisin auf und zählt zu der Gruppe der porenbildenden Cytolysine, welche die Fähigkeit haben, Poren in Membranen zu bilden und bestimmte eukaryotische Zellen, insbesondere Erythrozyten, aufzulösen (1,36-38). Obwohl die genaue Rolle des EHEC-*hlyA* in der Pathogenese von EHEC-Infektionen noch nicht genau geklärt werden konnte (37,44), scheint es eine große Bedeutung bei der Entstehung von hämorrhagischen Kolitiden und dem HUS zu besitzen und die Virulenz der Erreger zu verstärken (38).

Im Gegensatz zu den funktionellen Daten sind die Prävalenz und die Phylogenie dieser plasmid-kodierten Virulenzmarker noch vollkommen unbekannt. Zudem ist nicht bekannt, ob sich die Plasmide unabhängig vom Chromosom entwickeln und häufig oder nur selten zwischen den verschiedenen EHEC-Serotypen horizontal ausgetauscht werden. Um die genotypische Prävalenz und Phylogenie von den beiden plasmid-kodierten Virulenzmarkern EHEC-*hlyA* und *espP* in der HUSEC-Kollektion zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

- In welchen Serotypen kommen EHEC-*hlyA* und/oder *espP* vor? Hierzu soll die genotypische Prävalenz mittels spezifischer PCRs in der HUSEC-Kollektion untersucht werden.
- Wie ist Allelverteilung dieser Gene innerhalb der HUSEC-Kollektion? Mittels DNA-Sequenzierung zweier interner Genfragmente der jeweiligen Gene soll die Phylogenie dieser Gene hinsichtlich ihrer Entstehung untersucht werden.
- Wie verhält sich die Entwicklung dieser plasmid-kodierten Gene im Vergleich zum Chromosom? Hierzu werden die Phylogenien der einzelnen Gene mit den konkatenierten Sequenzen der sieben chromosomalen Haushaltsgene aus dem *E. coli*-MLST-Schema verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Standardgeräte, -chemikalien und -materialien

Es wurden Standardgeräte, -chemikalien und -materialien (Glas- und Plastikwaren) der Firmen Abgene (Genf, Schweiz), Applied Biosystems (Foster City, Ca., USA), Biometra (Göttingen), BioRad-Laboratories (München), Biozym (Wien, Österreich), Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Flacht), Heidolph (Schwabach), Heraeus (Hanau), Herolab (Wiesloch), Keutz (Reiskirchen), Kirsch (Offenburg), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Osterode am Harz) verwendet.

Spezielle Materialien, insbesondere für die molekularbiologischen Versuche, werden bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

2.1.2. PCR-Reagenzien

Die in der PCR verwendeten Primer sind von der Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) synthetisiert und im Methodenteil aufgelistet. Die übrigen PCR-Reagenzien (Taq-DNA-Polymerase, 5x Enhancer Solution P, 10x Reaktionspuffer Y, 25 mM MgCl₂) stammen von der Firma Peqlab Biotechnologie (Erlangen). Der 1kb-DNA-Marker wurde von der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) hergestellt.

2.1.3. Stammsammlung und Referenzstämme

Die verwendeten isolierten DNA Stämme stammen aus der HUSEC-Referenzstammsammlung des Institutes für Hygiene der Universität Münster. Die Sammlung vereint verschiedene HUS-assoziierte EHEC-Serotypen (32) und ist in Tabelle 1 abgebildet. Als Kontrollen für die PCR- und Sequenzreaktionen wurden die beiden Stämme EDL933 und C600 verwandt.

Tabelle 1: Aufstellung der 42 HUSEC Isolate mit ihren Serotypen und Multilokus Sequenztypen

HUSEC Nummer	Stamm	Serotyp	Sequenztyp (ST)
HUSEC001	05-946	O111:H10	43
HUSEC002	5152/97	Ont:H ⁻	330
HUSEC003	6334/96	O157:H7	11
HUSEC004	3072/96	O157:H ⁻	11
HUSEC005	2907/97	O55:H7	335
HUSEC006	5376/99	O157:H ⁻	587
HUSEC007	7382/96	O103:H2	17
HUSEC008	2791/97	O103:H ⁻	17
HUSEC009	6833/96	OR:H2	17
HUSEC010	1805/00	O119:H2	20
HUSEC011	2516/00	O111:H8	16
HUSEC012	6037/96	O111:H ⁻	16
HUSEC013	2245/98	O26:H11	21
HUSEC014	5080/97	O26:H ⁻	21
HUSEC015	126814/98	OR:H11	21
HUSEC016	5028/97	Ont:Hnt	21
HUSEC017	3319/99	O26:H11	27
HUSEC018	1530/99	O26:H11	29
HUSEC019	1588/98	OR:H11	29
HUSEC020	3271/00	O26:H11	396

HUSEC021	0488/99	O145:H28	32
HUSEC022	4557/99	O145:H	137
HUSEC023	1169/97/1	O112:H	40
HUSEC024	2996/96	O73:H18	69
HUSEC025	06-05009	O55:Hnt	101
HUSEC026	99-09355	O113:H21	56
HUSEC027	03-07727	O163:H19	654
HUSEC028	03-06687	O128:H2	25
HUSEC029	4256/99	O70:H8	39
HUSEC030	05-03519	O98:H	306
HUSEC031	7792/96	OR:H	306
HUSEC032	2441/98	O136:Hnt	329
HUSEC033	4392/97	O145:H25	342
HUSEC034	3332/99	O91:H21	442
HUSEC035	1529/98	O121:H19	655
HUSEC036	2839/98	O145:H	659
HUSEC037	02-03885	O104:H21	672
HUSEC038	3356/97B	Ont:H21	672
HUSEC039	3651/96	O76:H19	675
HUSEC040	220/00	O174:H21	677
HUSEC041	01-09591	O104:H4	678
HUSEC042	820/08	O165:H25	119

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis und die Amplifikation spezifischer DNA Abschnitte wurden mittels PCR durchgeführt und erfolgten mit einem Gesamtvolumen von 49,4 µl pro Reaktionsgefäß. Initial begannen die thermischen Reaktionen mit einer fünfminütigen Denaturierungsphase bei 94°C. Danach folgten 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase für 30 Sekunden bei 94°C, eine Primerhybridisierungsphase für 60 Sekunden bei den in Tabelle 2 angegebenen Temperaturen und einer Elongationsphase für 60 Sekunden bei 72°C, die nach Beendigung des letzten Zyklus durch eine letzte fünfminütige Elongationsphase bei 72°C abgeschlossen wurde. Die genauen Angaben für die PCR sind in Tabelle 2 dargestellt.

Der PCR-Ansatz von 49,4 µl wurde pipettiert aus 5,0 µl DNA sowie einem 44,4 µl Mix bestehend aus 24,7 µl HPLC, 5,0 µl Puffer, 10,0 µl Enhancer, 1,5 µl MgCl₂, 1,0 µl dNTP, 1,0 µl Primer forward, 1,0 µl Primer reverse und 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase.

Tabelle 2: PCR Primer und Bedingungen

Primer	Primer-Sequenz 5'-3'	Gen	Anlagerungs- -temperatur	Amplifikat	Referenz
hlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	EHEC	52°C	621 bp	(37)
hlyA8	TAACCCCTGTGCCATTCTCT	- <i>hlyA</i>			diese Studie
hlyA7	TGTATCTGCGGGAGTTAGTG	EHEC	52°C	700 bp	diese Studie
hlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	- <i>hlyA</i>			(37)
hlyA9	ACCCAGGAGAAGAAGTTAG	EHEC	52°C	669 bp	diese Studie
hlyA1	CTGGTCGTCTCCCTGTCCTC	- <i>hlyA</i>			(37)
espP-A	AAACAGCAGGACCTTGAACG	<i>espP</i>	53°C	613 bp	(7)
espP-1137R	TAAAGGTGAAATCATCCCCG				diese Studie

espP- 2369F	ACTCCGCCAGACTCGTTGCC	<i>espP</i> 54°C	675 bp	diese Studie
espP- 3024R	AGTCAACAGAGAACAGGGCG			diese Studie

Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung auf einem 1,5%igen Agarosegel in 0,5%igem TBE-Puffer (2,7 g Borsäure, 5,4 g Tris Ultra, 2 ml EDTA ad 1 l VE-H₂O). Nach Färbung des Gels in einem Wasserbad mit Ethidiumbromid (BioRad GmbH, München) konnte die Detektion mittels UV-Transluminatation bei 320 nm erfolgen. Bei der dabei verwendeten Software handelt es sich um QuantityOne (BioRad, München, V4.6, build 036).

2.2.2. Sequenzierung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierung wurden die doppelsträngigen PCR-Produkte enzymatisch durch die Exonuklease I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt-Hoechst) und die SHRIMP alkaline phosphatase (USB Amersham, Freiburg) in Anlehnung an die Methode von Dugan et al. (14) aufgereinigt. Zur Sequenzierung von den 2 Genabschnitten pro Gen wurden jeweils 5 µl des PCR-Produkts mit 1 U beider Enzyme bei 37°C für 45 Minuten inkubiert, bevor die Enzyme bei 80°C für 15 Minuten inaktiviert wurden und die PCR-Produkte bei 4°C gelagert wurden. Die aufgereinigten Amplifikate wurden dann mittels dem ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Sequenzierungskits (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) im ABI Prism 3130xl Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert. Benutzt wurden dabei 0,5 µl des Premixes aus dem Kit, 1,8 µl Tris-HCl-MgCl₂ buffer (400 mM Tris-HCL; 10 mM MgCl₂), 10 pmol des Sequenzierungsprimers (identisch mit dem PCR-Primer), und 2 µl des PCR-Produkts in einem gesamten Volumen von 10 µl.

2.2.3. Phylogenetische Analysen

Für die phylogenetischen Analysen wurden jeweils die zusammengehörigen Sequenzen der Genabschnitte konkateniert und durch das in BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) implementierte ClustalW ein Alignment erstellt.

Aus diesen Daten wurde Bäume mit der maximum likelihood Methode durch die PHYML 3.0 Software (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>) generiert. Die so entstandenen phylogenetischen Bäume können mit Hilfe der MEGA4 Software (<http://www.megasoftware.net>) angezeigt und in ihrer Darstellung angepasst werden. Zudem wurde mit den EHEC-*hlyA* und *espP* Allelen eine Rekombinationsanalyse durch den GENECONV Algorithmus des Recombination Detection Program (<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>) durchgeführt (29).

2.2.4. Vergleich der phylogenetischen Bäume

Um die Phylogenie der einzelnen Gene miteinander zu vergleichen wurde das von Jan P. Meier-Kolthoff et. al. entwickelte und frei erhältliche Programm CopyCat (<http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/copycat>) verwandt (30). Das Programm bietet eine graphische Oberfläche für die von Legendre et al. entwickelten Programme DistPCoA und Parafit (26) bzw. für die in diesem Fall verwendeten und von A. Stamatakis et al. optimierten Programme AxPcoords und AxParafit (42).

Verglichen wurde jeweils die Bäume der *espP*-positiven bzw. EHEC-*hlyA*-positiven MLST-Sequenzen gegenüber den Bäumen der *espP*-Sequenzen und EHEC-*hlyA*-Sequenzen.

Die Eingabe der mit PhyML generierten phylogenetischen Bäume erfolgt paarweise im Newick-Format, wobei es erforderlich ist, einem Baum die Rolle als Wirt und dem anderen Baum die Rolle als Parasit zuzusprechen. Die Einordnung der chromosomalen Genabschnitte als Wirt und somit der

plasmidalen Abschnitte als Parasit erscheinen dabei logischer.

Zudem muss eine Assoziationstabelle erstellt werden, in der die jeweils zusammengehörigen Stämme aufgelistet und gegenübergestellt werden. Die Baumdaten werden dann jeweils durch CopyCat in eine Distanzmatrix umgewandelt. Aus diesen beiden Distanzmatrizen wiederum wird eine neue Distanzmatrix erstellt, die die Assoziation von Wirt und Parasit widerspiegelt.

Aus dieser Assoziationsmatrix berechnet das Programm eine globale Statistik über das Verhältnis der Gesamtstruktur. Zudem kann das Programm einzelne Stammassoziationen überprüfen, indem es den Einfluss der individuellen Stämme auf die Gesamtstruktur testet.

Als Resultat erhält man für die Gesamtübereinstimmung einen p-Wert, der bei einem Wert kleiner 0,05 aussagt, dass auf einem 95%igen Signifikanzniveau, die Ähnlichkeit der Phylogenien größer ist als mit einem zufällig generierten Baum. Zudem erhält man für die einzelnen Stämme Wahrscheinlichkeitswerte, die bei einem Wert kleiner 0,05 dem Stamm eine signifikante Bedeutung an der Gesamtstruktur zusprechen.

Zur Illustration der Ergebnisse wurden Tanglegramme erstellt. Die phylogenetischen Bäume wurden durch die MEGA4 Software nur mit ihrer Topologie dargestellt und manuell gegenübergestellt. Die zusammengehörigen Stämme wurden miteinander verbunden und signifikante Stammassoziationen sind rot markiert.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von *espP* und EHEC-*hlyA* in den HUSEC-Stämmen

Der Nachweis der spezifischen Genabschnitte wurde mittels PCR durchgeführt und durch UV-Transluminations sichtbar gemacht. Die Banden waren scharf begrenzt und zeigten einen klar definierten Genabschnitt bei den jeweils zu erwarteten Basenpaarlängen.

Von den 42 untersuchten HUSEC-Stämmen waren 23 EHEC-*hlyA*-positiv und 14 *espP*-positiv, darunter 12 sowohl EHEC-*hlyA* als auch *espP*-positiv. Eine Übersicht der Genabschnitt positiv getesteten Stämme ist in Tabelle 3 gegeben. Die nicht aufgeführten Stämme sind sowohl EHEC-*hlyA* als auch *espP*-negativ.

Tabelle 3: Genübersicht der HUSEC-Stämme

HUSEC Nummer	Stamm	Serotyp	EHEC- <i>hlyA</i>	<i>espP</i>
HUSEC002	5152/97	Ont:H ⁻	+	+
HUSEC003	6334/96	O157:H7	+	+
HUSEC004	3072/96	O157:H ⁻	+	-
HUSEC006	5376/99	O157:H ⁻	+	-
HUSEC011	2516/00	O111:H8	+	-
HUSEC013	2245/98	O26:H11	+	+
HUSEC014	5080/97	O26:H ⁻	+	+
HUSEC016	5028/97	Ont:Hnt	+	+
HUSEC018	1530/99	O26:H11	+	-
HUSEC019	1588/98	OR:H11	+	+
HUSEC020	3271/00	O26:H11	+	+
HUSEC021	0488/99	O145:H28	+	+
HUSEC022	4557/99	O145:H ⁻	+	-
HUSEC025	06-05009	O55:Hnt	-	+
HUSEC026	99-09355	O113:H21	-	+
HUSEC028	03-06687	O128:H2	+	-
HUSEC030	05-03519	O98:H ⁻	+	+
HUSEC031	7792/96	OR:H ⁻	+	+
HUSEC032	2441/98	O136:Hnt	+	-
HUSEC033	4392/97	O145:H25	+	-
HUSEC034	3332/99	O91:H21	+	-
HUSEC035	1529/98	O121:H19	+	-
HUSEC036	2839/98	O145:H ⁻	+	+
HUSEC039	3651/96	O76:H19	+	-
HUSEC042	820/08	O165:H25	+	+

3.2. Phylogenie der einzelnen Gene

Die ungewichteten phylogenetischen Bäume, erstellt mit der maximum likelihood Prozedur durch PhyML, sind in Abbildung 1-2 dargestellt. Um die statistische Relevanz der einzelnen Verästelungen beurteilen zu können, sind die jeweiligen bootstrap-Werte vermerkt. Die phylogenetische Ähnlichkeit zweier Stämme ist über die Entfernung entlang der Äste repräsentiert. Die horizontalen Marker zeigen die Entfernungen an, die für die jeweiligen Veränderungen pro Nukleotid stehen.

Obwohl die jeweiligen Genabschnitte ein heterogenes Bild liefern zeigen sich jeweils Stämme, die sich in homologe Gruppen einordnen und somit eine erhöhte Ähnlichkeit aufweisen.

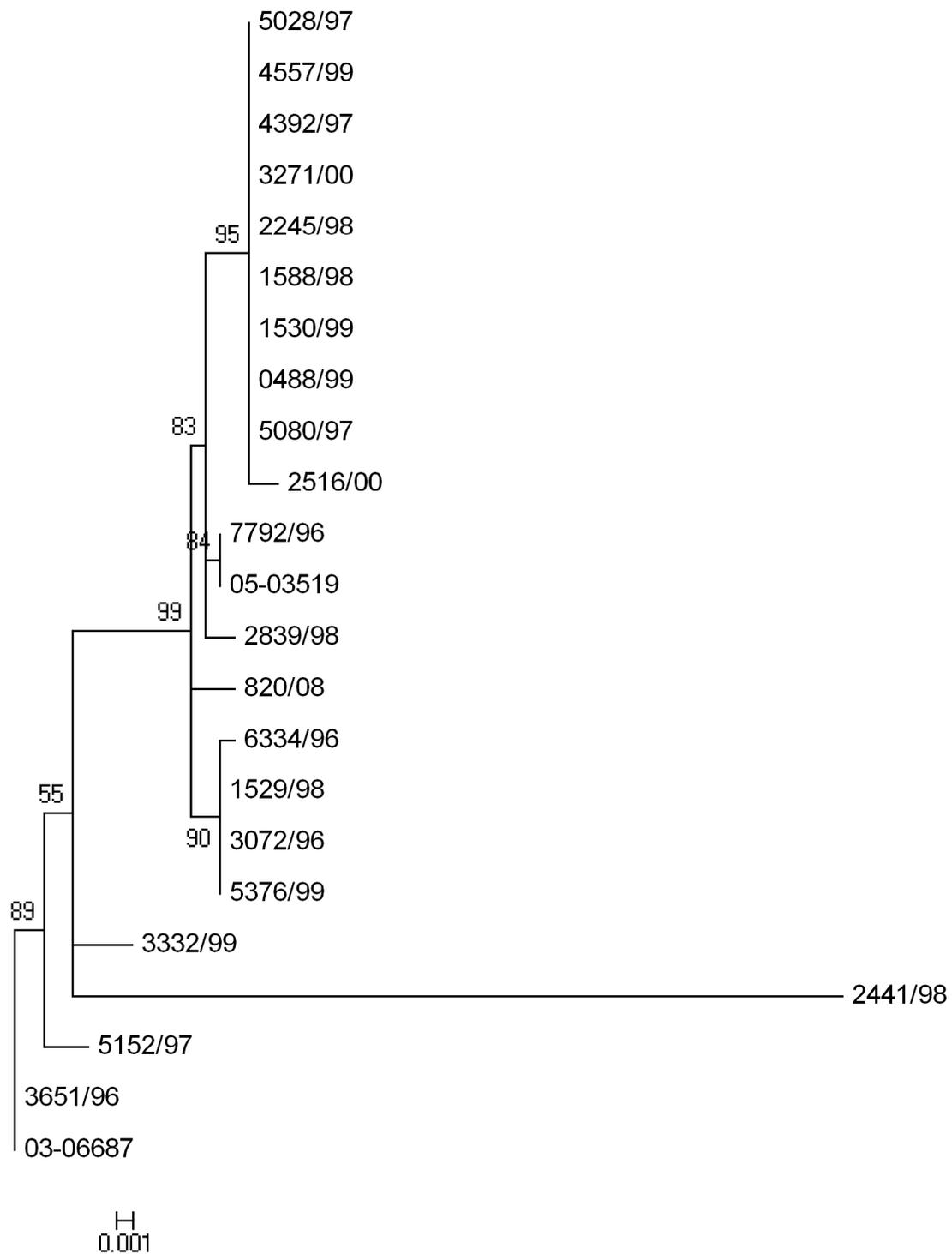


Abbildung 1: ungewichteter Phylogenetischer Baum aller EHEC-*hlyA*-positiven HUSEC Stämme basierend auf der konkatenierten Sequenz (1139 bp) von zwei EHEC-*hlyA*-Abschnitten

Die Darstellung der Verwandtschaft der EHEC-*hlyA*-positiven Stämme lässt eine sehr große homogene Gruppen erkennen in der sich die Stämme teilweise weiter in kleineren Untergruppen formieren, sowie fünf weitere einzelne Stämme, die sich von der großen Gruppe unterscheiden.

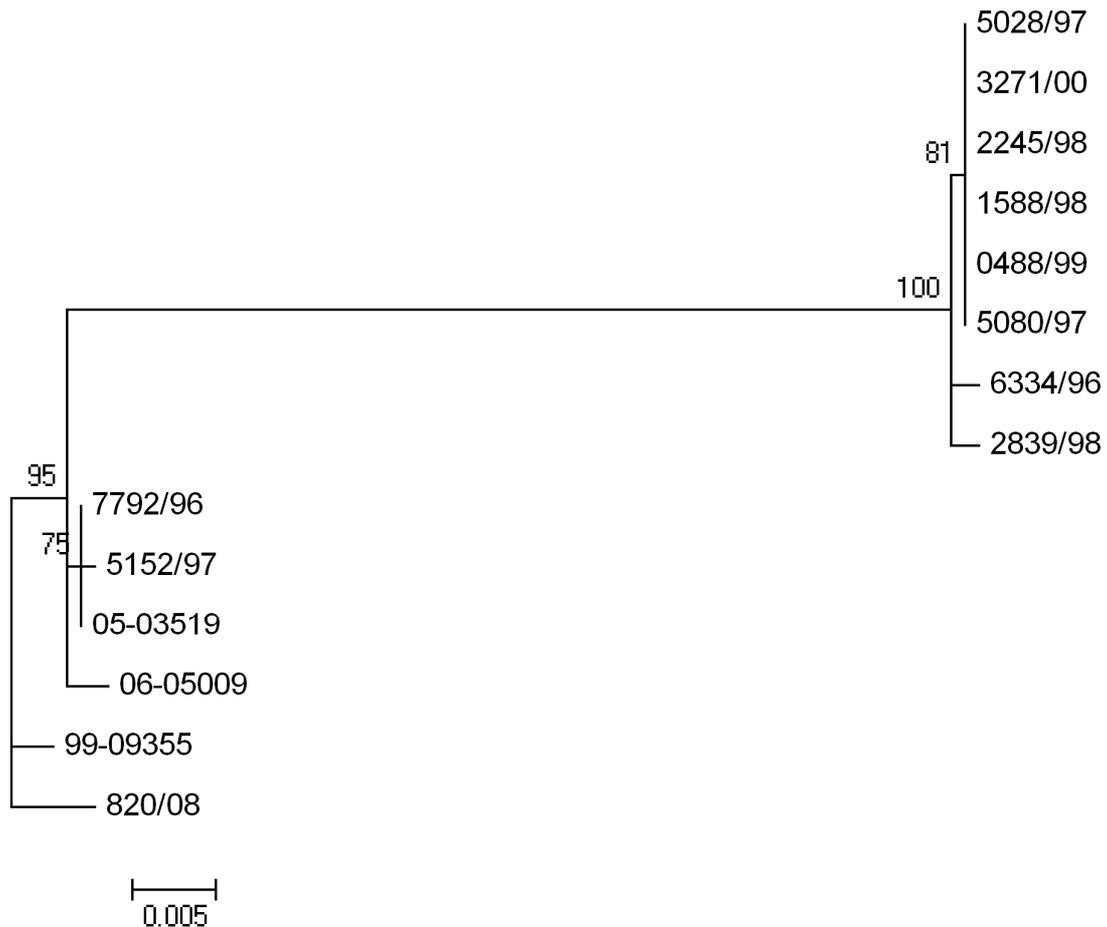


Abbildung 2: ungewichteter Phylogenetischer Baum aller *espP*-positiven HUSEC Stämme basierend auf der konkatenierten Sequenz (1212 bp) von zwei *espP*-Abschnitten

Die Darstellung der Verwandtschaft der *espP*-positiven Stämme lässt eine große homogene Untergruppen erkennen sowie sechs davon unterschiedliche Stämme, von denen vier jedoch eine erhöhte Homogenität aufweisen.

Des Weiteren zeigten die Rekombinationsanalysen der jeweiligen Gensequenzen keine signifikanten Rekombinationsereignisse. Einzige Ausnahme bildet die *espP*-Sequenz des Stammes 06-05009, dessen Ursprung in den beiden Stämmen 820/08 und 2839/98 liegen könnte, dies lässt sich jedoch anhand der Rekombinationsanalyse nicht sicher bestätigen oder ausschließen, da auch eine Missidentifikation möglich ist und der Stamm 2839/98 rekombinant sein könnte.

3.3. Vergleich der phylogenetischen Bäume

Der Vergleich der phylogenetischen Bäume wurde mit CopyCat durchgeführt. Das Programm berechnete die Übereinstimmung zweier Bäume sowie den Einfluss einzelner Stämme auf die Gesamtstruktur.

Die Vergleiche von MLST und *espP* bzw. EHEC-*hlyA* weisen keine signifikante Kongruenz auf, sondern lediglich einen p-Wert von 0,06507 für EHEC-*hlyA* und einen p-Wert von 0,11311 für *espP*. Bei der Überprüfung des Einflusses einzelner Stämme auf die Gesamtstruktur zeigt einzig beim Vergleich von MLST und *espP* der Stamm 6334/96 eine signifikante Stammassoziation.

Die graphische Gegenüberstellung der Topologie der phylogenetischen Bäume ist in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

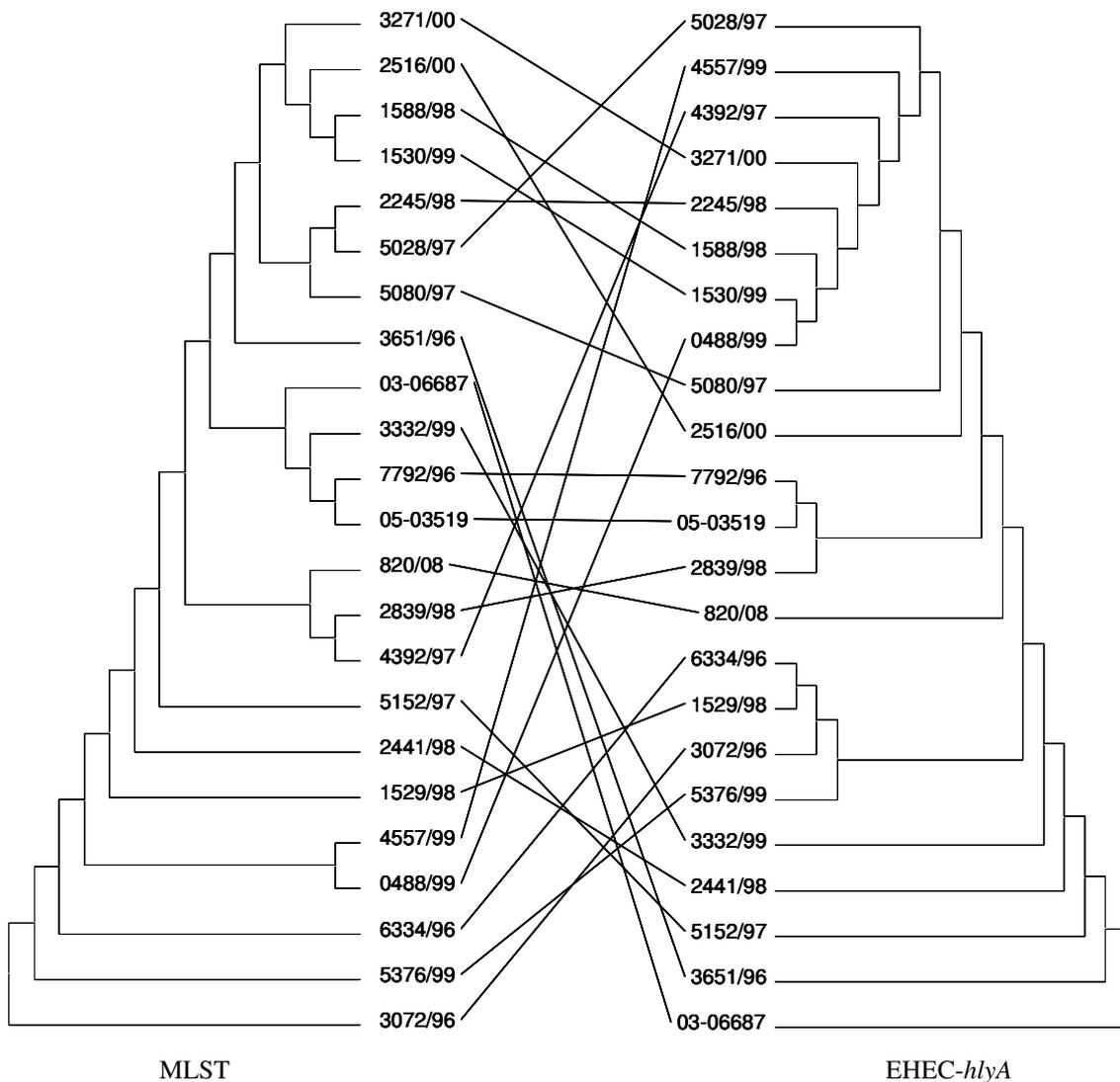


Abbildung 3: Tanglegram basierend auf der Topologie der phylogenetischen Bäume der konkatenierten MLST-Genabschnitte sowie der konkatenierten EHEC-*hlyA*-Abschnitte zur Illustration der Assoziation der einzelnen Stämme auf ihren unterschiedlichen Genen. Zusammengehörige Stämme sind miteinander verbunden.

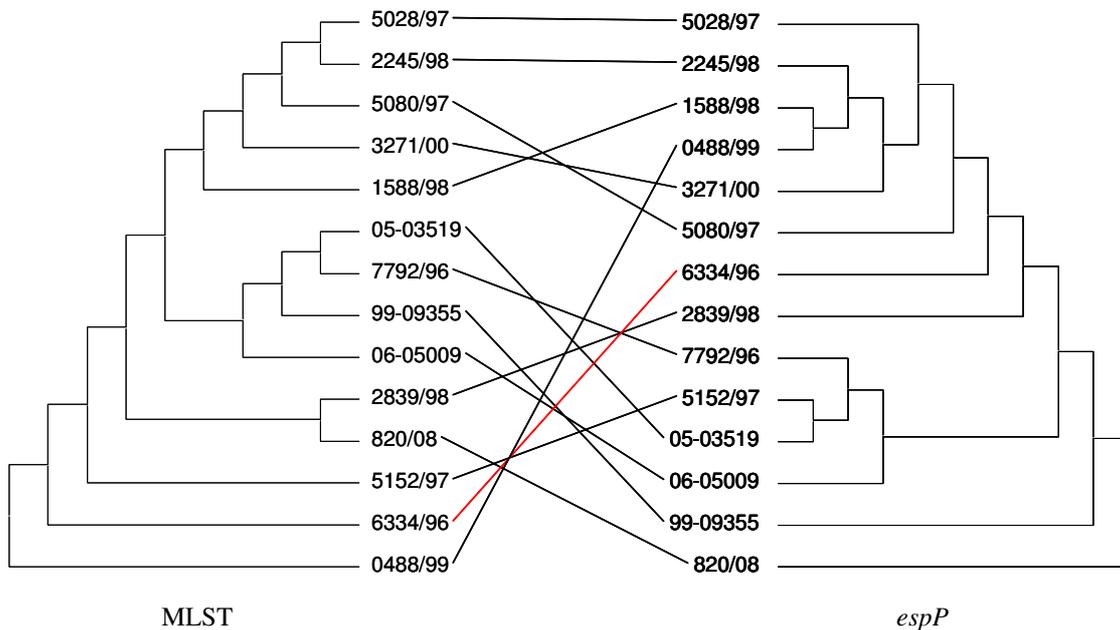


Abbildung 4: Tanglegram basierend auf der Topologie der phylogenetischen Bäume der konkatenierten MLST-Genabschnitte sowie der konkatenierten *espP*-Abschnitte zur Illustration der Assoziation der einzelnen Stämme auf ihren unterschiedlichen Genen. Zusammengehörige Stämme sind miteinander verbunden und Verbindungen mit einer signifikanten Stammassoziation sind rot markiert.

Anhand der Berechnungen weist somit die Gesamtstruktur der chromosomalen gegenüber den plasmidalen Genabschnitten keine signifikante Übereinstimmung auf.

4. Diskussion

Seit der Entdeckung der Assoziation zwischen dem Auftreten von HUS und der Infektion mit Shiga Toxin produzierenden *E. coli* durch Karmali et al. wurden eine hohe Anzahl HUS-induzierender Serovare ausfindig gemacht, die von einer großen Vielfalt und einem stetigen Wandel durch Rekombination zeugen (10). Obwohl das Stx eine Schlüsselfunktion unter den Virulenzfaktoren einnimmt, scheinen weitere Faktoren wie z. B. die plasmidkodierte Gene *espP* und EHEC-*hlyA* eine hohe Relevanz für die Virulenz von HUSEC-Stämmen zu haben. Insbesondere mobile Genelemente wie die Plasmide sind starken Veränderungen unterworfen wie z. B. durch horizontalen Gentransfer, dem eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Pathogenität zukommt, da krankheitserregende Faktoren in einem einzigen Integrationsschritt übertragen werden können (17).

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem repräsentativen HUSEC-Kollektiv untersucht, in welchem Verhältnis sich das Plasmid und das Chromosom zueinander entwickelt haben. Nach dem Nachweis von *espP* und EHEC-*hlyA* wurden die Sequenzen der positiven Stämme sowie chromosomale MLST-Gensequenzen auf ihre Phylogenie untersucht, um einen Vergleich der Entwicklung durchzuführen.

Hierbei zeigte sich, dass sich die plasmidalen Gene unterschiedlich von den chromosomalen Genen entwickelt haben, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Plasmide sich nicht konstant jeweils in einem Bakterienstamm befunden haben, sondern im Laufe der Evolution zwischen verschiedenen Bakterienstämmen gewechselt oder sich ausgetauscht haben.

Im Vergleich zu den 55% EHEC-*hlyA*-positiven HUSEC-Stämmen, zeigte eine Studie von Stephan et. al., nach einem Screening von 5590 Stuhlproben asymptomatischer Schweizer Angestellter aus der Fleischindustrie, in den 47 gefundenen STEC-Isolaten zu 38,3% einen positiven EHEC-*hlyA* Nachweis (43). Eine Studie von Slanec et al. zeigt in einem Kollektiv von 75 STEC-Isolaten aus Fleischprodukten und Wasser eine EHEC-*hlyA* Prävalenz von 40% (41). Eine Studie von Cookson et al. zeigte in einem Kollektiv von 38 *stx*-positiven und *eae*-positiven Isolaten von Mensch und Vieh eine Prävalenz von 100%, und von 117 Isolaten, die nur *stx*-positive aber *eae*-negativ waren, von 51,8% (11). In dem HUSEC-Kollektiv hingegen zeigte sich bei den *eae*-positiven Isolaten 65,4% EHEC-*hlyA* positiv, und bei den *eae*-negativen Isolaten nur 37,5% EHEC-*hlyA* positiv.

Im Vergleich zu den 33% *espP*-positiven HUSEC-Stämmen, zeigte eine Studie von Brockmeyer et al. in einem Kollektiv von 575 klinischen STEC Isolaten in 63,6% der Fälle das Vorhandensein von *espP*, darunter in 100% aller 81 Stämme des Serotyps O157:H7 (5). Eine Studie von Khan et al. zeigte in einem Kollektiv von 214 Isolaten von Menschen und aus der Umwelt eine Prävalenz von 57%, darunter zu 96% aller 68 Stämme mit dem Serotyp O157:H7, wohingegen nur 58% aller non-157 Isolate *espP*-positiv waren, und nur bei 5 von 12 (=42%) klinischen HUS-Isolaten (24). Die zuvor erwähnte Schweizer Studie von Stephan et al. zeigte in den 47 STEC-Isolaten symptomfreier Angestellter nur eine Prävalenz von 6,4% (43).

Die Diskrepanzen zu den in dieser Arbeit ermittelten Prozentsätzen der EHEC-*hlyA*-positiven und *espP*-positiven Stämme lassen sich unter anderem damit erklären, dass sich die HUSEC-Stammsammlung nicht aus unselektierten klinischen Isolaten zusammensetzt, sondern geschaffen wurde um ein großes Spektrum der unterschiedlicher, mit HUS-assoziierten Serotypen zu repräsentieren. Somit kann es in allen Studien zu Verzerrungen aufgrund der Probenauswahl kommen, die den Vergleich untereinander erschweren.

Für die Pathogenität der HUSEC-Stämme lässt sich somit zusammenfassen,

dass durch die hohe Prävalenz, sowohl von EHEC-*hlyA* als auch von *espP*, beide Gene von hoher Relevanz zu sein scheinen, jedoch nicht alleine für die Pathogenese verantwortlich sind.

Die phylogenetischen Bäume der einzelnen Gene zeigen ein sehr unterschiedliches Bild. Die Rekombinationsanalyse zeigte jedoch keine nennenswerten Rekombinationsereignisse.

Der phylogenetische Baum von EHEC-*hlyA* lässt eine sehr große Gruppe erkennen, die sich weiter in homogene Untergruppen teilt, sowie einige sich davon unterscheidende einzelne Stämme. Die große homogene Gruppe setzt sich vorwiegend aus O145-, O26- und O157-Stämmen sowie vereinzelt anderen Serotypen zusammen. Die heterogeneren Stämme außerhalb dieser Gruppe setzen sich aus verschiedenen einzelnen Serotypen zusammen.

Eine Studie von Boerlin et al. zeigte bei der Analyse von *eae*-positiven sowie *eae*-negativen STEC eine Aufteilung in der Phylogenie von EHEC-*hlyA* zwei klar getrennte Gruppen je nachdem ob *eae* vorhanden war (3). In einer Studie teilte Cookson et al. die EHEC-*hlyA*-positiven STEC oder atypischen EPEC Stämme in die Subtypen A-F ein, wobei er auch nachwies, dass fast 100% der *stx*-positiven und *eae*-positiven Stämme Subtyp A zeigten, sowie bis auf wenige Ausnahmen die *stx*-positiven und *eae*-negativen Stämme Subtyp C, ebenso wie die *stx*-negativen und *eae*-positiven atypischen EPEC Stämme die alle Subtyp C aufwiesen. Auch in dem HUSEC-Kollektiv besteht mit einer einzigen Ausnahme die homogenere Gruppe aus *eae*-positiven Stämmen, die davon abweichende Stämme jedoch vollständig aus *eae*-negativen.

Die Phylogenie von *espP* lässt eine Aufteilung der Stämme in eine große Gruppe erkennen, sowie sechs davon unterschiedliche Stämme. Die große homogene Gruppe setzt sich dabei vorwiegend aus O26-Stämmen sowie O145- und O157-Stämmen zusammen. Die heterogeneren Stämme außerhalb dieser Gruppe setzen sich aus verschiedenen einzelnen Serotypen zusammen. Diese Genvariation lässt sich auch mit den Untersuchungen von Brockmeyer et al. vereinbaren, der vier Untergruppen beschreibt. Davon zeigen sowohl *espP* α ,

das insbesondere in den O157:H7 und den bedeutenden non-O157 EHEC-Serotypen Stämmen zu finden ist und EspP exprimiert, als auch das *espP γ* , pathogenetische Relevanz. Zwei weitere Gengruppen, das *espP β* und das *espP δ* , waren inaktiv bzw. sekretierten nicht aktives EspP. Insbesondere das *espP α* scheint somit an der Pathogenese von HUS oder hämorrhagischer Colitis beteiligt zu sein (5). Das bestätigt sich auch in einer Studie von Khan et al. der in HUS induzierenden Stämmen nur *espP α* und nicht *espP β* und *espP δ* nachgewiesen hat (24).

Zudem zeigte sich in dem HUSEC-Kollektiv, dass die große homogene Gruppe ausnahmslos aus *eae*-positiven Stämmen zusammengesetzt ist, die anderen sechs Stämme jedoch nur aus zwei *eae*-positiven sowie vier *eae*-negativen Stämmen.

Somit lassen sich diese Ergebnisse dieser Studie mit den vorangegangenen Arbeiten vereinbaren. Jedoch muss insbesondere die Einteilung der *E. coli* Stämme nach dem Vorhandensein von verschiedenen Genen mit Vorbehalt betrachtet werden, da Mellmann et al. an *E. coli* Isolaten von HUS Patienten nachgewiesen haben, dass es auch im Laufe einer Erkrankung zu genomischen Umstrukturierungen kommen kann. So wurde an den Isolaten von 210 Stuhlproben an HUS erkrankter Patienten zu Beginn in 96,6% der Fälle *stx* nachgewiesen, jedoch wenige Tage später nur noch in 52% der Fälle (31).

Der Vergleich der phylogenetischen Bäume mittels CopyCat ergab, dass weder die Struktur der plasmidalen Sequenzen gegenüber den chromosomalen Sequenzen signifikanten Übereinstimmungen aufwies, noch die Auswertung der einzelnen Stammassoziationen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich das Plasmid im Laufe der Evolution zwischen den Stämmen ausgetauscht hat und sich nicht konstant mit dem jeweiligen Stamm weiterentwickelt hat.

Auch eine Studie von Boyd et. al. legt nahe, dass Rekombinationen plasmidaler Genen zwischen verschiedenen Plasmiden mit einer weit häufigeren Frequenz vorkommen als unter chromosomalen Genen (4).

Im Vergleich dazu wurde in einer Studie von Boerlin et. al. untersucht, wie sich EHEC-*hlyA* in einem Kollektiv aus 27 *eae*-positiven und *eae*-negativen STEC sowie einem EPEC-Stamm unterscheidet. Dabei kamen sie bei Untersuchungen mittels Hybridisierungstechnik zu dem Ergebnis, dass EHEC-*hlyA* sich in einer Reihe von Serotypen als hoch konserviert zeigt, und dass *eae*-positive STEC EHEC-*hlyA* einer Evolutionsreihe besitzen und somit in letzter Zeit nicht horizontal transferiert wurden, ein Phänomen, das bei den *eae*-negativen STEC nicht gefunden wurde (3). Als möglicher Grund für den Befund in den *eae*-positiven STEC wird eine Studie von Hales et. al. beschrieben, die in einem Kollektiv von größtenteils *eae*-positiven STEC nachgewiesen haben, dass das EHEC-*hlyA*-Plasmid in der Vergangenheit transferierbar war, nun jedoch teilweise nicht mehr transferierbar ist (18).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Untersuchungen von Brunder et. al, dass das Plasmid pO157 nicht aus uniformen genetischen Elementen besteht, sondern heterogen sowohl in seiner Anordnung als auch in seiner Zusammensetzung ist. Darüber hinaus widersprachen sie der These von Boerlin et. al. und postulierten, dass auch das Plasmid der *eae*-positiven STEC-Stämme variiere (7).

In einer neueren Studie von Brunder et. al. wurde das Plasmid pSFO157 eines Sorbit-fermentierenden *E. coli* O157:H⁻ sequenziert (8) und zudem mit dem von Burland et. al. sequenzierten Plasmid pO157 (9) verglichen. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass das Plasmid pO157 einen komplexen evolutionären Ursprung habe und es wurde die Vermutung angestellt, dass beide Plasmide einen gemeinsamen Vorfahren haben (8).

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse in dieser Arbeit mit anderen Studien vereinbaren. Nichtsdestotrotz ist zu beachten, dass alle Ergebnisse auf der Auswahl eines Evolutionsmodells sowie mathematischen Methoden basieren, die gewisse Annahmen voraussetzen und nicht unbedingt die Realität vollständig widerspiegeln können.

Doch durch neue Technologien wird in Zukunft die Plasmidsequenzierung

leichter möglich sein. So hat Künne et. al. bereits den O104:H4 Stamm HUSEC41 komplett sequenziert (25). In einer anderen Studie sequenzierten Ogura et. al. die drei klinisch bedeutenden nicht O157 *E. coli* Stämme O26:H11, O111:H⁻ und O103:H2 und verglichen die Genome dann mit anderen bereits sequenzierten *E. coli* und *Shigella* Stämmen. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass sich *E. coli* Stämme, die zu verschiedenen phylogenetischen Reihen gehören, unabhängig von einander zu EHECs entwickeln können (35).

Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass sich in dem HUSEC Kollektiv die chromosomalen Gene unabhängig von den plasmidalen Genen entwickelt haben.

In weiteren Studien gilt es somit zu untersuchen, inwiefern sich diese Ergebnisse auf andere *E. coli* Populationen übertragen lassen und ob sich weitere Beweise zur Stützung dieser These finden lassen.

5. Literaturverzeichnis

- (1) **Bauer ME, Welch RA** (1996) Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect.Immun.* 64 (1): 167-175
- (2) **Bielaszewska M, Dobrindt U, Gartner J, Gallitz I, Hacker J, Karch H, et al.** (2007) Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. *Int.J.Med.Microbiol.* 297 (7-8): 625-639
- (3) **Boerlin P, Chen S, Colbourne JK, Johnson R, De Grandis S, Gyles C** (1998) Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect.Immun.* 66 (6): 2553-2561
- (4) **Boyd EF, Hill CW, Rich SM, Hartl DL** (1996) Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. *Genetics* 143 (3): 1091-1100
- (5) **Brockmeyer J, Bielaszewska M, Fruth A, Bonn ML, Mellmann A, Humpf HU, et al.** (2007) Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl.Environ.Microbiol.* 73 (20): 6351-6359
- (6) **Brunder W, Schmidt H, Karch H** (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol.Microbiol.* 24 (4): 767-778
- (7) **Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H** (1999) The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 145 (Pt 5): 1005-1014

- (8) **Brunder W, Karch H, Schmidt H** (2006) Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- strain 3072/96. *Int.J.Med.Microbiol.* 296 (7): 467-474
- (9) **Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR** (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* 26 (18): 4196-4204
- (10) **Cleary TG** (2004) The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Semin.Pediatr.Infect.Dis.* 15 (4): 260-265
- (11) **Cookson AL, Bennett J, Thomson-Carter F, Attwood GT** (2007) Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* 73 (20): 6360-6369
- (12) **Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, Schaben C, Crielly AS, Gage R, et al.** (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N.Engl.J.Med.* 347 (8): 555-560
- (13) **Dobrindt U** (2005) (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int.J.Med.Microbiol.* 295 (6-7): 357-371
- (14) **Dugan KA, Lawrence HS, Hares DR, Fisher CL, Budowle B** (2002) An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *J.Forensic Sci.* 47 (4): 811-818
- (15) **Gerber A, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB** (2002) Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J.Infect.Dis.* 186 (4): 493-500

- (16) **Gyles CL** (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J.Anim.Sci. 85 (13 Suppl): E45-62
- (17) **Hacker J, Hentschel U, Dobrindt U** (2003) Prokaryotic chromosomes and disease. Science 301 (5634): 790-793
- (18) **Hales BA, Hart CA, Batt RM, Saunders JR** (1992) The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. Plasmid 28 (3): 183-193
- (19) **Hussein HS, Sakuma T** (2005) Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. J.Dairy Sci. 88 (2): 450-465
- (20) **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nat.Rev.Microbiol. 2 (2): 123-140
- (21) **Karch H, Friedrich AW, Gerber A, Zimmerhackl LB, Schmidt MA, Bielaszewska M** (2006) New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. Semin.Thromb.Hemost. 32 (2): 105-112
- (22) **Karch H, Mellmann A, Bielaszewska M** (2009) Epidemiology and pathogenesis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Berl.Munch.Tierarztl.Wochenschr. 122 (11-12): 417-424
- (23) **Karmali MA** (2004) Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. Mol.Biotechnol. 26 (2): 117-122
- (24) **Khan AB, Naim A, Orth D, Grif K, Mohsin M, Prager R, et al.** (2009) Serine protease *espP* subtype alpha, but not beta or gamma, of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is associated with highly pathogenic serogroups. Int.J.Med.Microbiol. 299 (4): 247-254

- (25) **Kunne C, Billion A, Mshana SE, Schmiedel J, Domann E, Hossain H, et al.** (2012) Complete sequences of plasmids from the hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* strain HUSEC41. *J.Bacteriol.* 194 (2): 532-533
- (26) **Legendre P, Desdevises Y, Bazin E** (2002) A statistical test for host-parasite coevolution. *Syst.Biol.* 51 (2): 217-234
- (27) **Lim JY, Yoon J, Hovde CJ** (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J.Microbiol.Biotechnol.* 20 (1): 5-14
- (28) **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95 (6): 3140-3145
- (29) **Martin DP, Williamson C, Posada D** (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21 (2): 260-262
- (30) **Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Huson DH, Goker M** (2007) COPYCAT: cophylogenetic analysis tool. *Bioinformatics* 23 (7): 898-900
- (31) **Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerhackl LB, Prager R, Harmsen D, Tschape H, et al.** (2005) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. *Clin.Infect.Dis.* 41 (6): 785-792
- (32) **Mellmann A, Bielaszewska M, Kock R, Friedrich AW, Fruth A, Middendorf B, et al.** (2008) Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg.Infect.Dis.* 14 (8): 1287-1290
- (33) **Nataro JP, Kaper JB** (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* 11 (1): 142-201

- (34) **O'Brien SJ, Adak GK, Gilham C** (2001) Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg.Infect.Dis.* 7 (6): 1049-1051
- (35) **Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, et al.** (2009) Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106 (42): 17939-17944
- (36) **Schmidt H, Karch H, 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 (2): 189-196
- (37) **Schmidt H, Beutin L, Karch H** (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect.Immun.* 63 (3): 1055-1061
- (38) **Schmidt H, Maier E, Karch H, Benz R** (1996) Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur.J.Biochem.* 241 (2): 594-601
- (39) **Schubert S, Darlu P, Clermont O, Wieser A, Magistro G, Hoffmann C, et al.** (2009) Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species. *PLoS Pathog.* 5 (1): e1000257
- (40) **Siegler R, Oakes R** (2005) Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr.Opin.Pediatr.* 17 (2): 200-204
- (41) **Slanec T, Fruth A, Creuzburg K, Schmidt H** (2009) Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl.Envirn.Microbiol.* 75 (19): 6187-6197

- (42) **Stamatakis A, Auch AF, Meier-Kolthoff J, Goker M** (2007) AxPcoords & parallel AxParafit: statistical co-phylogenetic analyses on thousands of taxa. BMC Bioinformatics 8: 405
- (43) **Stephan R, Ragetti S, Untermann F** (2000) Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. J.Appl.Microbiol. 88 (2): 335-341
- (44) **Tzipori S, Karch H, Wachsmuth KI, Robins-Browne RM, O'Brien AD, Lior H, et al.** (1987) Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. Infect.Immun. 55 (12): 3117-3125
- (45) **Vernozy-Rozand C** (1997) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. J.Appl.Microbiol. 82 (5): 537-551
- (46) **Williams DM, Sreedhar SS, Mickell JJ, Chan JC** (2002) Acute kidney failure: a pediatric experience over 20 years. Arch.Pediatr.Adolesc.Med. 156 (9): 893-900
- (47) **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al.** (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol.Microbiol. 60 (5): 1136-1151
- (48) **Yu J, Kaper JB** (1992) Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol.Microbiol. 6 (3): 411-417

6. Lebenslauf

7. Danksagung