

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

**Phäno- und genotypische Charakterisierung
extraintestinal pathogener *E.coli* Stämme**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Maura-Maria Fuchs
aus Ellwangen

Würzburg, November 2006

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Reidl

Dekan: Prof. Dr.med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	1
1. Extraintestinal pathogene <i>E. coli</i> (ExPEC)	1
2. Epidemiologie, Einteilung und Klinik von bakteriellen Harnwegsinfektionen	1
3. Infektionsweg und Erregerspektrum	2
4. Pathogenitätsfaktoren uropathogener <i>E. coli</i>	3
4.1. Adhäsine	4
4.2. Toxine	9
4.3. Kapseln	11
4.4. Eisenaufnahmesysteme	12
4.5. O-Antigene	13
4.6. Andere Pathogenitätsfaktoren	14
5. Der Aufbau des <i>E. coli</i> Genoms und dessen Plastizität	14
5.1. Die Evolution der <i>Enterobacteriaceae</i>	14
5.2. Der konservierte und flexible Teil des <i>E. coli</i> Genoms	15
5.3. Genomvergleich verschiedener <i>E. coli</i>	16
5.4. DNA-Array-Technologie	18
5.5. Pathogenitätsinseln (PAIs)	19
6. Ziele der Arbeit	21
II. Material	22
1. Geräte	22
2. Chemikalien	23
3. Nähr- und Selektivmedien	23
3.1. LB-Agarplatten	23
3.2. LB-Flüssigmedium	24

3.3. Schwärm-Agarplatten	24
3.4. Kongorot-Agarplatten	24
3.5. Mac. Conkey-Agarplatten	24
3.6. Blutagarplatten	24
4. Bakterienstämme	25
5. Puffer für die verschiedenen Gelelektrophoresen	26
5.1. TAE-Puffer für Agarosegelelektrophorese	26
5.2. TBE-Puffer für Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	26
5.3. TE-Puffer zur Aufbewahrung der Blöckchen der PFGE.....	26
5.4. NEB-Vorpuffer für PFGE	27
5.5. NDS-Puffer für PFGE	27
5.6. SE-Puffer für PFGE	27
5.7. LGT-Agarosepuffer zur Herstellung der Blöckchen (PFGE)	27
5.8. Stop-Puffer	27
6. Enzyme	28
7. Molekulargewichts- und Größenstandards	29
8. Primerpaare und Anfangssequenzen	30
III. Methoden	32
1. Stammhaltung und Anzucht der Bakterien	32
2. Phänotypische Tests	32
2.1. Prüfung der Motilität auf Schwärmagarplatten.....	32
2.2. Hämolysetest.....	32
2.3. Fimbrienadhäsine	33
2.3.1. Typ 1-Fimbrienadhäsine	33
2.3.2. P-Fimbrienadhäsine	33
2.3.3. S-Fimbrienadhäsine	33
2.4. Curli-Adhäsine	34

3. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Virulenzfaktoren extraintestinaler pathogener <i>E. coli</i> (modifiziert nach Johnson und Stell, 2000)	34
4. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese	36
5. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	36
5.1. Herstellung der Blöckchen.....	37
5.2. Spaltung der Bakterien-DNA in den Agaroseblöckchen	38
5.3. PFGE	38
6. Hybridisierung von Gene Arrays mit (³³ P)-markierten Sonden	39
6.1. Isolierung chromosomaler DNA.....	39
6.2. Vorhybridisierung der DNA-Arrays	40
6.3. Markierung der DNA-Sonden	40
6.4. Abtrennung von uninkorporiertem (³³ P)-markiertem dATP von der markierten Sonde	41
6.5. Waschen der Arrays und Exposition der Phosphorimagerscreens.....	41
6.6. Benötigte Lösungen.....	42
IV. Ergebnisse	44
1. Ausschluss von Mischkulturen unter den untersuchten Isolaten, die mögliche Genomveränderungen im Verlauf der chronischen Harnwegsinfektion aufweisen	44
2. Phänotypische Tests der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	44
3. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zum Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	45
4. PFGE I	48
5. Phänotypische Tests weiterer uropathogener Stämme und Fäkalisolate der ECOR-Gruppe B2	49

6. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zum Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren der übrigen uropathogenen Stämme und ECOR B2-Isolate	51
7. PFGE II.....	55
8. Ausstattung der Stämme mit Pathogenitätsfaktoren und Vergleich mittels Pathoarray	56
8.1. Vergleich der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	56
8.2. Nachweis von Virulenz-oder PAI-assoziierten Genen bei den übrigen uropathogenen Stämmen und ECOR B2-Isolaten 42, 58, 70, DSM6601, 7117 sowie deren Kongorot- negativen Mutanten	57
8.3. Vergleich des <i>E. coli</i> Stammes 536 und seiner ahämolytischen Mutanten.....	58
8.4. Nachweis des α -Hämolysingenclusters bei verschiedenen <i>E. coli</i> Isolaten.....	59
8.5. Grafische Darstellung der mit dem Pathoarray in den untersuchten Stämme nachgewiesenen Virulenz- und PAI-assoziierten Genen	60
9. Nicht nachweisbare Genomteile der untersuchten Stämme gegenüber dem <i>E. coli</i> K-12 Stamm MG1655	61
V. Diskussion.....	64
1. Vergleich der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	65
1.1. Vergleich von UPEC Isolate zweier Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen, die zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden.....	65
2. Analyse des Genomgehaltes der Stämme DSM6601 und 7117 und ihrer Kongorot-negativen Mutanten.....	70
3. Vergleich der Genomgehalte von UPEC Stämme, bei denen unter Antibiotikaeinfluss die Bildung von L-Formen beobachtet wurde.....	73
4. Vergleich des Genomgehaltes der Stämme 536, 764 und 768 und ihrer ahämolytischen Mutanten.....	74

VI. Zusammenfassung..... 80

VII. Literaturverzeichnis..... 81

VIII. Anhang.....

1. Abkürzungen

2. Virulenzfaktoren des Pathoarray

3. Genomvergleich mit dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655

Danksagung

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Charakteristika typischer Erreger von Harnwegsinfektionen	3
Tabelle 2:	Verschiedene Bindungsstellen der P-Fimbrien Unterklassen	6
Tabelle 3:	Verschiedene Adhärenzstrukturen uropathogener <i>E. coli</i>	9
Tabelle 4:	Zusammensetzung des flexiblen Teils des <i>E. coli</i> Genoms.....	16
Tabelle 5:	Mechanismen der Genomveränderung	17
Tabelle 6:	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme	25
Tabelle 7:	Weitere verwendete Bakterienstämme	25
Tabelle 8:	In dieser Arbeit verwendete Enzyme	28
Tabelle 9:	Verwendete Molekulargewichts- und Größenstandards	29
Tabelle 10:	In dieser Arbeit verwendete Primer	30
Tabelle 11:	Reaktionsansatz der Multiplex-PCR	35
Tabelle 12:	Restriktionsansätze für PFGE	38
Tabelle 13:	Programme der PFGE	39
Tabelle 14:	Phänotypische Testergebnisse der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	44
Tabelle 15:	Multiplex-PCR Muster der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	46
Tabelle 16:	Phänotypische Testergebnisse der übrigen untersuchten Stämme.....	50
Tabelle 17:	Multiplex-PCR Muster der untersuchten Isolate	52
Tabelle 18:	Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen	57
Tabelle 19:	Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der übrigen uropathogenen Isolate und Stämme der ECOR Gruppe B2	58
Tabelle 20:	Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der ahämolytischen Mutanten des Stammes 536 und des Wildtyps	58
Tabelle 21:	Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der ahämolytischen Isolate der ECOR-Gruppe B2 Stämme 764 und 768 .	59
Tabelle 22:	Pathoarray-basierter Nachweis des <i>hlyCABD</i> -Genclusters bei verschiedenen Isolaten.....	60
Tabelle 23:	Fehlende Genomteile der untersuchten Stämme gegenüber dem <i>E. coli</i> K-12 Stamm MG1655 und soweit bekannte Funktion.....	62

Abbildung 1:	<i>pap</i> -Gencluster (~ 9,7 kb)	5
Abbildung 2:	Bandenmuster der Pool 2-spezifischen Multiplex-PCR.....	47
Abbildung 3:	Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR.....	48
Abbildung 4:	Analyse I des PFGE-Bandenmuster der untersuchten Isolate nach dem Verdau mit <i>Xba I</i>	49
Abbildung 5:	Bandenmuster der Pool 1-spezifischen Multiplex-PCR I.....	53
Abbildung 6:	Bandenmuster der Pool 1-spezifischen Multiplex-PCR II.....	53
Abbildung 7:	Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR I.....	54
Abbildung 8:	Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR II.....	54
Abbildung 9:	Analyse II des PFGE-Bandenmuster der untersuchten Isolate nach dem Verdau mit <i>Xba I</i>	55
Abbildung 10:	Analyse III des PFGE-Bandenmuster der untersuchten Isolate nach dem Verdau mit <i>Xba I</i>	56
Abbildung 11:	Grafische Darstellung der mit dem Pathoarray in den untersuchten Stämmen nachgewiesenen Virulenz- und PAI-assoziierten Gene	61
Abbildung 12:	Die genetische Struktur des e14 Elementes bei <i>E. coli</i> K-12.	69
Abbildung 13:	Genanordnung des <i>mcr/C/D</i> Genclusters	70
Abbildung 14:	Typ I und II Deletion der PAI III des Stammes 536	78

I. Einleitung

1. Extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC)

Vertreter der Art *E. coli* sind sehr vielfältig. Neben den harmlosen Kommensalen, die den Hauptteil der normalen Darmflora ausmachen, sind sechs intestinale *E. coli* Pathotypen, die verschiedenste Infektionen verursachen, bekannt. Diese werden unterteilt in enterotoxische *E. coli* (ETEC), enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) und lösen alle verschiedene Formen von Gastroenteritis oder Kolitis aus. Daneben existiert die Gruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC), die neben Meningitis (MENEC) v. a. bei Neugeborenen und Septikämien (SEPEC), Harnwegsinfektionen auslösen. Die Stämme, die Harnwegsinfektionen auslösen, werden uropathogene *E. coli* (UPEC) genannt (Mühldorfer und Hacker, 1994; Russo und Johnson, 2000; Johnson und Russo, 2002).

2. Epidemiologie, Einteilung und Klinik von bakteriellen

Harnwegsinfektionen

Harnwegsinfektionen sind in den industrialisierten Ländern die häufigste bakterielle Infektionskrankheit. Frauen sind aufgrund ihrer anatomischen Gegebenheiten (kurze Urethra) häufiger betroffen als Männer (Merkle 1997). 20 % aller Frauen machen in ihrem Leben einmal eine Harnwegsinfektion durch, jedoch nur 12 % aller Männer (Foxman et al., 1995a; Warren, 1996). Insgesamt sind vor allem jüngere Frauen und ältere Männer betroffen. Man unterscheidet generell zwei Arten von Harnwegsinfektionen: unkomplizierte und komplizierte (Schaeffer, 1997). Unkomplizierte Harnwegsinfektionen kommen bei gesunden Menschen mit einem normalen Harntrakt und ohne systemische Erkrankungen, wie z. B. Granulozytopenie oder Diabetes mellitus, die zu Infektionen prädisponieren, vor. Sie werden in 80 % der Fälle durch uropathogene *E. coli* (UPEC) verursacht. Diese Infektionen sprechen normal gut auf eine Antibiotikatherapie an und ein erneutes Auftreten ist meist auf eine Reinfektion mit anderen Keimen zurückzuführen. Die unkomplizierten Harnwegsinfektionen werden nach dem Ausmaß der vorhandenen Symptome in die asymptomatische Bakteriurie, die Zystitis und die akute bakterielle Pyelonephritis unterteilt. Die Harnwegsinfektion, die sich relativ schnell bis zur Urosepsis als gefürchtete Komplikation ausweiten kann, wird außerdem als eine der häufigsten

nosokomialen Infekte angesehen (Warren, 1996). Bei der asymptomatischen Bakteriurie fehlen jegliche Symptome, obwohl Bakterien im Urin zu finden sind. Betroffen davon sind vor allem ältere Frauen (20 % der älteren Bevölkerung vs. 6 % der gesunden/beschwerdefreien Bevölkerung) (Warren, 1996). Die Zystitis, also die Infektion der Harnblasenschleimhaut, seltener der ganzen Blasenwand, stellt 95 % aller Harnwegsinfektionen dar und ist mit den Symptomen Dysurie, Pollakisurie, imperativem Harndrang, Tenesmen und manchmal auch suprapubischen Schmerzen assoziiert. Eine Pyelonephritis ist eine Infektion der Nieren(becke) mit klopfschmerzhaftem Nierenlager, schwerem Krankheitsgefühl, Fieber, Rückenschmerzen, Durstgefühl und manchmal zusätzlichen Symptomen der Zystitis. In Ausnahmefällen infolge schmerzreflektorischer Darmparalyse kann es zu Erbrechen und Obstipation kommen. In 30 % der Fälle werden Pyelonephritiden durch Bakteriämien kompliziert, die in eine Sepsis übergehen können. Obwohl der Begriff Pyelonephritis eine Infektion der Niere und des Nierenbeckens umfasst, sind bei 30 bis 50 % der Patienten nur Bakterien im unteren Harntrakt zu finden (Warren, 1996; Mühldorfer et al., 2001). Komplizierte Harnwegsinfektionen betreffen vor allem Patienten mit funktionell (z. B. Blasenentleerungsstörung, Steinbildung etc.) oder anatomisch (z. B. Stenosen, Harnröhrenklappen, vesikourethraler Reflux etc.) abnormen Harnwegen und Patienten mit einem geschwächten Immunsystem. Ferner entwickeln sich aus Infektionen mit multiresistenten Keimen oft komplizierte Harnwegsinfektionen. Komplizierte Harnwegsinfektionen weisen ein größeres Erregerspektrum auf. Die Antibiotikatherapie ist schwieriger und weniger effektiv und Rezidive können durch den gleichen Erreger hervorgerufen werden (Warren, 1996; Mühldorfer et al., 2001).

3. Infektionsweg und Erregerspektrum

Bei Harnwegsinfektionen handelt es sich mehrheitlich um aufsteigende Infektionen. Die Erreger stammen hierbei aus der Darmflora und ascendieren von der Periurethralzone über die Urethra in die Blase und von dort weiter über die Harnleiter in die Nieren. Seltener entstehen Harnwegsinfektionen auch hämatogen (Warren, 1996; Mühldorfer et al., 2001). Das Erregerreservoir der Darmflora setzt sich aus verschiedenen Bakterien zusammen: residenten Bakterien, die lange Zeit den Darm besiedeln und transienten, die sich nur kurze Zeit halten können (Herias et al., 1997; Mobley et al., 1994; Mühldorfer et al., 2001). Die wichtigsten Erreger fasst die Tabelle 1 zusammen.

Tab. 1: Charakteristika typischer Erreger von Harnwegsinfektionen. Die Gram-positiven Erreger sind grau unterlegt.

Bakterium	Charakteristik	Betroffene
<i>Escherichia coli</i>	Häufigster uropathogener Keim, verursacht 80 % der unkomplizierten Harnwegsinfektionen und 30 bis 40 % der komplizierten (akute und chronische Pyelonephritis, terminale Niereninsuffizienz und Sepsis)	V. a. gesunde Personen mit normalem Harntrakt und ohne systemische Grunderkrankung, die zu bakteriellen Infektionen prädisponiert, auch bei Patienten mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen anzutreffen
<i>Proteus mirabilis</i>	Häufigster Grund für infekt-induzierte Nieren- und Blasensteine	Häufig bei Personen mit funktionellen oder anatomischen Anomalien der Harnwege
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Oft multiresistente Stämme	Oft bei Patienten mit Diabetes mellitus oder Obstruktionen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Auslöser nosokomialer Infektionen
<i>Enterococcus faecalis</i>	In ungefähr 8 % der Fälle mit Sepsis assoziiert	Häufig nach Transplantationen
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ureaseproduktion	V. a. bei jungen, sexuell aktiven Frauen
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Biofilmbildung	Häufig bei katheterisierten Personen

(Warren, 1996; Mühldorfer et al., 2001)

Neben den aufgeführten Bakterien werden auch immer mehr Hefen für Harnwegsinfektionen verantwortlich gemacht, v. a. *Candida albicans* und *Candida glabrata* Stämme. Besonders prädisponiert sind Patienten, die unter Diabetes mellitus leiden, katheterpflichtig sind oder bereits mit Antibiotika vorbehandelt wurden (Mobley et al., 1994; Warren, 1996; Hazen et al., 1999; Hübner und Goldmann, 1999; Lundstrom und Sobel, 2001).

4. Pathogenitätsfaktoren uropathogener *E. coli*

E. coli ist ein typischer Keim der normalen Darmflora und befindet sich dort als harmloser Kommensale v. a. im Kolon. Die uropathogenen *E. coli* Stämme unterscheiden sich von nicht pathogenen und intestinal pathogenen *E. coli* Stämmen durch ihre Grundausstattung an Pathogenitätsfaktoren (Ölschläger et al., 2002). Diese ermöglichen es ihnen sich im Harntrakt anzusiedeln (Mühldorfer und Hacker 1994;

Donnenberg und Welch 1996; Agace et al., 1996). Nachfolgend werden die spezifisch uropathogenen Pathogenitätsfaktoren beschrieben.

4.1. Adhäsine

Adhäsion stellt eine Gemeinsamkeit verschiedener pathogener Mikroorganismen wie z. B. Viren, Bakterien, Hefen und Protozoen dar (Johnson, 1991). Adhärenz vermeidet die Elimination des Erregers durch die normale Flora des Körpers oder Produkte wie Blut oder Urin. Gleichzeitig kann dadurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden, welche die typischen Symptome der Harnwegsinfektion hervorruft.

Der Körper hat die Chance, diese Entzündung durch Abwehrzellen zu eliminieren. Adhärenz stellt immer den ersten Schritt zu Kolonisation und Infektion dar (Johnson, 1991; Soto und Hultgren 1999; Ölschläger et al., 2002). Bei uropathogenen *E. coli* tragen Adhäsine zur Besiedlung des Harntraktes bei (Hacker, 1992). Die adhäsiven Eigenschaften werden über sogenannte Fimbrien (oder synonym Pili) vermittelt, die sich an der Oberfläche der Bakterien befinden. Fimbrien sind proteinhaltige Zellfortsätze mit ähnlicher Struktur, die an spezifische Zielrezeptoren, z. B. an der Oberfläche von Wirtszellen, binden und anhand dieser Spezifität in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet Typ 1-, P- und S-Fimbrien (Hacker, 1992). Strukturell ist der Unterschied zwischen den verschiedenen Fimbrienfamilien jedoch gering. Fimbrien sind aus Proteinuntereinheiten aufgebaut. Sie sind ca. 2 µm lang und 5 bis 10 nm im Durchmesser. Sie können starr oder flexibel sein (Johnson, 1991; Mühldorfer et al., 2001).

Auch die genetische Organisation der verschiedenen Fimbriengencluster weist große Ähnlichkeit auf. Die Genprodukte von 9 bis 11 Genen sind in der Regel für den Aufbau und die Regulation der Fimbrienexpression notwendig. Ein typisches Fimbrienoperon wird unterteilt in Gene, die für die strukturelle Hauptuntereinheit (z. B. *papA* beim P-Fimbrienadhäsin) und mehrere kleine Untereinheiten kodieren sowie solche, die für das eigentliche Adhäsionsmolekül kodieren (z. B. *papG* beim P-Fimbrienadhäsin). Darüber hinaus enthält ein Fimbrienoperon Gene, deren Produkte für die Regulation der Fimbrienexpression und den Transport an die Zelloberfläche verantwortlich sind. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau am Beispiel des P-Fimbrien- (*pap*)-Genclusters.

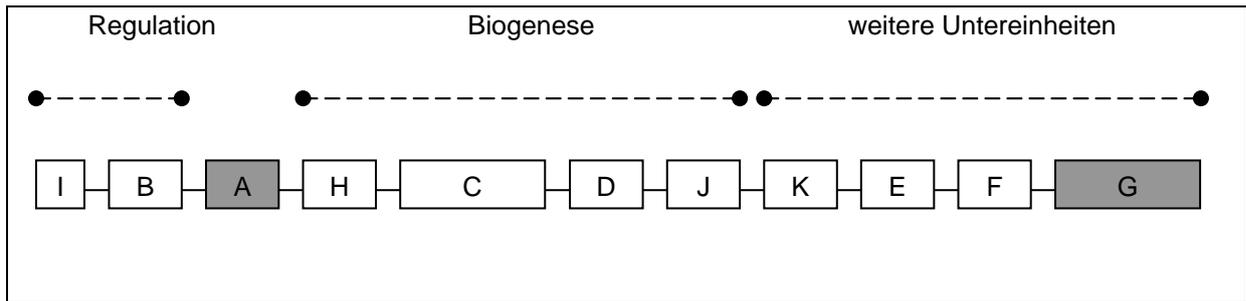


Abb. 1: *pap*-Gencluster (~ 9,7 kb). Die Hauptuntereinheit A und das Adhäsins G sind grau unterlegt.

Die einzelnen Gene des Fimbriengencusters werden funktionellen Bereichen zugeordnet (Regulation der Fimbrienexpression, strukturelle Hauptuntereinheit, Biogenese und sogenannte „minor subunits“, zu denen auch die Adhäsine gehören (Boyd und Hartl, 1998)).

P-Fimbrien:

P-Fimbrien spielen bei der Entstehung von Harnwegsinfektionen eine große Rolle (Johanson, 1992; 1993). 60 bis 80 % der uropathogenen *E. coli* sind mit P-Fimbrien ausgestattet (Hacker und Morschhäuser, 1994). Man vermutet, dass die spezifische Adhärenz der P-Fimbrien die Ausbreitung der Bakterien im Harntrakt erleichtert und die Immunantwort, die für die Symptome der Harnwegsinfektion verantwortlich ist, dadurch stimuliert wird (Wullt et al., 2001; Mühldorfer et al., 2001). Nach der Bindung der P-Fimbrien wird vermehrt Interleukin (IL-) 6 und 8 ausgeschüttet. IL-6 löst u. a. Fieber aus, IL-8 lockt chemotaktisch Neutrophile an (Svanborg et al., 1994; Connell et al., 1997; Wullt et al., 2001). Frendeus und Mitarbeiter fanden heraus, dass die Aktivierung der epithelialen Zellen über einen Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)- abhängigen Signalweg, bei dem der Rezeptor der P-Fimbrien als Corezeptor fungiert, abläuft (Frendeus et al., 2001). Das PapG-Molekül bindet an α -Gal- β -(1-4)-Gal-haltige Glykolipidrezeptoren der Zelloberflächen von Uroepithelien, renalen Tubuli und Endothelien der Niere. Da sich diese Rezeptoren auch auf dem P-Blutgruppenantigen befinden, können P-Fimbrien über Hämagglutinationstests nachgewiesen werden. P-Fimbrien werden aufgrund der geringfügig unterschiedlichen Bindungsspezifität des PapG-Moleküls noch einmal in drei Unterklassen aufgeteilt. Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Bindungsstellen an den Rezeptoren.

Tab. 2: Verschiedene Bindungsstellen der P-Fimbrien Klassen.

Unterklasse	Bindungsmolekül	<i>E. coli</i> Stamm
Klasse I	Globotriosylceramid (GbO3)	J96
Klasse II	Globotetraosylceramid (GbO4)	IA2, AD110
Klasse III	N-Acetylgalactosamid- Gruppe (wie im Forssman-Antigen, dem vorherrschenden Glykolipid von Schafserythrozyten, enthalten)	J96

(Jones et al., 1996; Mühldorfer et al., 2001)

Das PapG-Adhäsionsmolekül sitzt ganz am Ende der Helix, die aus der Hauptuntereinheit PapA aufgebaut ist. Die Fimbrie ist mit der äußeren Membran des Bakteriums über die Ursprungsorganelle PapC verankert. Als Regulator für den Aufbau der Fimbrie ist dazwischen PapH geschaltet. Das Transportmolekül PapD befindet sich im Periplasma zwischen innerer und äußerer Membran. Zusätzlich existieren noch Adaptermoleküle (PapF, PapE, PapK), die selbst Bindungsfähigkeit besitzen (Soto und Hultgren, 1999). PapE und PapF binden an Fibronectin, ein Protein der extrazellulären Matrix (Kuehn et al., 1994). Das P-Fimbriengencluster befindet sich häufig auf sogenannten Pathogenitätsinseln (PAIs, siehe 5.5.) im bakteriellen Chromosom (Mühldorfer und Hacker, 1994; Blum et al., 1994).

Typ 1-Fimbrien:

Typ 1-Fimbrien sind weit verbreitete Adhäsine bei pathogenen und apathogenen *E. coli*. Sie werden durch das *fim*-Gencluster kodiert. FimA bildet die Hauptuntereinheit. FimH ist das eigentliche Adhäsion, dessen Produkt an Glykoproteine mit Oligomannoseketten bindet. Experimentell verwendet man Hefezellen, die diese Rezeptoren tragen und kann über deren Agglutination, die durch Mannose hemmbar ist, die Typ 1-Fimbrien nachweisen. Im Wirtsorganismus befinden sich solche Rezeptoren auf verschiedenen Epithelien des Gastrointestinaltraktes, des unteren Harntraktes, des Oropharynx und der Vaginalschleimhaut. Die Typ 1-Fimbrien tragen so möglicherweise zur Ausbreitung der Bakterien bei (Johnson, 1991; Jones et al., 1996). Neben den genannten Epithelrezeptoren, binden Typ 1-Fimbrien auch an den CD 11 und CD 18 Komplex auf der Oberfläche von Leukozyten und Makrophagen, an Laminin (ein Protein der extrazellulären Matrix), an sekretorisches Immunglobulin A (IgA) und an Tamm-Horsfall Protein (THP) (Johnson, 1991; Mühldorfer et al., 2001). Interessanterweise fanden Sokurenko und Mitarbeiter im Mausmodell, dass zufällige Punktmutation im *fimH* Gen zu einer höheren Bindungsfähigkeit der FimH-

Lektinstruktur an die Mono-Mannosereste der uroepithelialen Rezeptoren führt. Dieser Unterschied könnte die höhere Virulenz der Typ 1-Fimbrien tragende UPEC im Harntakt erklären. Im Gegensatz dazu findet man bei apathogenen K-12 Stämmen, die Typ 1-Fimbrien exprimieren, nur Bindungsfähigkeit an Tri-Mannose Reste (Sokurenko et al., 1998; 2001). Typ 1-Fimbrien haben auch bei der Entstehung von Zystitiden eine besondere Bedeutung. Neben der Adhärenz, sind Typ 1-Fimbrien auch in der Lage, über eine Beeinflussung des Zytoskeletts, eine Invasion in das Zellinnere des Blasenepithels zu vermitteln (Mulvey et al., 1998; Martinez et al., 2000). Die Rezeptoren, an welche die Fimbrien binden und die danach die Internalisation ermöglichen, sind Uroplakin Ia und b (Pak et al., 2001). Dieses ermöglicht es dem Bakterium einerseits, sich in eine „geschützte Nische“ zurückzuziehen, andererseits kann der Wirtsorganismus, via Apoptose, die befallene Zelle immer noch eliminieren (Schilling et al., 2001).

S-Adhäsinfamilie:

Die S-Adhäsinfamilie umfasst neben den S-Fimbrien noch die F1C-Fimbrien und andere verwandte Fimbrien. Das SfaS Protein stellt das eigentliche Adhäsिन dar, das an sialinsäurehaltige Rezeptoren, die häufig von Zellen im Gehirn und Harntrakt gebildet werden. Die S-Fimbrien binden auch an THP, das in hohen Konzentrationen mit dem Urin ausgeschieden wird. Die Bindung daran führt also zur Elimination der Bakterien aus dem Harntrakt. Diese Tatsache erklärt möglicherweise, warum nur ca. 20 % der uropathogenen *E. coli* Stämme S-Fimbrien produzieren. Im Gegensatz dazu sind extraintestinal pathogene *E. coli* Stämme, die Neugeborenenmeningitis auslösen, zu 30 % mit S-Fimbrien ausgestattet. Interessanterweise enthält Muttermilch Faktoren, die speziell S-Fimbrien produzierende Bakterien binden, und so den Säugling vor einer Infektion schützen. Des Weiteren binden S-Fimbrien an Laminin und unabhängig von SfaS auch an den gewebspezifischen Plasminogenaktivator tPA, der die Entstehung der Protease Plasmin bewirkt und so fibrinolytische Prozesse initiiert. S-Fimbrien zeigen im Gegensatz zu F1C-Fimbrien hämagglutinierende Eigenschaften (Hacker et al., 1993; Mühldorfer et al., 2001). Neben der Hauptuntereinheit SfaS stellten Schmoll und Mitarbeiter das komplette Gencluster mit weiteren acht Genen (Größe ca. 7,9 kb) vor (Schmoll et al., 1990). Für die *sfa*-Determinante des UPEC Stammes 536 wurde erst vor kurzem festgestellt, dass sie auf der PAI III₅₃₆ liegt (Dobrindt et al., 2001). F1C-Fimbrien kommen bei etwa 14 % der *E. coli* Isolate aus Urin vor. Die Bindungsstelle für F1C-Fimbrien wurde kürzlich als

Dissacharidanteil Gal-NAc- β -(1-4)-Gal- β des Asialo-GM2 (GgO₃Cer) beschrieben. Das Gencluster besteht aus acht Genen. Die Hauptuntereinheit wird von *FocA* gebildet. Insgesamt zeigen F1C-Fimbrien Homologien zu den Sequenzen der S-Fimbrien (Khan et al., 2000).

Curli:

Neben den genannten Fimbrien werden von vielen *E. coli* Stämmen auch dünne, Fimbrien-ähnliche Strukturen, die als Curli bezeichnet werden, produziert. Die Untereinheit (CsgA) bindet u. a. an Wirtszellen und -strukturen wie Fibronectin, Laminin, Plasminogen, H-Kininogen und MHC I-Molekülen (Ohlsen et al., 1998; Gophna et al., 2002) und auch anorganische Materialien. Das gesamte Operon besteht aus *csgABC* und *csgDEFG*. *csgB* scheint für die Verankerung notwendig zu sein, *csgD* fungiert als transkriptionaler Aktivator des *csgBA* Operon. *csgEFG* scheinen für die Zusammenlagerung der „Fimbrie“ verantwortlich zu sein. Das Produkt des *csgC* Gen ist vermutlich an der Produktion der Curli Fimbrien beteiligt. Die Ausbildung der Curli wird über die Regulation des *csgD* Gens beeinflusst. Dazu gehört u. a. das Produkt des *crl* Gens. Dieser Regulator fehlt wiederum einigen *E. coli* Stämmen, wie den K-12 Stämmen, und wird deshalb von diesen nicht produziert (Mühldorfer und Hacker, 1994; Mühldorfer et al., 2001). Weitere Gene, die an der komplexen Regulation teilhaben sind die *rcs*- und *tol*-Gene (Vianney et al., 2005). Weiterhin involviert sind H-NS, IHF, *mlrA*, *ompR/envZ* und *cpxR/A* (Vianny et al., 2005; Jubelin et al., 2004, 2005). Faktoren, die auf diese Regulatoren Einfluß haben, sind neben der Temperatur auch Osmolarität, Nährstoffangebot und die verschiedenen Wachstumsphasen (Ohlsen et al., 1998; Uhlich et al., 2001). Neben der Adhäsion wird über Curli auch die Aufnahme in eukaryotische Zellen vermittelt (Gophna et al., 2001; 2002). Curli werden von kommensalen und uropathogenen *E. coli* Stämmen bevorzugt bei 30 °C produziert. Es wurden mittlerweile jedoch auch Stämme gefunden (z. B. Fäkalisolate), die bei 37 °C auch Curli produzieren. Vermutlich wird deren Virulenz dadurch gesteigert (Bian et al., 2000; Gophna et al., 2001; Bokranz et al., 2005).

Weitere Adhärenzstrukturen:

Neben Fimbrien werden auch andere Adhärenzstrukturen von UPECs produziert, sogenannte „non fimbrial adhesins“ (Ahrens et al., 1993). Diese gehen direkt aus der Bakterienoberfläche hervor und ihnen fehlt im Gegensatz zu den Fimbrien die

Hauptuntereinheit. Es scheint, dass sie sich dadurch nicht in Fimbrienform zusammenlagern können (Hultgren und Normark, 1991; Mol und Oudega, 1996; Mühldorfer et al., 2001). In Tabelle 3 sind verschiedene nicht-Fimbrien Adhärenzstrukturen aufgeführt.

Tab. 3: Verschiedene Adhärenzstrukturen uropathogener *E. coli*.

Adhärenzstruktur	Morphologie	Adhäsın	Rezeptor
Dr-Fimbrie	Fibrillen- ähnlich	DraE	DAF Komponente des Antigen der Blutgruppen Dr
AFimbrial adhesin I (AFA I)	Nicht zu Fimbrien assoziiert	AfaIE	
AFimbrial adhesin III (AFA III)		AfaIIIE	
M-Adhäsın		BmaE	A ^M Determinante des Antigen der Blutgruppe M
G-Adhäsın		unbekannt	Glc-NAc

(Jones et al., 1996; Gophna et al., 2000; Mühldorfer et al., 2001)

Für die Dr-Fimbrien wurde kürzlich gezeigt, dass sie neben Adhärenz auch die Invasion in das Epithel vermitteln. Der Rezeptor dafür wurde als $\alpha 5\beta 1$ -Integrin identifiziert (Garcia et al., 2000; Giugnot et al., 2001).

4.2. Toxine

UPECs produzieren verschiedene Toxine. Besonders Stämme, die akute Infektionen auslösen, sind dazu in der Lage. Bei chronischen Infektionen z. B. Harnwegsinfektionen nimmt die Anzahl der toxinproduzierenden Stämme eher ab. Besonders häufig wird dann jedoch α -Hämolysin und der zytotoxisch-nekrotisierende Faktor 1 (CNF1) produziert.

α -Hämolysin:

α -Hämolysin ist eines der wichtigsten Exotoxine bei Infektionen des Menschen. 50 % der *E. coli* Isolate, die extraintestinale Infektionen verursachen, sind hämolytisch (Ludwig und Goebel, 1991). In 95 % der Fälle ist das α -Hämolysin-Gencluster (*hly*) uropathogener *E. coli* in das Bakterienchromosom integriert und Teil von PAIs. Beim UPEC Stamm 536 zum Beispiel liegen die zwei Gencluster jeweils auf den PAIs I₅₃₆ und II₅₃₆. Nur ca. 5 % der *hly*-Gene liegen plasmidkodiert vor. Das *hly*-Gencluster liegt oft in der Nähe eines P-Fimbriengencluster und kann wie dieses durch Deletion aus dem Chromosom verschwinden (Mühldorfer und Hacker, 1994). Beim UPEC Stamm

536 findet die Deletion der PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ mit einer Häufigkeit von 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ statt. Die daraus resultierende Mutante 536-21 ist dann ahämolytisch. Die *hly*-Determinante kodiert vier Genprodukte: das Produkt des Gen *hlyA* bildet das eigentliche Strukturprotein, HlyC wird für die Aktivierung des HlyA benötigt, bei der Fettsäurereste auf eine bestimmte Acylierungsstelle des HlyA-Moleküls übertragen wird (Braun et al., 1993; Ludwig et al., 1996). HlyB und HlyD sind für den Transport von HlyA durch die Bakterienmembran verantwortlich (Mühldorfer et al., 2001), wobei dazu auch noch das „outer membrane protein“ TolC benötigt wird (Koronakis und Hughes, 1996). Das α -Hämolysin, das zur Rtx- (repeats in toxin)-Familie gehört, die von mehreren Gram-negativen Bakterien produziert wird, bildet eine Transmembranpore in der Lipid-Doppelschicht von ein bis zwei Nanometern Durchmesser (Braun et al., 1993). Das HlyA Protein ist dabei das eigentlich porenbildende Toxin und enthält in der N-terminalen Hälfte des Moleküls neun Helices, die an der Porenbildung mitwirken (Braun et al., 1993; Menestrina et al., 1994). Eine Domäne am C-Terminus wird für die Ca²⁺ Bindung und die Interaktion mit der eukaryontischen Membran benötigt (Dobereiner et al., 1996). Obwohl sich die Bezeichnung Hämolysin zunächst nur auf die Lyse von Erythrozyten bezieht, lysiert dieses Toxin noch eine Reihe weiterer Zellen. Epithelzellen und Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) reagieren meistens sogar extrem empfindlich auf dieses Toxin und schon die geringste Konzentration bewirkt eine Zellaktivierung, welche die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren wie Leukotriene, Histamin und Serotonin auslöst. Es wurde gezeigt, dass humane Monozyten in Anwesenheit von Hämolysin in nanomolaren Konzentrationen eine Erschöpfung ihrer ATP Speicher erleiden und damit ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) wird jedoch eher inhibiert (König et al., 1994).

Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1 (CNF1):

Neben α -Hämolysin können manche UPEC den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 (CNF1) produzieren. Yamamoto und Mitarbeiter fanden heraus, dass CNF1 oft zusammen mit α -Hämolysin produziert wird (Yamamoto et al., 1995). Die Gene für *CNF1* liegen häufig auf dem Chromosom, verbunden mit *hly*- und *pap*-Determinanten. CNF1 induziert die Umwandlung der zellulären Mikrofilamente in dicke Stressfasern, was zur Bildung mehrkerniger Riesenzellen führt (Fiorentini et al., 1995). Dieses Phänomen wird durch eine posttranslationale Modifikation des GTP-bindenden 21 kDa-Rho-Proteins verursacht, das eine Daueraktivierung der GTPase bewirkt, die

wiederum an der Bildung des mikrofilamentären Netzwerks mitwirkt (Flatau et al., 1997; Schmidt et al., 1997). Im Aufbau des Toxins werden drei Domänen unterschieden. Die N-terminale Domäne vermittelt die Rezeptorfunktion und bindet mit hoher Affinität an einen noch unbekanntes Zellrezeptor. Die Bindung wird von der Aufnahme des Toxin durch Endozytose in die Zelle und die Aufnahme in Endolysosomen gefolgt. Dieses wird über die zwei hydrophoben Helices der mittleren Domäne vermittelt. Das Carboxy-terminale Ende schließlich stellt ein Enzym dar, das durch Modifikation des Poteins die Hydrolyse von GTP verhindert und so die Daueraktivierung bewirkt (Boquet, 2001). CNF1 wirkt dermonekrotisch (Mills et al., 2000). Neben diesem Effekt steigert CNF1 außerdem den „oxidative burst“ der Abwehrzellen, hemmen jedoch die Phagozytose des Bakteriums (Hofman et al., 2000). Insgesamt werden die Wirkungen des CNF1 noch kontrovers diskutiert. Rippere-Lampe und Mitarbeiter beobachteten eine Attenuierung CNF-negativer Stämme bei Infektionen von Mäusen, Johnson und Mitarbeiter konnten dies jedoch nicht bestätigen (Rippere-Lampe et al., 2001; Johnson und Stell, 2000).

4.3. Kapseln

Kapseln sind ein Hauptmerkmal aller extraintestinal pathogener *E. coli*. Mittlerweile sind über 80 verschiedene Kapseltypen bei *E. coli* bekannt. Diese Menge wird grob in zwei Gruppen (I und II) unterteilt, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Zusammensetzung und der Organisation ihrer Gencluster unterscheiden. Zuweilen wird die Gruppe II noch in II und III unterteilt (Russo et al., 1998). Alle Kapselgencluster sind chromosomal lokalisiert. Die Gene der Gruppe I liegen in der Nähe der *his* Gene, wohingegen die der Gruppe II nahe der *ser* Gene liegen. UPEC produzieren v. a. Kapseln des Typs K1, K2, K5, K6, K12, K13, K29 und K51 (Johnson, 1991; Jann und Jann, 1992). Kapseln umhüllen die Bakterienzelle, oft interferierend mit dem Lipopolysaccharid (LPS, siehe 4.5.) und steigern die Virulenz der Bakterien auf zwei Arten: zum einen helfen sie dem Bakterium der Immunantwort des Wirtes durch Antigen-Mimikry, also durch Imitieren wirtseigener Strukturen, zu entgehen. Zum anderen verhindern Kapseln die Opsonierung der Bakterienzelle durch das Komplementsystem und tragen so zur Serumresistenz bei (Mühldorfer et al., 2001). Die von UPEC produzierten Kapseln gehören v. a. der Gruppe II an und zeichnen sich durch verschiedene Attribute aus: sie sind dünn, sauer, anionisch, thermostabil und bilden eine unregelmäßige Oberfläche (Johnson, 1991). Oft werden Kapseln nur in bestimmter Assoziation mit anderen Pathogenitätsfaktoren exprimiert, so z. B. K1 mit

den Antigenen O1, O2 und P-Fimbrien, K5 dagegen mit Hämolyisin. Der Kapseltyp K1 soll hier nun beispielhaft näher beschrieben werden.

K1-Kapselpolysaccharid:

Die K1 Kapsel wird vor allem bei ExPEC Stämmen gefunden, die Neugeborenenmeningitis auslösen. Daneben kommen sie häufiger bei UPECs vor, die Pyelonephritiden auslösen als bei solchen, die Cystitiden oder asymptotische Bakterurie verursachen (Johnson, 1991). Die Kapsel ist aus repetitiven α -2,8 verknüpften Polymeren aus Sialinsäureresten (N-acetyl-Neuraminsäure= NeuNAc) aufgebaut, die an ihren reduzierenden Enden über Esterbrücken mit Phosphorsäuremolekülen verbunden sind. Diese dienen dem Molekül als Membrananker und verleihen ihm gleichzeitig eine stark negative Oberfläche. Diese schützt, wie oben erwähnt, das Bakterium vor dem alternativen Weg der Komplementaktivierung. Das K1 Kapselpolysaccharid ähnelt einer Polysialinsäure, die bei Wirbeltieren in der embryonalen Form eines neuralen Zelladhäsionsmoleküls (N-CAM) vorkommen und man vermutet, dass diese Ähnlichkeit für die geringe Immunität verantwortlich ist (Jann und Jann, 1992; Mühldorfer et al., 2001). Die Gene, die für Synthese und Expression der Kapsel zuständig sind, liegen auf dem 17 kb großen *kps*-Gencluster. Dieses wird funktionell in drei Regionen unterteilt. Die Region 1 besteht aus den sechs Genen (*kpsFEDUCS*), deren Produkte, wie die der Region 3 (*kpsMT*), für den Transport des Molekül zur äußeren Membran zuständig sind (Russo et al., 1998). Diese Region ist konserviert auf dem Chromosom. Die Gene der Region 2 sind für die Zuckerzusammensetzung verantwortlich und spezifisch (Annunziato et al., 1995; Daines et al., 2000).

4.4. Eisenaufnahmesysteme

Die Fähigkeit Eisen aufzunehmen, ist für alle mikrobiellen Erreger, einschließlich uropathogener *E. coli*, essentiell (Braun und Hantke, 1992). Eisen wird für Sauerstofftransport, DNA-Synthese, Elektronentransport und den Metabolismus von Peroxiden benötigt und verbessert außerdem die Wachstumskinetik der Bakterien (Johnson, 1991). Siderophore sichern den Bakterien einen Wachstumsvorteil, wenn Bedingungen mit niedrigen Eisenkonzentrationen vorliegen. Durch sie wird die Eisenaufnahme aus dem Medium und sogar aus den Chelatorsystemen des Wirtes, wie z. B. Transferrin und Laktoferrin, ermöglicht. *E. coli* Bakterien sind in der Lage ein Häminaufnahmesystem (Chu), ein Fec-(Citrat) System und die

Eisenaufnahmesysteme Salmochelin (*iro*), Aerobaktin (*iuc*), Enterochelin (*ent*) und Yersiniabaktin (*ybt*) zu bilden. Während Enterochelin von pathogenen und apathogenen *E. coli* gleichermaßen gebildet wird, wird Aerobaktin hauptsächlich von extraintestinal pathogenen *E. coli* produziert und versetzt damit beispielsweise UPECs oder Sepsis verursachende Stämme in die Lage, in eisenarmen Medien wie z. B. in Serum oder Urin zu wachsen (Neilands, 1992). Aerobaktin ist das effizienteste Eisenaufnahmesystem uropathogener *E. coli*. Dabei wird zunächst Fe^{3+} aus den Chelatorsystemen des Wirtes extrahiert, dann über ein 74 kDa-Molekül der äußeren Membran aufgenommen und schließlich in den Eisenspeicher der Bakterienzelle verbracht (Johnson, 1991; Neilands, 1995). Aerobaktin wird von einem Operon aus fünf Genen kodiert. Vier davon (*iron uptake chelate* = *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD*) kodieren Enzyme, die für die Biosynthese des Aerobaktins benötigt werden, und eines (*iron uptake* = *iut*) kodiert das oben erwähnte Membranrezeptorprotein (Crosa, 1989; Neilands, 1995). Weiterhin wird das Aerobaktinsystem, wie auch andere für Eisenaufnahmesysteme kodierende Gene, durch das Fur-Protein (*ferric-uptake-regulator*-Protein) kontrolliert. Dieses unterdrückt in Anwesenheit von Eisen die Genaktivität (Mühldorfer et al., 2001). Das Aerobaktin-Gencluster kann sowohl auf dem bakteriellen Chromosom, als auch auf Plasmiden lokalisiert sein. Schubert und Mitarbeiter entdeckten interessanterweise, dass 90 % der ExPEC das *fyuA*-(*ferric uptake yersiniabactin*) und *irp*-(*iron-repressible protein*) Gencluster, das eigentlich Bestandteil einer PAI (High-Pathogenicity Island= HPI) von *Yersinia* ist, besitzen. Dieses Gencluster kodiert ein Eisenaufnahmesystem, das durch das Siderophor Yersiniabactin (Ybt) vermittelt wird. Es wird angenommen, dass diese PAI von *Yersinia* durch horizontalen Transfer an die entfernter verwandten *E. coli* weiter gegeben wurde. (Hacker, 1996; Schubert et al., 1998; Mühldorfer et al., 2001).

4.5. O-Antigene

O-Antigene Gram-negativer Bakterien sind für verschiedene biologische Effekte (s. u.) verantwortlich. Das O-Antigen stellt einen Teil des Lipopolysaccharid (LPS) der Bakterienzellmembran dar. Dieses wiederum besteht aus Lipid A, dem Kernpolysaccharid (core) und der O-spezifischen Seitenkette, die sich aus wiederholenden Untereinheiten (repeating units) von drei bis acht Zuckermolekülen zusammensetzt. Das *rfa*-Gencluster kodiert für die Enzyme, die für die Formation des Kernpolysaccharids verantwortlich sind. Die *rfb*-Genprodukte dagegen sind zuständig für die Produktion der O-spezifischen Seitenketten oder „repeating units“. Diese

wiederum geschieht unter der Kontrolle der *rfc*-Gene. Insgesamt sind fünf verschiedene Kernpolysaccharidtypen und über 170 Varianten von O-spezifische Seitenketten bei *E. coli* bekannt, wobei der Hauptteil der UTIs jedoch von einer kleinen Gruppe verschiedener O-Serotypen verursacht wird. Die hauptsächlich mit UTIs assoziierten O-Serotypen sind: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O50 und O75. Die biologischen Effekte des LPS umfassen die Stimulation von Makrophagen (Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 und IL-6 und TNF α) durch das Lipid A und die Serumresistenz, die durch die „repeating units“ erwirkt wird (Mühldorfer et al., 2001).

4.6. Andere Pathogenitätsfaktoren

Invasion:

Die Invasion von Bakterien in Wirtszellen ist ein noch relativ schlecht verstandenes Phänomen. Für UPEC kann einerseits die Fähigkeit zur Invasion bei der Entwicklung einer Urosepsis eine bedeutende Rolle spielen. Andererseits existieren UPEC Serotypen, die auch Neugeborenenmeningitis auslösen können, was mit Invasion in Wirtszellen assoziiert ist. Weiterhin wurde bei Patienten mit chronischer Pyelonephritis entdeckt, dass die Bakterien im Interzellularraum zwischen den Nierenparenchymzellen persistieren und so vor Abwehrmechanismen des Wirtes (Komplementsystem, Antikörper) geschützt sind (Donnenberg et al., 1994; Mühldorfer et al., 2001). Ein entscheidender Faktor für die Invasion stellt das OmpA „Outer-Membrane“ Protein dar. Dieses vermittelt die Bindung an GlcNAc β 1-4GlcNAc enthaltende Rezeptoren der Zelle (Prasadarao et al., 1996a und b). Neben diesem Faktor wurden bei extraintestinal pathogenen *E. coli*, die Meningitis auslösen, vier Genloci entdeckt, die bei der Invasion von Endothelzellen im Gehirn eine Rolle spielen. Huang und Mitarbeiter beschrieben die *ibe*-Loci und man nimmt an, dass sie auch bei der Invasion in Uroepithelien eine Rolle spielen (Huang et al., 1995a und b; Mühldorfer et al., 2001).

5. Der Aufbau des *E. coli* Genoms und dessen Plastizität

5.1. Die Evolution der *Enterobacteriaceae*

Die *Enterobacteriaceae* sind eine wichtige Bakterienfamilie. Sie gehören der Klasse der γ -Proteobakterien an, die insgesamt 40 Gattungen mit 200 Spezies umfasst. Klinisch relevant von diesen sind u. a. *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia*

spp., *Klebsiella ssp.* und *Proteus spp.*. Sie sind alle Gram-negative, zumeist bewegliche und fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Sie zeigen eine große Vielseitigkeit der Stoffwechselaktivität, was zu ihrer Identifizierung ausgenutzt wird. Das zeitliche Auftreten der Enterobakterien in der Evolution ist relativ neu und stark an das Auftreten von Tieren geknüpft, deren Darmtrakt die Bakterien kolonisieren. Der hohe Selektionsdruck ausgelöst durch die enorme Bakteriendichte (10^9 Bakterien pro g Faeces), durch den Wettbewerb zwischen verschiedenen Spezies und durch die verschiedenen ökologischen Nischen innerhalb eines Wirt ist eine treibende Kraft, die die Entwicklung, Spezialisierung und Anpassung der Stämme fördert. Dieses führte vermutlich zur Aufteilung in verschiedene Pathovaren, z. B. von *E. coli*. Übereinstimmend mit dieser Annahme wurde bei verschiedenen Enterobakterien zum einen Genomteile gefunden, die Gene zur Sicherung des Überlebens enthalten (z. B. Gene für essentielle Stoffwechselleistungen) und zusätzliche Anteile, die für spezielle Virulenzfaktoren kodieren und damit eine effizientere Anpassung an die unterschiedlichen Wirtsbedingungen ermöglichen. Diese Anteile sind häufig, jedoch nicht ausschließlich, auf mobilen Elementen verankert (Dobrindt et al., 2002 a). Mobile Elemente können durch horizontalen Transfer schnell an andere Bakterien der Familie weitergegeben werden und machen das Genom extrem dynamisch. Durch Punktmutation wird ebenfalls eine Veränderung des genetischen Material erreicht. Dies führt jedoch nur zu einer „langsamen Evolution“ (Arber, 1993; Dobrindt und Reidl, 2000; Dobrindt et al., 2002 a). Zur Identifizierung der erworbenen Genomteile kann der GC-Gehalt dienen. Der durchschnittliche GC-Gehalt einer Bakterienspezies ist relativ konstant. Man vermutet, dass demnach Sequenzen mit einem höheren oder niedrigeren GC-Gehalt von anderen Bakterienarten erworben wurden. Für den *E. coli* K-12 Stamm MG1655 schätzt man, dass 18 % der ORFs durch horizontalen Gentransfer erworben sein könnten (Lawrence und Ochman, 1998).

5.2. Der konservierte und flexible Teil des *E. coli* Genoms

Wie oben bereits erwähnt nimmt man an, dass das *E. coli* Genom aus einem konservierten Teil („core“) und flexiblen Elementen zusammengesetzt ist. Der konservierte Teil umfasst z. B. die Gene, die für die grundlegenden zellulären Prozesse essentiell sind. Neben Stoffwechselleistungen muss die DNA-Replikation u. ä. gewährleistet sein (Hutchinson et al., 1999; Hacker und Carniel, 2001). Man vermutet, dass diese Gene vor allem auf dem Chromosom lokalisiert sind und in Bezug auf Zusammensetzung und Position konserviert sind. Man nimmt an, dass der

konservierte Teil beim *E. coli* K-12 Stamm MG1655 ungefähr 3100 translatierbare ORFs umfasst (Dobrindt et al., 2002 a). Daneben gibt es einen flexiblen Teil des Genoms, der für die Unterschiede in der Genomgröße (4,6-5,5 Mb) von *E. coli* verantwortlich ist (Bergthorsson und Ochman, 1998; Ochman und Jones, 2000). Diese Unterschiede kommen u. a. durch Erwerb und Verlust mobiler DNA-Elemente und anderer genomischer Regionen zustande (Nataro und Kaper 1998; Dobrindt und Hacker, 1999). Tatsächlich wurden Insertionen und Deletionen von wenigen Basenpaaren bis zu einer Größe von 100 kb bei *E. coli* beobachtet (Hacker und Kaper, 1999; Rode et al., 1999; Perna et al., 2001). Tabelle 4 zeigt mögliche Bestandteile des flexiblen Teil des *E. coli* Genoms.

Tab. 4: Zusammensetzung des flexiblen Teils des *E. coli* Genoms.

DNA Elemente	kodieren z. B. für
„Genomic islands“ größer als 10 kb	Pathogenitätsfaktoren, Fitnessfaktoren
„ Genomic islets“ kleiner als 10 kb	Antibiotikaresistenzen, Virulenz- und Fitnessfaktoren
Bakteriophagen	Toxine, Effektoren, Virulenzfaktoren
Plasmide	Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenzen
IS Elemente, Transposons, Integrons	Antibiotikaresistenzen, Transposase, Integrase, Toxine, Virulenzfaktoren

(Dobrindt und Hacker, 2001)

Diese DNA Elemente können, an unterschiedlichen Stellen lokalisiert, entweder Teil des Chromosoms sein oder aber unabhängig davon als extrachromosomale Elemente replizieren. Der flexible Teil des Genoms schafft auch die Grundlage für die verschiedenen *E. coli* Pathotypen (Dobrindt et al., 2002 a).

5.3. Genomvergleich verschiedener *E. coli*

Das Genom verschiedener pathogener *E. coli* wird charakterisiert durch die Anwesenheit individueller Pathogenitätsfaktoren, die durch die entsprechenden Virulenzgene kodiert werden. Diese fehlen normalerweise apathogenen Stämmen. Wie oben erwähnt, liegen diese Gene häufig auf flexiblen Teilen des Genoms. Diese können durch die in Tabelle 5 aufgeführten Mechanismen an andere Bakterien weitergegeben werden.

Tab. 5: Mechanismen der Genomveränderung. Grau unterlegt bezeichnet Mechanismen zum Erwerb; weiß unterlegt zur Reduktion von Genen oder unveränderter Genzahl.

Mechanismus	Effekt auf den Genomgehalt
Transformation	Führt zum Erwerb von Genen
Transduktion	
Konjugation	
Deletion	Führt zur Genomreduktion oder unveränderter Anzahl von Genen
Genetische Neuordnung	
Mutation	

(Dobrindt und Hacker, 2001)

Es wurde jedoch auch festgestellt, dass sich die verschiedenen Pathotypen nicht nur durch die Anwesenheit spezifischer Pathogenitätsfaktoren, sondern auch durch die Abwesenheit von Genomteilen (Deletionen) unterscheiden. Man entdeckte, dass verschiedene ORFs nur bei apathogenen Vertretern vorkommen, bei pathogenen Verwandten jedoch fehlen. Es wird postuliert, dass diese demnach bei den apathogenen Varianten die Ausprägung von Pathogenitätsfaktoren hemmen und damit als „Virulenzrepressoren“ dienen. Ein Beispiel ist das Virulenzsuppressorgen, das für die Oberflächenprotease OmpT kodiert. Dieses fehlt bei *Shigella* und enteroinvasiven *E. coli*, bei den apathogenen *E. coli* ist es jedoch vorhanden. Die Anwesenheit von OmpT unterdrückt die Virulenz, indem es in die Expression des *Shigella* VirG Proteins eingreift, das zur intrazellulären Ausbreitung nötig ist (Nakata et al., 1993). Ein weiteres Beispiel stellt *cadA* von *E. coli* dar. 90 % der Stämme besitzen *cadA*, das für LCD (Lysin Decarboxylase) kodiert. Dieses wiederum katalysiert eine Reaktion, an deren Ende Cadaverin gebildet wird. Cadaverin hemmt die Ausbildung von Enterotoxin und attenuiert damit die Stämme. Maurelli und Mitarbeiter konnten zeigen, dass pathogenen *Shigella ssp.* und enteroinvasiven *E. coli cadA* durch Deletion fehlt („black hole“) und dadurch die Virulenz gesteigert wird (Maurelli et al., 1998). Nach der kompletten Sequenzierung verschiedener *E. coli* Genome, wie z. B. dem des K-12 Stammes MG1655 (Blattner et al., 1997), der Entwicklung neuer Verfahren, wie DNA-Arrays und dem dadurch einfacheren Vergleich ganzer Genome wurden dann Genome von verschiedenen Pathotypen mit dem des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 durch DNA-DNA Hybridisierung verglichen (Dobrindt et al., 2002 a/b; Dobrindt et al., 2003). Es stellte sich heraus, dass 5 bis 10 % der translatierbaren ORFs, die beim K-12 Stamm vorhanden waren, sowohl bei den pathogenen

Vertretern als auch bei den apathogenen fehlten. 50 bis 60 % davon waren funktionell hypothetisch, unklassifiziert oder von unbekannter Funktion. (Dobrindt und Reidl, 2000; Dobrindt et al., 2002 a/b; Dobrindt et al., 2003). Diese Ergebnisse veranschaulichen die beträchtliche Genomplastizität bei *E. coli*.

5.4. DNA-Array-Technologie

Diese Technik wurde zum ersten Mal 1998 beschrieben (Schena et al., 1998) und u. a. danach in der Zellphysiologie, Tumorforschung und Pharmakologie angewandt. Die Technik beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngige, markierte DNA-Sonden mit hoher Sensitivität und Spezifität an komplementäre einzelsträngige DNA-Fragmente, die auf einem soliden Untergrund fixiert sind (= Array), hybridisieren. Die DNA-Fragmente sind jeweils spezifisch für ein Gen. Die nicht gebundenen Sonden werden durch Waschen entfernt. Die hybridisierten Arrays werden danach z. B. durch Phosphorimager, Röntgenfilme oder andere spezielle Methoden auf ihre durch die Sonden verursachte Signalemission untersucht. Es wurden verschiedene Methoden der Herstellung von Arrays entwickelt, von denen sich zwei durchsetzten. Bei der einen wird cDNA mit Hilfe eines automatischen „Arrayers“ durch Kapillarpumpe, Stempel oder InkJet auf Nylonmembranen oder Glas gespottet. Bei der anderen werden Einzelstränge aus Oligonukleotiden mittels photolithographischer Technik synthetisiert und ebenso aufgetragen (Cummings und Relman, 2000). Mit dieser Entwicklung wurde es möglich ganze Genome z. B. von Mikroorganismen wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *E. coli* auf Arrays zu bringen und zu vergleichen oder auf ihr Expressionsmuster zu untersuchen. Ein besonderer Vorteil gegenüber anderen Methoden ist die große Zeitersparnis und der hohe Informationsgehalt in einem Versuch. In der vorliegenden Arbeit wurden Makroarrays verwendet, bei denen DNA-Sonden auf Nylonmembranen aufgebracht wurden. Bei den PanoramaTM *E. coli* Gene Arrays der Firma Sigma-Genosys (Oxford, UK) handelt es sich um DNA-Makroarrays, die sondenspezifisch alle 4290 proteinkodierenden Gene des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 tragen. Zu ihrer Herstellung wurde jeweils das gesamte offene Leseraster in Form von PCR-Produkten auf eine Nylonmembran gebracht. Jede Gensonde befindet sich in zweifacher Ausfertigung auf dem Array. Der Array ist 12 x 24 cm groß und in drei Felder aufgeteilt. An den Ecken der Felder wurde jeweils zur Positivkontrolle genomische DNA aufgebracht.

Weiterhin wurde ein „*E. coli* Pathoarray“ verwendet, der im Institut für Molekulare Infektionsbiologie (Würzburg) entwickelt wurde. Darauf sind 456 Proben typischer

virulenzassoziiertes Gene von ExPEC, IPEC und *Shigella* aufgetragen. Die PCR-Produkte sind 300 bp bis 500 bp lang und wurden auf eine Nylonmembran aufgespottet. Weitere Informationen zu Primersequenzen und Genen auf dem Pathoarray sind unter <http://www.uni-wuerzburg.de/infektionsbiologie> erhältlich.

5.5. Pathogenitätsinseln (PAIs)

Die verschiedenen *E. coli* Pathotypen produzieren unterschiedliche Virulenzfaktoren, deren kodierenden Gene Teil von Bakteriophagen, Plasmiden oder Teil des Bakterienchromosoms sein können. Die Virulenzgene uropathogener *E. coli* liegen fast ausschließlich auf dem Chromosom (Mühdorfer und Hacker, 1994). Oft sind Virulenzgene Teil sogenannter „Pathogenitätsinseln“ (PAIs), die durch ihre Anwesenheit in pathogenen und ihre Abwesenheit oder nur sporadisches Vorkommen in weniger pathogenen oder apathogenen Stämmen einer Spezies oder verwandten Spezies charakterisiert sind (Hacker et al., 1990; Blum et al., 1994; Hacker und Kaper, 1999). PAIs sind in der Regel große (>10 kb), instabile chromosomale DNA-Abschnitte, die häufig mit tRNA-Genen assoziiert sind und von repetitiven Elementen („direct repeats“- DR) flankiert werden. Für die Vorstellung, dass PAIs früher von anderen Organismen durch horizontalen Transfer übernommen wurden, spricht zum einen, dass der GC-Gehalt der PAI-kodierten Gene sich von dem der übrigen Gene des Wirtsgenoms unterscheidet (Groisman und Ochman, 1996; Hacker et al., 1997; 1999; Hacker und Kaper, 1999; Ölschläger et al., 2002), zum anderen die Assoziation mit tRNA-Genen, die als Integrationsstellen für die Fremd-DNA dienen. Hinzu kommt, dass PAIs oft Mobilitätsgene (z. B. solche für Integrasen, Transposasen und Origins der Plasmidreplikation) enthalten. Dieses führte zu der Vorstellung, dass PAIs sich aus chromosomal integrierten Phagen, Plasmiden oder Transposons entwickelt haben, die man als „Pre-PAIs“ bezeichnet. Unter bestimmten Umständen könnte es für die Bakterien vorteilhaft sein, integrierte PAIs zu stabilisieren, um ihre Eliminationswahrscheinlichkeit zu verringern. So sind häufig die für die Mobilität verantwortlichen Gene verändert und nicht mehr aktiv. „Direct repeats“ an den Enden der PAIs werden oft für Deletionserreignisse benötigt und PAIs, die diese nicht haben sind stabiler (Hochhut et al., 2006; Middendorf et al., 2004; Hacker et al., 2004; Ölschläger et al., 2002; Hacker, 1999; Hacker et al., 1999; 1997; Blum et al., 1994). Die PAIs einiger UPEC-Prototypen wie den Stämmen 536, J96 und CFT073 werden intensiv erforscht und immer neue PAIs oder Bestandteile von PAIs werden identifiziert. Beim Stamm 536 sind mittlerweile sechs PAIs sowie weitere Insel-

ähnliche Genombereiche identifiziert (Brzuszkiewicz et al., 2006; Dobrindt et al., 2002 a und b; Ölschläger et al., 2002 a und b). Der Stamm 536 sowie der Stamm CFT073 wurden bereits komplett sequenziert (Melkerson-Watson et al., 2000; Phillips et al., 2000; Welch et al., 2003; Brzuszkiewicz et al., 2006). Es stellte sich kürzlich heraus, dass die PAI III_{J96} und PAI III_{CFT073} identisch mit der PAI IV₅₃₆ sind, die für das Eisenaufnahmesystem Yersiniabaktin kodiert (Dobrindt et al., 2002 b). PAIs unterliegen einer komplexen Regulation, da die darauf gelegenen Virulenzfaktoren nicht konstitutiv, sondern in Abhängigkeit von Umweltbedingungen produziert werden. Die Gene hierfür liegen sowohl außerhalb der PAIs auf dem Chromosom als auch auf den PAIs selbst (Hacker et al., 1999). Beispiele für Regulatoren, deren Gene außerhalb der PAIs liegen sind u. a. RfaH, das Histon-ähnliche Protein H-NS, Lrp (leucine-responsive regulatory protein) und Crp (catabolite repression protein) (Dobrindt et al., 2000; Ritter et al., 1995; 1997; Hacker et al., 1999). PAI kodierte Regulatorproteine beeinflussen sowohl die Expression von Genen anderer PAIs (dieses wurde „cross-talk“ genannt) als auch die anderer chromosomaler Gene. P- und S-Fimbrien werden z. B. durch Gene reguliert, die im Fimbrienoperon selbst liegen. Für den Stamm 536 wurde jedoch gezeigt, dass die zwei Regulatorproteine der P-Fimbrien PrfB und C nicht nur die P-Fimbrienexpression kontrollieren, sondern auch für die Aktivierung der S-Fimbrien zuständig sind. Die jeweiligen Gencluster liegen jedoch auf der PAI II₅₃₆ (P-Fimbriengencluster) und PAI III₅₃₆ (S-Fimbriengencluster) (Hacker et al., 1999; Morschhäuser et al., 1993; 1994). PAI II₅₃₆ ist mit dem tRNA Gen *leuX* assoziiert. Für das Genprodukt konnte gezeigt werden, dass dessen Verfügbarkeit die Expression von über 30 verschiedenen Genen beeinflusst. Es werden u. a. Gene, die auf PAIs liegen moduliert (z. B. Hämolysegencluster). Zusätzlich wird jedoch auch die Expression von Genen reguliert, die außerhalb von PAIs liegen, z. B. Typ 1-Fimbriengencluster (Dobrindt et al., 2000; Ritter et al., 1995; 1997; Hacker et al., 1999). Kleinere Varianten der PAIs werden „Pathogenicity islets“ genannt (Hacker und Kaper, 2000; Ölschläger et al., 2002). Im Genom des UPEC Stammes 536 wurde unter anderem eine „Pathogenicity islet“ entdeckt, die acht Gene für das Häminaufnahme System Chu aufweist. Die Expression des Hämin Rezeptors an der äußeren Membran wird wiederum positiv reguliert durch RfaH (Nagy et al., 2001).

6. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der genetischen Variabilität verschiedener uropathogener *E. coli* Stämme. Diese wurden mittels phänotypischer Tests, Multiplex-PCR, Pulsfeldgelelektrophorese und DNA-DNA Hybridisierung unter Verwendung zweier verschiedener DNA-Makroarrays durchgeführt. Die Stammauswahl umfasste 12 uropathogene und fäkale Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen. Die Stämme wurden zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion abgenommen und schon in Vorgängerarbeiten genauer phänotypisch und genotypisch untersucht. Es wurde in diesem Zusammenhang u. a. vermutet, dass sich die Stämme im fortschreitenden Verlauf der Infektion möglicherweise in ihrer genetischen Ausstattung verändert hatten. Der Gegenstand dieser Arbeit war nun der Ausschluss von Kontaminationen oder Mischkulturen unter diesen 12 Stämmen und die genauere Untersuchung der Genomveränderungen bzw. Genomplastizität im Verlauf der Infektion. Neben diesen Stämmen wurden 18 weitere Stämme ausgewählt. Neun davon waren ahämolytische Mutanten der Stämme 536, 764 und 768. Durch den Vergleich mit dem jeweiligen Wildtyp sollte geklärt werden, ob sich ein identischer Mechanismus hinter dem Verlust der Hämolysefähigkeit (Deletion einer PAI durch site-spezifische Rekombination) finden lässt oder jede dieser Mutanten verschiedene eher zufällige Deletionen aufweist. Des Weiteren wurden zwei uropathogene Isolate untersucht, die die Fähigkeit zur Bildung von Curli verloren haben sowie drei UPEC Stämme, bei denen unter Antibiotikaeinfluss die Bildung von L-Formen beobachtet wurde. Durch den Einsatz von DNA-Arrays sollte auf Genomebene nach möglichen Ursachen für die jeweiligen Phänotypen gesucht werden.

II. Material

1. Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Autoklaven	Teknomara
Brutschränke	Memmert, Heraeus
Durchlaufkühler	Biorad, Model 1000mini-Chiller
Einschweißgerät	Krups Vacupack 2 plus
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	Biorad
Image Eraser	Molecular Dynamics
Exponierkassetten	Hartenstein, Molecular Dynamics
Feinwaage	Chyo JL-180
Hybridisierungfilter (Arrays)	Sigma -Genosys, Cambridge, UK
Grobwaage	Kern 470, Ohaus Navigator
Hybridisierungsöfen	Biometra, MWG-Biotech AG
Kamera	Canon
Kühlzentrifuge	Beckmann J2-21, Heraeus Megafuge 13R
Magnetrührer	Janke und Kunkel, KMO2
Netzgeräte	Biorad, Hoefer, Consort
PCR-Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW ph 523
Phosphorimager Screens	Packard (Cyclone), Molecular Dynamics
Photometer	Pharmacia Biotec, Ultrospec 2000
Pipetten	Gilson P 20, 200 und 1000
Pulsfeldgelelektrophoresekammer	Biorad, Chef-DR II und III System
Pumpe für PFGE	Biorad, variable speed pump

Scanner	Molecular Dynamics (Typhoon 8600)
Schüttelinkubator	Bühler W55 swip
Schütteltisch	GFL 3005
Sterile Werkbank	Nunc, Nuaire
Thermoblock	Liebisch, Laboratory Devices
Tischinkubator	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C, Heraeus Biofuge pico
UV-Transilluminator	Biorad Gel Doc 2000
Vortex	GLW L46, Boskamp GmbH Mixomat
Wasserbad	Memmert

2. Chemikalien

Die benötigten Chemikalien für diese Arbeit wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma-ARK (München), Roth (Ridlingen-Hanweiler), Merck (Haar), Difco, Oxoid (Kansas City, Missouri, USA), Serva (Taunusstein), GibcoBRL (jetzt Invitrogen, Karlsruhe), MBI-Fermentas (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Amersham Biosciences (Freiburg), Quiagen (Hilden), Biorad (München), MWG-Biotech (Ebersberg) und Eurobio (Les Ulis Cedex B, Paris) bezogen und gemäß den Bestimmungen der Hersteller verarbeitet.

3. Nähr- und Selektivmedien:

3.1. Luria-Bertani (LB) Agarplatten:

10 g Pepton aus Casein

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

16-18 g Agar

ad 1 l H₂O_{dest.}

3.2. LB-Flüssigmedium:

10 g Pepton aus Casein

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

ad 1 l H₂O_{dest.}

3.3. Schwärm-Agarplatten:

10 g Pepton aus Casein

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

3 g Agar

ad 1 l H₂O_{dest.}

3.4. Kongorot-Agarplatten:

10 g Pepton aus Casein

5 g Hefe-Extrakt

16-18 g Agar

ad 1 l H₂O_{dest.}

Farbzusätze:

- 50 mg Kongorot
- 25 mg Coomassie Brilliant Blue

Die Farbzusätze werden in 10 ml H₂O_{dest.} gelöst, sterilfiltriert und auf 50 °C erhitzt. Danach können 8 ml dem Agar zugemischt werden.

3.5. Mac Conkey-Agarplatten:

50 g Fertigpulver (Difco)

ad 1 l H₂O_{dest.}

3.6. Blutagarplatten:

LB-Agarplatten

3 % gewaschenes Rinderblut

Die aufgeführten Komponenten werden abgewogen, durch kräftiges Schütteln in destilliertem Wasser gelöst und danach 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C werden ggf. Blut und andere Zusätze (s. o.) dazugemischt. Für die Herstellung

von Agarplatten werden ungefähr 20 ml Komponentengemisch unter der sterilen Werkbank in sterile Petrischalen gegossen und ca. 20 min getrocknet. Die nicht sofort verwendeten Platten können begrenzte Zeit im Kühlraum in einer Plastikverpackung gelagert werden. LB-Flüssigmedium kann in einer sterilen Flasche aufbewahrt und bei steriler Benutzung mehrfach wiederverwendet werden.

4. Bakterienstämme

Die *E. coli* Bakterienstämme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme. Die Stämme, die von derselben Patientin entnommen wurden, sind durch grau-weiße Unterlegung gekennzeichnet.

Stamm	Abnahmedatum	Ursprüngliche Bezeichnung	Isolat	Herkunft
J 177	23.07.1997	2E1U	uropathogen	Bereitstellung der Stuhl- und Urinproben durch Prof. Dr. R. Fünfstück, Universität Jena, Isolate dann in der Stammsammlung des Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg („Jena Stämme“)
J 1153	16.12.1998	2L4	Fäkalisolat	
J 1199	13.01.1999	2M1	Fäkalisolat	
J 1360	13.07.1999	2O1U	uropathogen	
J 171-1	16.07.1997	8B1	Fäkalisolat	
J 171-2	16.07.1997			
J 172	16.07.1997	8B2		
J 67-1	11.06.1997	1B4	Fäkalisolat	
J 67-2	11.06.1997			
J 68	11.06.1997	1B5		
J 987	08.10.1998	1K1	Fäkalisolat	
J 989-1	08.10.1998	1K3		
J 989-2	08.10.1998			
J 1739	10.12.1999	1P1U	uropathogen	
J 1745	10.12.1999	1P1	Fäkalisolat	

Tab. 7: Weitere verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Isolat	Eigenschaften	Herkunft
Nr. 42	uropathogen	Durch z. B. Cefazolin induzierbare L-Formen	Prof. Dr. U. Ullmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Kiel
Nr. 58			
Nr. 70			
DSM6601	Fäkalisolat		Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg
DSM6601 CR ⁻	Fäkalisolat	O6:K5:H1, <i>foc</i> , <i>fim</i> , <i>iuc</i> , <i>ent</i> , Kongorot-negativ	

7117	uropathogen		
7117 CR ⁻	uropathogen	Kongorot-negativ	
764	uropathogen	O18:K5:H5/11, <i>foc</i> , <i>hly</i> , <i>ybt</i> , <i>iutA</i> , <i>kps</i> , <i>malX</i>	
764-6	ahämolytische Spontanmutante		
536	uropathogen	O6:K15:H31, <i>hly</i> ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>sms</i> ⁺ , <i>fyuA</i> ⁺ , <i>kps</i> ⁺ , <i>malX</i> ⁺ , <i>iro</i> ⁺ , <i>ybt</i> ⁻ , <i>ent</i> ⁻	
536-22	ahämolytische Mutanten des Stammes 536		
536-31			
768	uropathogen		
768/1	ahämolytische Spontanmutante		

5. Puffer für die verschiedenen Gelelektrophoresen

5.1. TAE-Puffer für Agarosegelelektrophorese:

50-fach Stammlösung:

242 g Tris

57,1 ml Essigsäure

100 ml 0,5-fach EDTA, pH 8

ad 1 l H₂O_{dest.}

5.2. TBE-Puffer für Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE):

10-fach Stammlösung:

108 g Tris

55 g Borsäure

9,3 g EDTA

ad 1 l H₂O_{dest.}

5.3. TE-Puffer zur Aufbewahrung der Agaroseblöckchen der PFGE:

10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5

10 ml 0,5 M EDTA, pH 7,5

ad 1 l H₂O_{dest.}

5.4. NEB-Vorpuffer für PFGE:

1,5 ml 1 M NaCl

1,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5

1,5 ml 1 M MgCl, pH 7,9

150 ml DTT

ad 150 ml H₂O_{dest.}

Die Substanzen werden gemischt, steril filtriert und können, bei -20 °C eingefroren, wiederverwendet werden.

5.5. NDS-Puffer für PFGE:

0,5 M EDTA, pH 9,5

1 % N-Lauroylsarcosin

ad 0,5 l H₂O_{dest.}

5.6. SE-Puffer für PFGE:

15 ml 5 M NaCl

50 ml 0,5 M EDTA, pH 7,4

ad 1 l H₂O_{dest.}

5.7. LGT-Agarosepuffer zur Herstellung der Blöckchen (PFGE):

2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5

2,5 ml 1 M MgCl₂

50 µl 0,5 M EDTA, pH 7,5

ad 250 ml H₂O_{dest.}

5.8. Stop-Puffer:

25 mg 0,25 % Bromphenolblau

25 mg 0,25 % Xylencyanol

2,5 g 25 % Ficoll (Type 400)

ad 10 ml H₂O_{dest.}

Die Puffer 5.1-5.3 und 5.5-5.7 werden 20 min autoklaviert und können bei steriler Benutzung wiederverwendet werden.

6. Enzyme

Die in der Tabelle folgenden Enzyme wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Reaktionspuffer wurden von der jeweiligen Firma mitgeliefert und die Reaktionsbedingungen beschrieben.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Name	Art des Enzyms	Erkennungssequenz	Hersteller	Verwendung
Taq	DNA Polymerase I	-	Quiagen	Multiplex-PCR
Xba I	Restriktionsenzym	5' T↓CTAGA 3' 3' AGATC↑T 5'	New England Biolabs Inc.	Spaltung der DNA in den Agaroseblöckchen der PFGE
Klenow Fragment	DNA Polymerase I, Large Fragment	-	New England Biolabs Inc.	Synthese des DNA-Gegenstrangs zur Hybridisierung bei der Sondenherstellung
I-CeuI	Restriktionsenzym	5' CCTAA↓G 3' 3' G↑GATTC 5'	New England Biolabs Inc.	Spaltung der DNA in den Agaroseblöckchen der PFGE

7. Molekulargewichts- und Größenstandards

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurden folgende DNA-Marker verwendet:

Tab. 9: Verwendete Molekulargewichts- und Größenstandards.

	MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use (MBI Fermentas)	Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs Inc.)	Low Range PFG Marker (New England Biolabs Inc.)	Chef DNA Size Markers–<i>H. wingei</i> Chromosomes (Biorad)
Fragment	Größe (bp)	Größe (kb)	Größe (kb)	Größe (mbp)
21	10 000	1018,5	194,0	3,13
20	8000	970,0	145,5	2,70
19	6000	921,5	97,0	2,35
18	5000	873,0	48,5	1,81
17	4000	824,5	23,1	1,66
16	3000	776,0	9,42	1,37
15	2500	727,5	6,55	1,05
14	2000	679,0	4,36	
13	1500	630,5	2,32	
12	1031	582,0	2,03	
11	900	533,5	0,56	
10	800	485,0	0,13	
9	700	436,5		
8	600	388,0		
7	500	339,5		
6	400	291,0		
5	300	242,5		
4	200	194,0		
3	100	145,5		
2	80	97,0		
1	-	48,5		
Menge:	5 µl pro Tasche	ca. 1 mm der Gelsäule		2-4 mm ²
Verwendung:	Marker für Agarose- gelelektrophorese	Marker für PFGE (<i>Xba</i> I)		Marker für PFGE (<i>Ceu</i> I)

8. Primerpaare und Anfangssequenzen

Die hier aufgeführten Primer sind Bestandteile der Pools 1-5 der Multiplex-PCR (modifiziert nach Johnson und Stell, 2000) und wurden zum Teil auch zur Verifizierung der Ergebnisse der Multiplex-PCR als Primerpaar (forward/reward) in Einzel-PCRs verwendet. Bezogen wurden die Primer von der Firma MWG-Biotech und wurden laut den im Kap. III. aufgeführten Bedingungen verdünnt.

Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 0,6 µM eingesetzt. Bei den mit * gekennzeichneten Primern wurden eine Konzentration von 0,3 µM verwendet.

Pool	Gen	Primername	Größe (bp)	Primersequenz (5´-3´)
1	PAI	RPAi f/r	930	ggacatcctgttacagcgcgca tcgccaccaatcacagccgaac
1	<i>papAH</i>	PapA f/r	720	atggcagtggtgtcttttggtg cgtcccaccatacgtgcttctc
1	<i>fimH</i>	FimH f/r	508	tgcagaacggataagccgtgg gcagtcacctgccctccgga
1	<i>kpsMT III</i>	Kps III f/r	392	tcctctgtactattccccct aggcgtatccatcccctctaac
1	<i>papEF</i>	PapEF f/r	336	gcaacagcaacgctggtgcatcat agagagagccactcttatacggaca
1	<i>ibeA</i>	ibe 10	170	aggcaggtgtgcccgcgtac tgggtctccggcaaaccatgc
2	<i>fyuA</i>	FyuA f/r	880	tgattaaccccgcgacgggaa cgcagtaggcacgatgtgta
2	<i>bmaE</i>	bmaE f/r	507	atggcgctaactgcatgctg agggggacatatagcccccttc
2	<i>sfa/focDE</i>	sfa1/ sfa2	410	ctccggaggactgggtgcatcttac aggaggagtaattacaaacctggca
2	<i>iutA</i>	AerJ f/r	300	ggctggacatcatgggaactgg cgtcgggaacgggtagaatcg
2	<i>papG</i> Allel III	Allele III f/r	258	ggcctgcaatggattacctgg ccaccaaagaccatgccagac
2	<i>kpsMT K1</i>	K1 f/ kpsII r	153	tagcaaacgttctattggtgc catccagacgataagcatgagca
3	<i>hlyA</i>	hly f/r	1.177	aacaaggataagcactgttctggct accatataagcggtcattcccgtca
3	<i>rfc</i>	rfc f/r	788	atccatcaggaggggactgga aaccataccaaccaatgcgag
3	<i>papG</i> Allel I *	AlleleI f/r	461	tcgtgctcaggtccggaatt tggcatcccccaacattatcg
3	<i>kps MT II *</i>	kpsII f/r	272	gcgcatttgctgatactgttg catccagacgataagcatgagca
3	<i>papC *</i>	PapC f/r	200	gtggcagtatgagtaatgaccgta

				atatcctttctgcagggatgcaata
4	<i>gafD</i>	<i>gafD</i> f/r	952	tgttgaccgtctcagggctc ctcccgaactcgctgttact
4	<i>cvaC</i>	CoIV-Cf/ CoIV-Cr	680	cacacacaaacgggagctgtt cttcccgcagcatagtccat
4	<i>cdtB</i>	<i>cdt-a</i> 1/2 & <i>cdt-s</i> 1/2	430	aaatcaccaagaatcatccagtta aaatctcctctgcaatcatccagtta gaaagtaaaggaatataaatgtccg gaaaataaatggaacacacatgtccg
4	<i>focG</i>	FocG f/r	360	cagcacaggcagtgatgacga gaatgtgcctgcccattgct
4	<i>traT</i>	TraT f/r	290	ggtgtggtgcgatgagcacag caggtcagccatccctgag
4	<i>papG</i> Allel II	AllelII f/r	190	gggatgagcgggcctttgat cgggcccccaagtaactcg
5	<i>papG</i> I	pGf/ pG1``r	1.190	ctgtaattacggaagtgatttctg tccagaaatagctcatgtaacccg
5	<i>papG</i> II/III	pGf/ pGr	1.070	ctgtaattacggaagtgatttctg actatccggctccggataaacat
5	<i>afa/draBC</i> *	Afa f/r	559	ggcagagggccggcaacaggc ccgtaacgcgccagcatctc
5	<i>cnf1</i> *	Cnf1/ 2	498	aagatggagtttctatgcaggag cattcagagtcctgccctattaatt
5	<i>sfaS</i> *	SfaS f/r	240	gtggatacgcgattactgtg ccgccagcattccctgtattc
5	<i>kpsMT</i> K5	K5-f/ <i>kpsII</i> -r	159	cagtatcagcaatcgttctgta catccagacgataagcatgagca

III. Methoden

1. Stammhaltung und Anzucht der Bakterien

Die Bakterienstämme werden in einem Gemisch aus LB-Medium und 20 % Glycerin bei -20 °C gelagert. Für die Anzucht werden die Bakterien über Nacht in LB-Medium (ÜN-Kultur) oder auf LB-Platten bei 37 °C inkubiert.

2. Phänotypische Tests

2.1. Prüfung der Motilität auf Schwärm-Agarplatten

Die Herstellung der Platten erfolgt mit den im Kap. II, 3.3. beschriebenen Materialien. Danach werden die zu prüfenden Bakterien unter der sterilen Werkbank mit einer Impföse mittig aufgeimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Als Positivkontrolle kann der *E. coli* Stamm 536, als Negativkontrolle der *E. coli* Stamm 536-21 verwendet werden. Am nächsten Tag kann die Ausdehnung der Bakterien auf der Platte begutachtet werden.

2.2. Hämolysetest

Nach Herstellung normaler LB-Platten (siehe Kap. II, 3.1.) Autoklavierung und Abkühlung, wird das Rinderblut zweimal gewaschen. Dazu werden je zweimal 30 ml 0,9 % NaCl hinzugefügt, vorsichtig gemischt und bei max. 5000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C oder Heraeus Biofuge pico) 10-15 min zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils abgenommen und anschließend auf 30 ml aufgefüllt. Das gewaschene Rinderblut wird dann dem abgekühlten Agar hinzugefügt, unter der sterilen Werkbank Platten gegossen und getrocknet. Danach können die Bakterien streifenförmig auf die Platte aufgeimpft werden. Als Positivkontrolle dient wieder der *E. coli* Stamm 536, als Negativkontrolle der *E. coli* K-12 Stamm MG1655. Danach werden die Platten bei 37 °C über Nacht bebrütet und am nächsten Tag kann, sofern das Toxin α -Hämolysin von den Bakterien produziert wird, ein heller Hämolysehof um die Kolonien beobachtet werden.

2.3. Fimbrienadhäsine

2.3.1. Typ 1-Fimbrienadhäsine:

Typ 1-Fimbrien können an Mannose-haltige Rezeptoren der Wirtszellen binden und werden mit Hilfe der sog. Hefeagglutination qualitativ nachgewiesen. Dazu werden auf einem Objektträger 20 µl einer ungeschüttelten ÜN-Kultur mit 20 µl einer Bäckerhefesuspension (10 mg/ml) einmal mit und einmal ohne 2 % Mannose gemischt. Nach kurzer Inkubation auf Eis und unter Schwenken des Objektträgers wird die Verklumpungsreaktion bewertet. Stellt sich bei dem Gemisch ohne Mannose eine Agglutination ein, wird diese jedoch bei dem Gemisch mit Mannose inhibiert, gelten die Typ 1-Fimbrien als nachgewiesen. Als Positivkontrolle ist der *E. coli* Stamm 536, als Negativkontrolle der *E. coli* Stamm 2980 geeignet.

2.3.2. P-Fimbrienadhäsine:

P-Fimbrien vermitteln eine Adhäsion der *E. coli* Bakterien an Gal- α -(1-4)- β -Gal-haltige Wirtsrezeptoren. Dies kann mit Hilfe einer Hämagglutinationsreaktion von Schafserythrozyten nachgewiesen werden. Dazu wird 1 ml Schafsblut zweimal gewaschen wie in Kap. III, 2.2 beschrieben, danach eine Suspension aus 1 ml gewaschenem Blut und 9 ml 0,9 % NaCl hergestellt und davon 20 µl auf einen Objektträger gebracht. Danach werden die Bakterien mit einem sterilen Zahnstocher von einer LB-Platte abgenommen und auf dem Objektträger gut mit der Suspension gemischt. Nach mind. 10 min Inkubation auf Eis und unter Schwenken des Objektträgers kann die Verklumpungsreaktion beurteilt werden. Als Positivkontrolle wird der *E. coli* Stamm J96, als Negativkontrolle der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 benutzt.

2.3.3. S-Fimbrienadhäsine:

S-Fimbrien vermitteln eine Adhäsion der *E. coli* Bakterien an α -Sialyl- β -2,3-Galaktosyl-haltige Rezeptoren der Wirtszelle. Sie können dadurch eine Hämagglutination von Rindererythrozyten bewirken und so nachgewiesen werden. Hierzu wird 1 ml Rinderblut gewaschen und eine Suspension hergestellt (s. o.). Davon werden 20 µl auf einen Objektträger gebracht und mit den Bakterien, die mittels sterilem Zahnstocher von einer LB-Platte abgenommen wurden, gemischt. Nach mind. 10 min Inkubation auf Eis, und unter Schwenken des Objektträgers, kann die Verklumpungsreaktion beurteilt werden. Als Positivkontrolle kann der *E. coli* Stamm 536, als Negativkontrolle der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 verwendet werden.

2.4. Curli-Adhäsine

Curli-Adhäsine sind dünne „Härchen“ an der Oberfläche der Bakterien, die *in vivo* an verschiedene Strukturen der Wirtszelle binden können. Im Test binden sie an den Farbstoff Kongorot und die Kolonie, die diese bilden kann, imponiert durch braunrötliches Wachstum. Die benötigten Platten werden wie im Kap. II, 3.4. beschrieben hergestellt und die zu testenden Bakterien mittels Impföse im Drei-Ösen-Ausstrich aufgetragen. Als Positivkontrollen werden die *E. coli* Stämme DSM6601 (rötliches Wachstum) und 536 (bräunliches Wachstum) aufgeimpft, als Negativkontrolle der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 (farbloses Wachstum). Danach werden die Platten 72 Stunden jeweils bei 30° C und 37 °C bebrütet und anschließend die Färbung der Kolonien begutachtet.

3. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Virulenzfaktoren extraintestinaler pathogener *E. coli* (modifiziert nach Johnson und Stell, 2000)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können beliebige DNA-Fragmente spezifisch in großen Mengen amplifiziert werden. Durch mehrere Zyklen von Denaturierung der Template-DNA, Primer-Annealing und DNA-Synthese wird das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe einer hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien angereichert. Die Besonderheit der hier verwendeten Multiplex-PCR Methode beruht auf der Tatsache, dass pro Ansatz nicht nur ein spezifisches DNA-Fragment amplifiziert werden kann, sondern bis zu sechs verschiedene. Um die Template-DNA zu gewinnen, wird eine Kolonie des zu prüfenden Bakterienstammes in 500 µl H₂O_{bidest.} suspendiert und 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Das Gemisch der verschiedenen Primer pro Pool kann Kap. II, 8. entnommen werden. Alle Primer werden in einer Konzentration von 0,6 µM eingesetzt. Anschließend wird der folgende Reaktionsansatz (25 µl) auf Eis pipettiert:

Tab. 11: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR.

Quiagen Taq-DNA-Polymerase	
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ (4 mM)	2,5 µl
dNTP Gemisch (0,8 mM von jedem der 4)	2 µl
Template-DNA	1 µl
Primer-Poolgemisch	2,5 µl
Q-Solution (kann durch Wasser ersetzt werden)	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{bidest.}	9 µl

Bei dem Template-DNA Gemisch für die Positivkontrollen der verschiedenen Pools muss je nach DNA Menge die Wassermenge reduziert werden. Als Positiv-Kontrollstämme wurden verwendet:

- Pool 1: J96+ U5
- Pool 2: J96+ V15+ IA2+ PM9
- Pool 3: J96+ V27
- Pool 4: J96+ V15+ PM9+ V27
- Pool 5: J96+ U8+ P42+ 536

Das Aufkochen entfällt bei der hier verwendeten Taq-DNA-Polymerase. Die Amplifizierung erfolgt über 30 Zyklen unter den jeweils optimalen Bedingungen:

- 30 s Denaturierung bei 94 °C (Trennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge)
- 30 s Annealing bei 63 °C (Hybridisierung des Primers mit der einzelsträngigen DNA, die Temperatur ist abhängig von der Länge und GC-Gehalt der Primer: $T_m = 63,3 + 0,41 \times \text{GC-Gehalt} \cdot (650 / (\text{Zahl der Nukleotide}))$)
- 3 min Extension bei 72 °C (Taq-DNA-Polymerase verlängert den Primer komplementär zur Template-DNA am 3`OH-Ende mit dNTPs)

Am Ende wird der Ansatz nochmals 10 min bei 72 °C inkubiert, um die vollständige Synthese aller DNA-Fragmente zu gewährleisten. Nach der PCR-Reaktion wird ein

Teil des Ansatz (ca. 7,5 µl) mit Stop-Puffer versehen und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

4. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wird die horizontale Agarosegelelektrophorese verwendet. Dabei wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, wobei sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, weil die kleineren Fragmente schneller durch die „Maschen“ der Agarose wandern als die größeren. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt außer von der Größe auch von der angelegten Feldspannung, der „Maschenweite“ des Gels, d. h. der Konzentration der Agarose, und der DNA-Konformation ab. Bei der oben erwähnten Multiplex Virulenzfaktor-PCR wurde mit einer Spannung zwischen 70 und 90 V und einer Agarosekonzentration von 2 % gearbeitet, da DNA-Fragmentgrößen von 0,1-3 kb erwartet wurden. Zur Herstellung des Agarosegels wird die Agarose in dem Laufpuffer (TAE, siehe Kap. II, 5.1.) in der Mikrowelle aufgekocht, bis sie vollständig aufgelöst ist. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird die Agarose in eine abgedichtete Gießvorrichtung gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer mit dem entsprechenden Laufpuffer gelegt. Das Gel wird mit dem Laufpuffer überschichtet, in die erste und letzte Tasche des Gels wird ein Marker (siehe Kap. II, 7.) gegeben, in die restlichen Taschen werden die Proben, mit Stop-Puffer versetzt, aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese beträgt, je nach angelegter Spannung, 2 h bis 4 h. Nach Beendigung kann die aufgetrennte DNA durch Einlegen des Gels in ein Ethidiumbromid-Bad (EtBr) (0,5 µg/ml) ca. 15 min angefärbt werden. Da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert, werden die DNA-Fragmente als schmale Banden unter UV-Licht sichtbar.

5. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Im Unterschied zur normalen Agarosegelelektrophorese wird bei der PFGE nicht nur an zwei Elektroden Spannung angelegt, sondern an vier und die Dauer beträgt, da die Spannung geringer und von wechselnder Intensität ist, meist über 20 h. Des weiteren

werden die Bakterien zuerst schonend in ein Agarosegel gegossen (Blöckchenherstellung), um vorzeitiges Brechen des DNA-Faden oder Abscherung vor der eigentlich erwünschten Spaltung zu vermeiden. Dann wird die DNA durch Restriktionsenzyme gespalten, aufgetragen und aufgetrennt. Das Besondere dieser Methode ist somit die schonende Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente.

5.1. Herstellung der Blöckchen

Zur Anzucht der Bakterien werden 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag werden zweimal 2 ml ÜN-Kultur nacheinander in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, jeweils 2 min bei RT bei 13000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C oder Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand mit einer sterilen blauen Spitze abgenommen. Das Bakterienpellet wird zweimal mit je 1 ml SE-Puffer (siehe Kap. II, 5.6.) gewaschen und anschließend in 1 ml SE-Puffer aufgenommen. Zur Messung der optischen Dichte (OD) werden 100 µl der Suspension entnommen und mit 900 µl SE-Puffer verdünnt. Die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm sollte zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Ist die OD schon in der Suspension optimal, kann mit der Suspension weiter gearbeitet werden. In einem weiteren Schritt wird 2 % low-melting Agarose (Eurobio) in LGT-Agarosepuffer (siehe Kap. II, 5.7.) in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 50 °C abgekühlt und davon 900 µl mit den 900 µl Bakteriensuspension gemischt und in die vorbereiteten Schienen pipettiert. Man sollte Luftblasen vermeiden, da die Blöckchen sonst brüchig werden. Nach Aushärten der Agarose, werden überstehende Ränder mit dem Skalpell entfernt, der vordere Teil der Schiene abgenommen und der Agarosestreifen in 3 mm² große Stückchen geschnitten. Die Agarosestückchen werden in ein 15 ml Spitzröhrchen in 5 ml NDS-Puffer (siehe Kap. II, 5.5.) mit 10 mg frisch eingewogener Proteinase K gegeben und über Nacht bei 50 °C im Wasserbad geschüttelt. Die Proteinase K spaltet Proteine, die sich später bei der PFGE störend auswirken würden. Am nächsten Tag wird der NDS-Puffer mit der Proteinase K entfernt. Mit einer Plastikimpföse wird dabei, und beim anschließenden Waschen, verhindert, dass die Agaroseblöckchen verloren gehen. Danach wird einmal kurz und dann dreimal im Abstand von 2 h mit 10 ml TE-Puffer (siehe Kap. II, 5.3.) gewaschen. Anschließend können die Agaroseblöckchen bei 4 °C in dem TE-Puffer aufbewahrt werden. Hin und wieder sollte der Puffer gewechselt werden. Bis zur ersten PFGE sollten die Agaroseblöckchen jedoch mindestens 72 h in dem Puffer aufbewahrt worden sein.

5.2. Spaltung der Bakterien-DNA in den Agaroseblöckchen

Am Tag vor der PFGE werden ein bis zwei Agaroseblöckchen aus dem TE-Puffer genommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Für die Spaltung werden die Agaroseblöckchen 1 h bei 50 °C in 1 ml NEB-Vorpuffer (siehe Kap. II, 5.4.) im Wasserbad inkubiert. Danach wird der NEB-Vorpuffer entfernt und je nach Enzym einer der folgenden Restriktionsansätze hinzu pipettiert:

Tab. 12: Restriktionsansätze für PFGE.

Enzym	Ansatz
<i>Xba</i> I 1 µl	1,5 µl BSA 15 µl NEB 2 132,5 µl H ₂ O
<i>Ceu</i> I 1 µl	1,5 µl BSA 15 µl NEB 4 132,5 µl H ₂ O

Der Reaktionsansatz wird bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird noch einmal 1 µl Enzym dazu pipettiert und weitere 3 h im Wärmeblock inkubiert. Während dessen wird das Agarosegel (0,8 prozentig beim Enzym *Ceu* I, 1 prozentig bei *Xba* I) hergestellt. Dazu wird die Agarose im Laufpuffer (0,5 x TBE, siehe Kap. II, 5.2.) in der Mikrowelle aufgeköcht und in ein 50 °C warmes Wasserbad gestellt, um sie abzukühlen und trotzdem flüssig zu halten. In der Zeit kann auch die Elektrophoresekammer vorbereitet werden. Dazu wird erst die Kammer mit 0,5 l 0,5-fach TBE gespült, um eventuelle Staub- und Kristallreste zu entfernen und anschließend 1,8 l 0,5 x TBE hineingegeben und unter Umwälzung durch eine Pumpe auf 12 °C abgekühlt.

5.3. PFGE

Nach Ende der Inkubationszeit können die Agaroseblöckchen mittels Impföse auf einen Objektträger gebracht werden und mit dem Skalpell auf die definitive Größe zugeschnitten werden. Sie werden mit einem geeigneten Marker (siehe Kap. II, 7.) auf den Kamm aufgebracht. Danach wird der Kamm in die geeignete Gießvorrichtung eingesetzt, und das auf 50 °C abgekühlte Agarosegel eingefüllt bis die Blöckchen überschichtet sind. Nach ca. 30 min ist das Gel erstarrt und kann in die vorbereitete PFGE-Kammer gelegt werden.

Je nach Enzym wird eines der folgenden Programme gewählt:

Tab. 13: Programme der PFGE.

Enzym	Block 1	Block 2	Block 3
<i>Xba</i> I	"Initialtime" 5 s "Finaltime" 50 s Laufzeit 22 h	0	0
<i>Ceu</i> I	"Initialtime" 30 s "Finaltime" 80 s Laufzeit 15 h	"Initialtime" 80 s "Finaltime" 80 s Laufzeit 4 h	0

Nach Abschluß der PFGE kann das Gel ebenfalls in einem EtBr-Bad gefärbt und unter UV-Licht begutachtet werden.

6. Hybridisierung von DNA-Arrays mit (³³P)-markierten Sonden

DNA-Arrays sind eine effiziente Methode zum Vergleich ganzer Bakteriengenome z. B. mit dem des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 (Panorama™ *E. coli* Gene Array). Weiterhin kann man mit diesem Array, auf dem die Gene des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 aufgespottet sind, spezifische Gene dieses Stammes detektieren. Mit Hilfe des Pathoarray, auf dem virulenzassoziierte Gene von versch. *E. coli* Pathovaren, *Shigella* etc. aufgespottet sind, kann von verschiedenen anderen *E. coli* das Vorhandensein dieser Gene ermittelt werden. Die Pathoarrays wurden innerhalb des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie in Würzburg entwickelt und werden derzeit noch nicht kommerziell vertrieben. Nähere Informationen über Primersequenzen und aufgespottete Gene sind unter <http://www.uni-wuerzburg.de/infektionsbiologie> erhältlich. In dieser Arbeit werden Panorama™ *E. coli* Gene Arrays und Pathoarrays mit DNA-Sonden hybridisiert. Die Sonden werden mittels Random-Hexamer-Primer (5`d-NNNNNN-3`, N=G, A, T, C, New England Biolabs inc.) und mit Hilfe des Klenow-Fragments synthetisiert und danach durch den Einbau von (³³P)-markierten dATP markiert. Die nach der Hybridisierung gebundenen Sonden können nach einigen Waschschritten mittels eines Phosphorimagers detektiert werden. Die speziellen benötigten Lösungen sind unter 6.6. zu finden.

6.1. Isolierung chromosomaler DNA

Nach Herstellung einer ÜN-Kultur, werden am nächsten Tag 2 ml davon in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 13000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C oder Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen und das Bakterienpellet mit 1 ml TNE gewaschen. Der Überstand wird

wiederum abgenommen und verworfen und das Bakterienpellet in 540 µl TNEX aufgenommen. Danach wird die Suspension mit 30 µl Lysozym (5 mg/ml, frisch eingewogen oder auch vorher gemischt und eingefroren) versetzt und 20 min bis 30 min bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 30 µl Proteinase K hinzugefügt (20 mg/ml, frisch eingewogen oder auch vorher gemischt und eingefroren) und die Suspension bei 65 °C 2 h im Wasserbad inkubiert, bis die Lösung klar ist. Zur Ausfällung der DNA werden die Proben mit 30 µl 5 M NaCl und 1 ml 96 % eisgekühltem Alkohol versetzt und einige Minuten geschwenkt. Ist der DNA-Faden sichtbar präzipitiert, werden die Proben ca. 20 min bei 13000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C oder Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet zweimal mit 70 bis 80 % Alkohol gewaschen und danach 20 min luftgetrocknet. Anschließend wird die DNA in 100 µl H₂O aufgenommen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die OD bestimmt und die DNA auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt.

6.2. Vorhybridisierung der DNA-Arrays

Zu Beginn der Vorhybridisierung werden neue Arrays 5 min in 50 ml 2 x SSPE-Lösung geschwenkt. Gebrauchte Arrays dagegen können in 50 ml aufgekochter Striplösung bei 65 °C für 2 x 20 min geschüttelt und danach wiederverwendet werden. Anschließend werden die Arrays in die Hybridisierungsröhrchen gegeben und mit ca. 30 ml auf 65 °C vorgewärmter Vorhybridisierungslösung im 65 °C warmen Ofen 3 h inkubiert. Derweilen werden die DNA-Sonden markiert und ebenfalls inkubiert.

6.3. Markierung der DNA-Sonden

Für die Markierung eines Reaktionsansatzes werden zuerst 3 µg Gesamt-DNA (bei einer Verdünnung von 0,5 µg/µl) mit 29,5 µl H₂O in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt, bei 95 °C 5 min denaturiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird folgender Ansatz dazu pipettiert:

- 1 µl Random-Hexamer-Primer
- 0,5 µl 5 mM dGTP
- 0,5 µl 5 mM dCTP
- 0,5 µl 5 mM dTTP
- 5 µl Reaktionspuffer
- 2 µl Klenow-Fragment

Die Probe wird dann mit 4 µl (³³P)-markiertem dATP versetzt, vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und 3 h bei 37 °C inkubiert. Pro Array wird immer ein Ansatz benötigt. Je nach Anzahl der Arrays pro Hybridisierungsröhrchen können mehrere Reaktionsansätze vereinigt werden.

6.4. Abtrennung von uninkorporiertem (³³P)-markiertem dATP von der markierten Sonde

Nach Beendigung der Inkubationszeit werden die markierten DNA-Fragmente mit Hilfe von Microspin™ G-50 Columns Gelfiltrationssäulchen (Amersham Pharmacia Biotech inc.) in einem Zentrifugationsschritt von uninkorporiertem (³³P)-dATP getrennt. Dazu resuspendiert man das Säulchen und zentrifugiert den überschüssigen Puffer 1 min bei 4000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C oder Heraeus Biofuge pico) ab. Das Säulchen wird nun in ein spezielles Reaktionsgefäß mit Schraubverschluß gestellt und die fertig inkubierte, abzentrifugierte Sonde mittig auf das Säulchen pipettiert. Das Ganze wird 2 min bei 4000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C oder Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Die nun farblose, gereinigte Sonde wird 5 min bei 95 °C denaturiert und 5 min auf Eis inkubiert, bevor man sie zu den vorhybridisierten Arrays in die Lösung gibt. Die Hybridisierung läuft über Nacht bei 65 °C.

6.5. Waschen der Arrays und Exposition der Phosphorimagerscreens

Am nächsten Tag werden die Arrays dreimal mit einer speziellen Waschlösung gewaschen. Einmal bei Raumtemperatur (RT) und je zweimal 20 min mit 65 °C warmer Lösung. Danach werden die Arrays in Folie eingeschweißt (möglichst luftblasenfrei und leicht getrocknet) und die Phosphorimagerscreens aufgelegt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Phosphorimagerscreens vorher 20 min auf dem Image-Eraser (spezielle Lichtquelle) lagen, um alte Signale zu entfernen. Das Ganze wird 2 bis 3 Tage bei RT, in spezielle Exponierkassetten verpackt, belassen und anschließend über einen geeigneten Phosphoimager analysiert. Die Auswertung des entstandenen Hybridisierungsmusters erfolgt mit Hilfe eines Softwareprogramms (ArrayVision 6.0, St. Catharines, Canada). Die hybridisierten Arrays können eingeschweißt bei -20 °C gelagert werden und nach Aufbereitung (s. o.) wieder verwendet werden. Zur längeren Aufbewahrung sollten die Arrays „gestrippt“ und in Plastik eingeschweißt bei -20 °C gelagert werden.

6.6. Benötigte Lösungen

TNE:

1 M Tris, pH 8

1 M NaCl

0,5 M EDTA

TNEX:

TNE

1 % Triton-X-100

20 x SSPE:

175,3 g NaCl

27,6 g NaH₂PO₄

7,4 g EDTA

ad 800 ml H₂O_{dest.}

Der pH-Wert wird mittels NaOH (ca. 6,5 ml einer 10 N Lösung) auf 7,7 eingestellt und das Ganze auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Striplösung für DNA-Arrays:

10 ml 1 M Tris

2 ml 0,5 M EDTA, pH 7,5

100 ml 10 % SDS

ad 888 ml H₂O_{dest.}

10 % SDS:

100 g SDS

ad 1 l H₂O_{dest.}

Vorhybridisierungslösung für DNA-Arrays (für 2 Röhrchen):

25 ml 20 x SSPE

20 ml 10 % SDS

1 ml Denhardtsche Lösung

1 ml Heringssperma

ad 55 ml H₂O_{dest.}

Denhardtsche Lösung:

2 g Ficoll (MW 400000)

2 g Polyvinylpyrrolidon (MW 40000)

2 g BSA (Bovine Serum Albumine)

ad 100 ml H₂O_{dest.}

Heringssperma:

200 mg auf 20 ml H₂O_{dest.}

Die Suspension wird 20 x 20 s mit Ultraschall behandelt, so dass der DNA-Faden in gleichmäßig große Fragmente zerteilt wird und danach 5 min aufgekocht.

Waschlösung:

25 ml 20 x SSPE

20 ml 10 % SDS

ad 1 l H₂O_{dest.}

IV. Ergebnisse

1. Ausschluss von Mischkulturen unter den untersuchten Isolaten, die mögliche Genomveränderungen im Verlauf der chronischen Harnwegsinfektion aufweisen

Die Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen wurden auf Mac. Conkey Agar ausgestrichen, um auszuschließen, dass Ähnlichkeiten oder Veränderungen im Genom der Stämme, die zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden, durch Vermischung verschiedener Stämme zustande gekommen sind. Dabei stellte sich heraus, dass die Stämme J 171, J 67 und J 989 Mischkulturen waren. Sie bildeten auf Mac. Conkey Agar jeweils helle und rote Kolonien. Damit unterscheiden sie sich in der Fähigkeit Lactose zu spalten. Die Lactose-positive Kolonie (rot) des Stammes J 171 wurde in J 171-1 umbenannt. Beim Stamm J 67 wurde die Lactose-positive Kolonie J 67-1 bezeichnet, der Stamm J 989 wurde zu J 989-1. Die Stämme J 171-1/2, J 172, J 68, J 67-1/2, J 987 und J 989-1/2 wurden damit von der Untersuchung durch die Makroarrays ausgeschlossen.

2. Phänotypische Tests der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen

Zur groben Orientierung über das phänotypische Verhalten der Stämme wurden diese auf Motilität, Hämolysefähigkeit, Fähigkeit zur Fimbrien- und Curli-Bildung getestet.

Tab. 14: Phänotypische Testergebnisse der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen. Die zusammengehörigen Stämme, die von derselben Patienten im Laufe der Infektion abgenommen wurden, sind mit verschiedenen Farben unterlegt.

Stämme	Motilität	Hämolyse	P-Fimbrien	S-Fimbrien	Typ 1-Fimbrien	Curli 30 °C	Curli 37 °C
J 177	0	0	+	+	+	+	+
J 1153	0	0	+	+	+	+	+
J 1199	0	0	+	+	+	+	+
J 1360	0	0	+	+	+	+	+
J 171-1	+	0	0	0	+	+	+
J 171-2	+	0	0	0	+	0	0
J 172	+	0	0	0	+	0	0

Stämme	Motilität	Hämolyse	P-Fimbrien	S-Fimbrien	Typ 1-Fimbrien	Curli 30 °C	Curli 37 °C
J 67-1	+	0	0	0	+	+	+
J 67-2	+	+	0	0	0	0	0
J 68	+	0	0	0	+	+	+
J 987	0	0	+	0	0	0	0
J 989-1	0	0	+	0	0	0	0
J 989-2	0	0	+	0	0	0	0
J 1739	0	0	+	0	+	0	0
J 1745	0	0	+	0	+	+	+

Die Stämme J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 verhielten sich phänotypisch gleich. Das Isolat J 171 wurde aufgrund der Mischkultur in zwei Isolate geteilt. Davon exprimierten die Isolate J 171-2 und 172 die gleichen Faktoren. Sie waren beweglich und bildeten Typ 1-Fimbrien. Der Stamm J 67 wurde ebenso in J 67-1 und J 67-2 aufgeteilt. J 67-1 und J 68 waren beweglich, bildeten Typ1-Fimbrien und Curli. J 67-2 unterschied sich durch die Hämolyseaktivität und die fehlende Fimbrienbildung. Die Stämme J 987 und J 989-1 und -2 bildeten P-Fimbrien. Das Isolat J 1745 bildete gegenüber dem Isolat J 1739 Curli-Adhäsine.

3. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zum Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen

Mit Hilfe der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion wurden die Stämme auf die individuell verschiedene Anwesenheit bestimmter Gene uropathogener *E. coli* Stämme untersucht. In den nachfolgenden Tabellen wurden jeweils nur die vorhandenen Gene zusammengefaßt. Die vollständige Zusammensetzung der Genpools ist Kap. II Tabelle 9 zu entnehmen.

Tab. 15: Multiplex-PCR Muster der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen Die zusammengehörigen Stämme, die von derselben Patienten im Laufe der Infektion abgenommen wurden, sind verschiedenfarbig unterlegt.

Pool	1						2				3			4				5		
Stamm	<i>malX</i>	<i>pap AH</i>	<i>fim H</i>	<i>kps MT III</i>	<i>pap EF</i>	<i>ibe A</i>	<i>fyu A</i>	<i>sfa/foc DE</i>	<i>iut A</i>	<i>kps MT K1</i>	<i>hly A</i>	<i>kps MT II</i>	<i>pap C</i>	<i>cva C</i>	<i>cdt B</i>	<i>tra T</i>	<i>papG allele II</i>	<i>papG II/III</i>	<i>sfs S</i>	<i>kps MT K5</i>
J 177	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+
J 1153	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+
J 1199	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+
J 1360	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+
J 171-1	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+
J 171-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+
J 172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+
J 67-1	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	+
J 67-2	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+
J 68	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	+
J 987	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+
J 989-1	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+
J 989-2	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+
J 1739	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+
J 1745	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+

Die Stämme J 177, J 1153, J 1199, J 1360 besaßen in der Multiplex-PCR dieselben Virulenzfaktoren. Bei den Stämmen J 171-1, J 171-2 und J 172 verhielten sich die Stämme J 171-2 und J 172 jeweils gleich und können als ein Klon angesehen werden. Auch bei den Stämmen J 67-1/2 und J 68 besaßen die Stämme J 67-1 und J 68 dieselben Virulenzfaktoren. J 987 und J 989 dagegen unterschieden sich nicht durch die Anwesenheit der verschiedenen Pathogenitätsfaktoren. Beim letzten Stammpaar J 1739 und J 1745 konnte ein Unterschied in der Anwesenheit des Genes *ibeA* festgestellt werden. J 1745 war *ibeA*-positiv, der Stamm J 1739 nicht. In Abb. 2 und 3 werden beispielhaft die Agarosegele der Multiplex-PCR des Pool 2 und Pool 4 gezeigt.

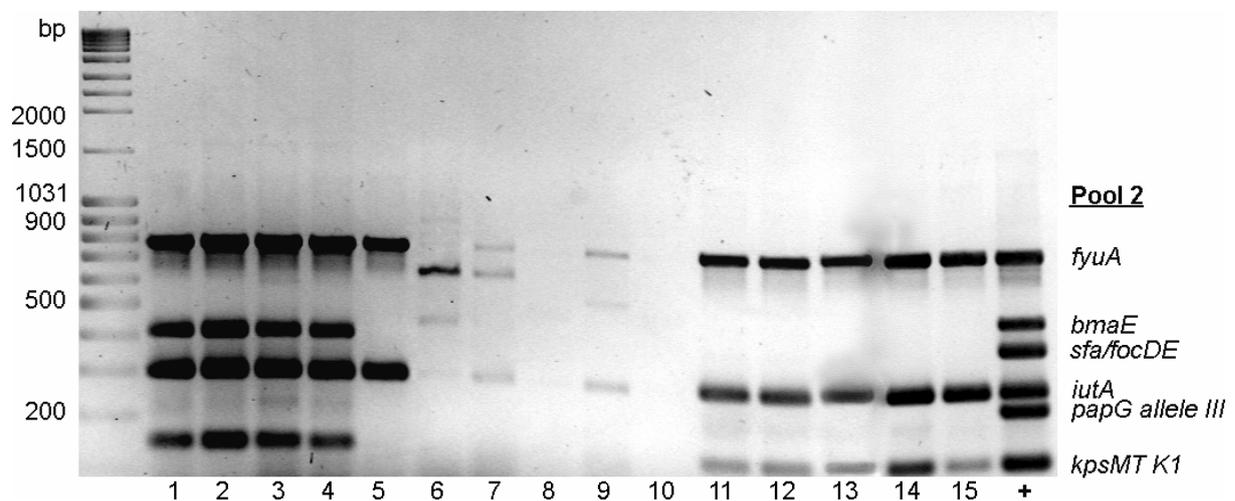


Abb. 2: Bandenmuster der Pool 2-spezifischen Multiplex-PCR.

Spur 1= *E. coli* Stamm J 177, Spur 2= *E. coli* Stamm J 1153, Spur 3= *E. coli* Stamm J 1199, Spur 4= *E. coli* Stamm J 1360, Spur 5= *E. coli* Stamm J 171-1, Spur 6= *E. coli* Stamm J 171-2, Spur 7= *E. coli* Stamm J 172, Spur 8= *E. coli* Stamm J 67-1, Spur 9= *E. coli* Stamm J 67-2, Spur 10= *E. coli* Stamm J 68, Spur 11= *E. coli* Stamm J 987, Spur 12= *E. coli* Stamm J 989-1, Spur 13= *E. coli* Stamm J 989-2, Spur 14= *E. coli* Stamm J 1739, Spur 15= *E. coli* Stamm J 1745, += Positivkontrolle, Pool 2: *fyuA*= ferric uptake yersiniabactin, *bmaE*= M-Adhäsion, *sfa/focDE*= zentrale Region des *sfa/foc*-Operons für S- und F1C-Fimbrien, *iutA*= Aerobactin, *papG allele III*= Allele des *pap*-Operons für P-Fimbrien, *kpsMT K1*= zentrale Region des *kps*-Operons für K1 Kapsel

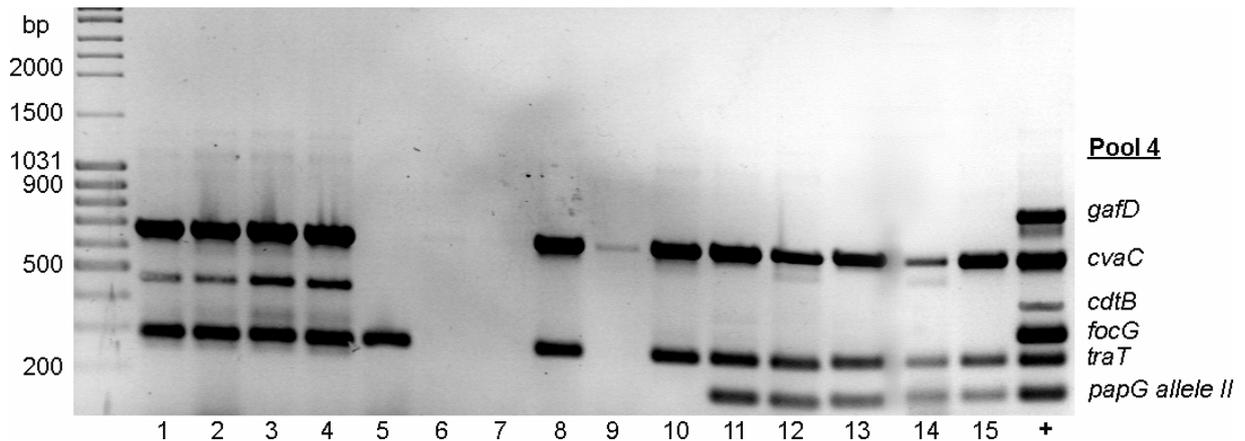


Abb. 3: Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR.

Spur 1= *E. coli* Stamm J 177, Spur 2= *E. coli* Stamm J 1153, Spur 3= *E. coli* Stamm J 1199, Spur 4= *E. coli* Stamm J 1360, Spur 5= *E. coli* Stamm J 171-1, Spur 6= *E. coli* Stamm J 171-2, Spur 7= *E. coli* Stamm J 172, Spur 8= *E. coli* Stamm J 67-1, Spur 9= *E. coli* Stamm J 67-2, Spur 10= *E. coli* Stamm J 68, Spur 11= *E. coli* Stamm J 987, Spur 12= *E. coli* Stamm J 989-1, Spur 13= *E. coli* Stamm J 989-2, Spur 14= *E. coli* Stamm J 1739, Spur 15= *E. coli* Stamm J 1745, += Positivkontrolle, *gafD*=Glucosaminylspezifische G-Fimbrie, *cvaC*= Colicin V, Marker für ColV Plasmid, *cdtB*= cytolethal distending toxin, *focG*= Adhäsion der F1C-Fimbrie, *traT*= Virulenzfaktor auf ColV Plasmid, *papG allele III*= Allele des *pap*-Operons für P-Fimbrien

Beim Vergleich der phäno- und genotypischen Tests stimmten die Ergebnisse bis auf eine Ausnahme überein. Alle Stämme bildeten P- und Typ 1-Fimbrien aus. Curli bildeten mit Ausnahme des Stammes J 1739 alle Stämme. Die Stämme J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 exprimierten zusätzlich S-Fimbrien. Auch genotypisch stimmten diese Ergebnisse bis auf eine Ausnahme überein. *fimH*, welches für die gleichnamige mannosenspezifische Adhäsionseinheit der Typ 1-Fimbrien kodiert, konnte bei allen Stämmen detektiert werden. Die Gene (*sfa/focDE*, *sfaS*), die für Untereinheiten weiterer Fimbrien (S- und F1C-Fimbrien) kodieren, wurden auch nur bei den S-Fimbrien bildenden Stämmen J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 gefunden. Erstaunlicherweise konnten keine P-Fimbrien durch eine spezifische PCR bei den Stämmen J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 nachgewiesen werden, obwohl diese phänotypisch nachweisbar waren. Dieses spricht für einen unspezifischen Nachweis der P-Fimbrien.

4. PFGE I

Veränderungen im Genom einzelner Bakterien lassen sich auch über die PFGE nachweisen. Das Enzym *Xba I* spaltet an einer genau definierten Stellen die DNA (siehe Kap. II, 6.). Unterscheidet sich nun die Anordnung der Gene unter den Isolaten

entstehen verschieden große Spaltprodukte. Besitzen dagegen zwei verschiedene Isolate genau gleich große DNA-Spaltstücke, entsteht ein identisches Bandenmuster und die Stämme sind vermutlich ein Klon. Bei den untersuchten Isolaten von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen zeigte sich, dass die Stämme J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 ein sehr ähnliches Bandenmuster aufwiesen. Der Stamm J 177 besaß jedoch mehrere nicht komplett verdaute große DNA-Stücke. J 1360 zeigte einen Bandenshift im Vergleich zu den drei anderen Isolaten. Die zwei Stämme wurden aufgrund dieses Ergebnisses weiter mit dem K-12 Makroarray und Pathoarray untersucht. Bei den Mischkulturen zeigten die Paare, die sich in der Multiplex-PCR gleich verhalten hatten, dasselbe Bandenmuster. J 67-1 unterschied sich von den Stämmen J 67-2 und J 68, die ein identisches Bandenmuster besaßen. J 171-1 und J 172 wiesen ein identisches Bandenmuster auf, während J 171-2 ein anderes Bandenmuster zeigte. Das Bandenmuster der Stämme J 987 und J 989-1 und -2 und des Stammpaares J 1739 und J 1745 war ebenfalls identisch. Abb. 4 zeigt die Analyse des PFGE Bandenmuster der untersuchten Stämme.

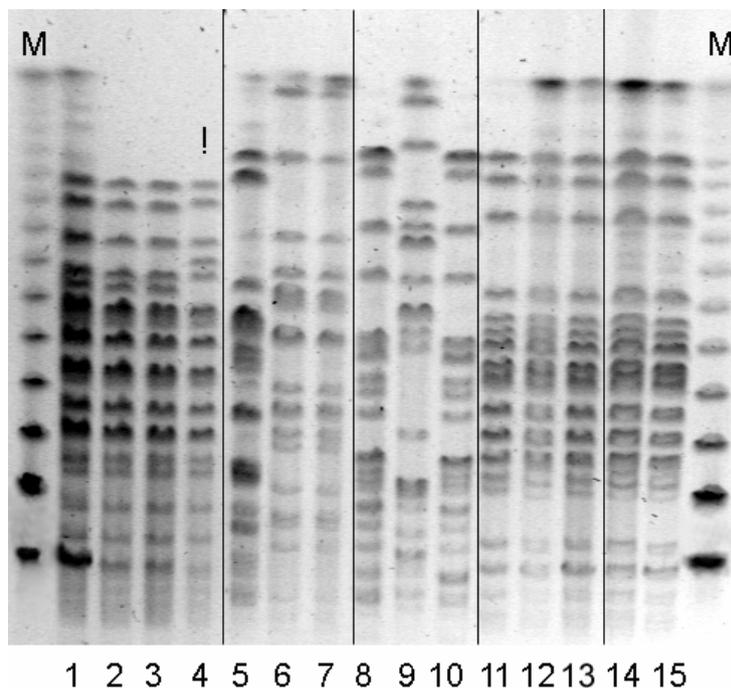


Abb. 4: Analyse I des PFGE-Bandenmuster der untersuchten Isolate nach dem Verdau mit Xba I.

Spur 1= *E. coli* Stamm J 177, Spur 2= *E. coli* Stamm J 1153, Spur 3= *E. coli* Stamm J 1199, Spur 4= *E. coli* Stamm J 1360, Spur 5= *E. coli* Stamm J 171-1, Spur 6= *E. coli* Stamm J 171-2, Spur 7= *E. coli* Stamm J 172, Spur 8= *E. coli* Stamm J 67-1, Spur 9= *E. coli* Stamm J 67-2, Spur 10= *E. coli* Stamm J 68, Spur 11= *E. coli* Stamm J 987, Spur 12= *E. coli* Stamm J 989-1, Spur 13= *E. coli* Stamm J 989-2, Spur 14= *E. coli* Stamm J 1739, Spur 15= *E. coli* Stamm J 1745, M= DNA-Größenmarker

5. Phänotypische Tests weiterer uropathogener Stämme und Fäkalisolate der ECOR-Gruppe B2

Darüber hinaus wurden weitere Stämme, nämlich die L-Formen bildenden Stämme 42, 58 und 70, die Curli-bildenden Stämme DSM6601 und 7117 und ihre Kongorot-

negativen Mutanten sowie die hämolysierenden Stämme 536, 764 und 768 und ihre ahämolytischen Mutanten untersucht.

Tab. 16: Phänotypische Testergebnisse der übrigen untersuchten Stämme. Die zusammengehörigen Stämme sind verschiedenfarbig unterlegt.

Stämme	Motilität	Hämolyse	P-Fimbrien	S-Fimbrien	Typ 1-Fimbrien	Curli 30 °C	Curli 37 °C
42	+	0	0	0	+	0	0
58	0	+	+	0	+	+	0
70	0	0	0	0	+	0	0
DSM6601	+	0	0	0	+	+	+
DSM6601 CR ⁻	0	0	0	0	+	0	0
7117	0	0	0	0	+	+	+
7117 CR ⁻	0	0	0	0	+	0	0
536	+	+	+	+	+	+	0
536-31	+	0	+	+	0	+	+
536-22	+	0	0	+	+	+	+
768	0	+	+	+	+	0	0
768-1	0	0	+	0	0	0	0
764	0	+	0	0	0	0	0
764/3	0	0	+	0	0	0	0
764/4	0	0	+	0	0	0	0
764/5	0	0	+	0	0	0	0
764/6	0	0	+	0	0	0	0
764/7	0	0	+	0	0	0	0
764/8	0	0	+	0	0	0	0

Die Stämme 42, 58 und 70 unterschieden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften. Der Stamm 42 schwärmte und bildete Typ 1-Fimbrien, der Stamm 70 hingegen bildete nur Typ 1-Fimbrien. Der Stamm 58 hämolysierte, bildete P- und Typ 1-Fimbrien und Curli Adhäsine. Der Stamm DSM6601 unterschied sich von seiner Kongorot-negativen Mutante (DSM6601 CR⁻) durch die Bildung von Curli und seine Motilität. Der Stamm 7117 dagegen wich von seiner Kongorot-negativen Mutante (7117 CR⁻) nur durch die Bildung von Curli Adhäsine ab. Der Stamm 536 zeigte alle getesteten Eigenschaften, die ahämolytischen Mutanten 536-31 und -22 zeigten wie erwartet keine Hämolysen. Dem Stamm 536-22 fehlte zusätzlich die Fähigkeit zur P-Fimbrienbildung, 536-31 hingegen die zur Typ 1-Fimbrienbildung. Der Stamm 768 hämolysierte und bildete alle drei Arten von Fimbrien. Die ahämolytische Mutante bildete nur noch P-Fimbrien. Der

Stamm 764 wies Hämolyse auf, wohingegen die sechs ahämolytischen Mutanten nicht hämolysierten, aber P-Fimbrien bildeten.

6. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zum Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren der übrigen uropathogenen Stämme und ECOR B2-Isolate

Mit Hilfe der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion wurden auch die übrigen Stämme auf ihre individuell verschiedene Anwesenheit bestimmter Pathogenitätsfaktoren uropathogener *E. coli* untersucht. In den nachfolgenden Tabellen wurden jeweils nur die vorhandenen Gene abgebildet. Die vollständige Zusammensetzung der Genpools ist Kap. II Tabelle 9 zu entnehmen. Die Stämme 42, 58 und 70 haben demnach eine verschiedene Ausstattung an Pathogenitätsfaktoren. Stamm 42 war *fimH*, *kpsMT K1* und *kpsMT II* positiv, Stamm 70 war *malX*, *fim H*, *ibe A*, *fyu A* und *cdt B* positiv. Stamm 58 zeigte die meisten Pathogenitätsfaktoren für UPEC: *malX*, *papAH*, *fimH*, *papEF*, *fyuA*, *sfa/focDE*, *iutA*, *papG allele III*, *hlyA*, *kpsMT II*, *papC*, *cdtB*, *focG*, *papG allele II*, *kpsMT K5* und *cnf1*. Der Stamm DSM6601 unterschied sich von seiner Mutante DSM6601 CR⁻ nur durch das Fehlen von *sfaS*. Stamm 7117 und 7117 CR⁻ unterschieden sich bezüglich ihres Multiplex-Musters nicht. 764 unterschied sich von einer der ausgewählten ahämolytischen Mutanten nur durch die Anwesenheit von *hlyA*. 768 unterschied sich von der ahämolytischen Mutante 768-1 nicht. Der Stamm 536 und seine ahämolytischen Mutanten zeigten wiederum individuell verschiedene Muster, die der Tabelle zu entnehmen sind. Interessant ist, dass die ahämolytische Mutante 536-31 *hlyA* positiv war, der ebenfalls ahämolytische Stamm 536-22 jedoch nicht.

Tab. 17: Multiplex-PCR Muster der untersuchten Isolate. Die zusammengehörigen Stämme sind verschieden unterlegt. Die Ergebnisse des Stammes 536 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Pool	1					2					3			4					5			
Stamm	<i>malX</i>	<i>papAH</i>	<i>fimH</i>	<i>papEF</i>	<i>ibeA</i>	<i>fyuA</i>	<i>sfa/focDE</i>	<i>iutA</i>	<i>papG</i> allele III	<i>kpsMT</i> K1	<i>hlyA</i>	<i>kpsMT</i> II	<i>papC</i>	<i>cvaC</i>	<i>cdtB</i>	<i>focG</i>	<i>traT</i>	<i>papG</i> allele II	<i>PapG</i> II/III	<i>sfsS</i>	<i>kpsMT</i> K5	<i>cnf1</i>
42	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+
70	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
DSM6601	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0
DSM6601 CR ⁻	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0
7117	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0
7117 CR ⁻	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0
764	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0
764/6	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0
536	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	0
536-22	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
536-31	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0
768	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0
768-1	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0

Die Abbildungen 5 bis 8 zeigen beispielhaft die Bandenmuster der verschiedenen Stämme der Multiplex-PCR auf Agarosegel.

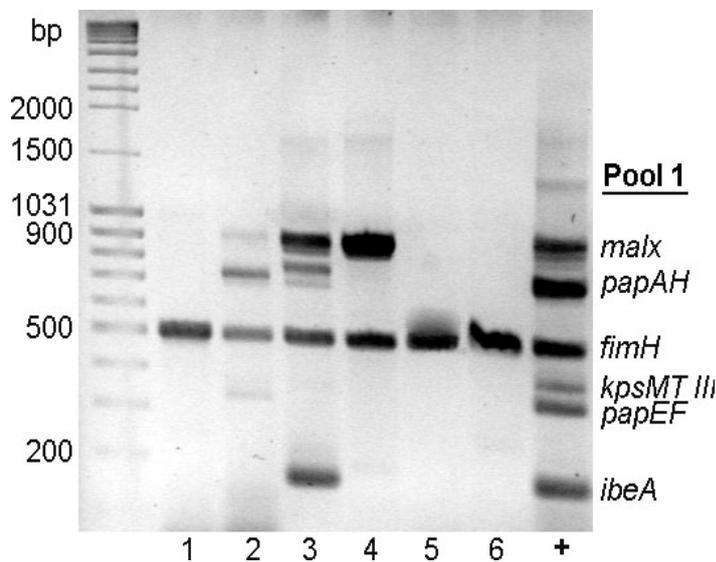


Abb. 5: Bandenmuster der Pool 1-spezifischen Multiplex-PCR I.

Spur 1= *E. coli* Stamm 42, Spur 2= *E. coli* Stamm 58, Spur 3= *E. coli* Stamm 70, Spur 4= *E. coli* Stamm DSM6601 CR⁻, Spur 5= *E. coli* Stamm 7117, Spur 6= *E. coli* Stamm 7117 CR⁻, += Positivkontrolle, malX= PAI von CFT073, papAH= A- und H-Region im pap-Operon, fimH= Typ 1-Fimbrienadhäsion, kpsMT III= zentrale Region des kps-Operons für Gruppe II Kapseln, papEF= E- und F-Region im pap-Operon, ibeA= invasion of brain endothelium

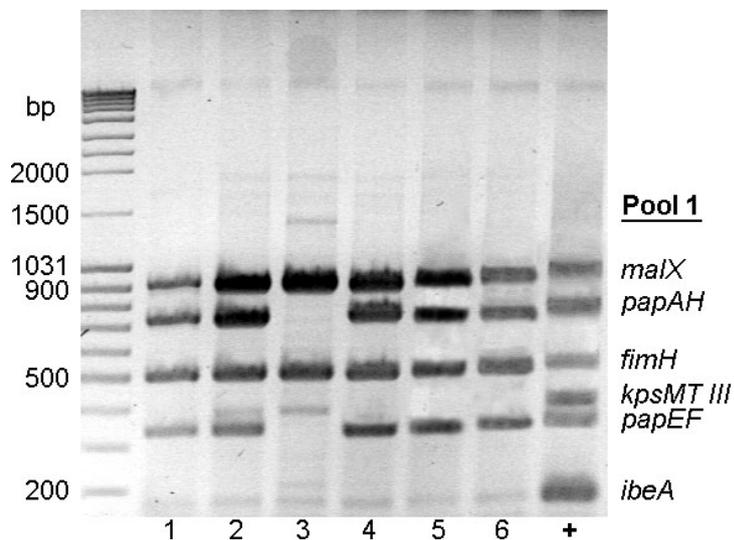


Abb. 6: Bandenmuster der Pool 1-spezifischen Multiplex-PCR II.

Spur 1= *E. coli* Stamm 764, Spur 2= *E. coli* Stamm 764/6, Spur 3= *E. coli* Stamm 536-22, Spur 4= *E. coli* Stamm 536-31, Spur 5= *E. coli* Stamm 768, Spur 6= *E. coli* Stamm 768-1, += Positivkontrolle, malX= PAI von CFT073, papAH= A- und H-Region im pap-Operon, fimH= Typ1-Fimbrienadhäsion, kpsMT III= zentrale Region des kps-Operons für Gruppe II Kapseln, papEF= E- und F-Region im pap-Operon, ibeA= invasion of brain endothelium

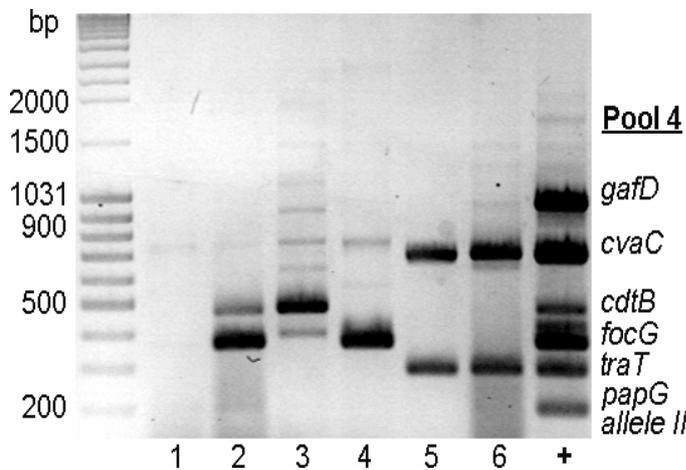


Abb. 7: Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR I.

Spur 1= *E. coli* Stamm 42, Spur 2= *E. coli* Stamm 58, Spur 3= *E. coli* Stamm 70, Spur 4= *E. coli* Stamm DSM6601 CR⁻, Spur 5= *E. coli* Stamm 7117, Spur 6= *E. coli* Stamm 7117 CR⁻, += Positivkontrolle, *gafD*= Glucosaminylspezifische G-Fimbrie, *cvaC*= Colicin V, Marker für ColV Plasmid, *cdtB*= cytolethal distending toxin, *focG*= Adhäsion der F1C-Fimbrie, *traT*= Virulenzfaktor auf ColV Plasmid, *papG allele II*= Allele des *pap*-Operons für P-Fimbrien

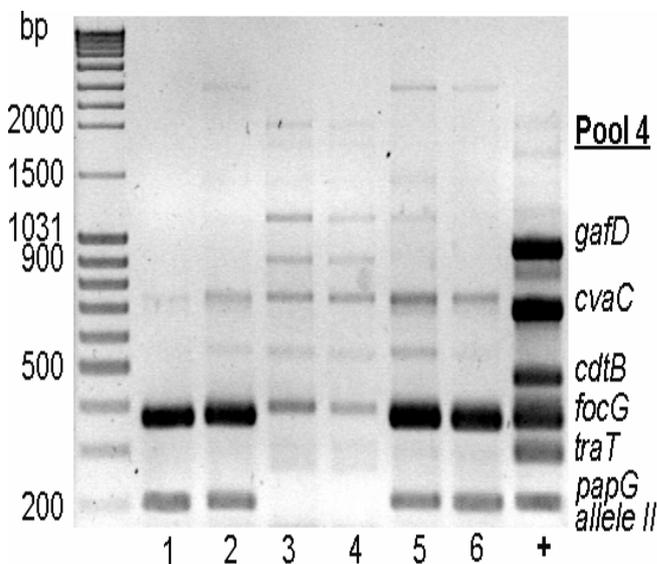


Abb. 8: Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR II.

Spur 1= *E. coli* Stamm 764, Spur 2= *E. coli* Stamm 764/6, Spur 3= *E. coli* Stamm 536-22, Spur 4= *E. coli* Stamm 536-31, Spur 5= *E. coli* Stamm 768, Spur 6= *E. coli* Stamm 768-1, += Positivkontrolle, *gafD*=Glucosaminylspezifische G-Fimbrie, *cvaC*= Colicin V, Marker für ColV Plasmid, *cdtB*= cytolethal distending toxin, *focG*= Adhäsion der F1C-Fimbrie, *traT*= Virulenzfaktor auf ColV Plasmid, *papG allele II*= Allele des *pap*-Operons für P-Fimbrien

7. PFGE II

Beim Vergleich der verschiedenen Spaltmuster der übrigen uropathogenen Isolate und Stämme der ECOR Gruppe-B2 zeigte sich, dass die Stämme 42, 58 und 70 ein jeweils individuelles Bandenmuster beim Verdau mit dem Enzym *Xba I* hatten. Der Stamm 764 und die ahämolytischen Mutanten 1 bis 6 zeigten ein verschieden großes Fragment im Mbp-Bereich, wobei die Klone untereinander dasselbe Spaltmuster besaßen. Die Stämme 768 und 768-1 besaßen mit Ausnahme eines Fragments auch ein ähnliches Bandenmuster. Abbildung 9 zeigt die Analyse des PFGE-Bandenmuster der genannten Stämme.

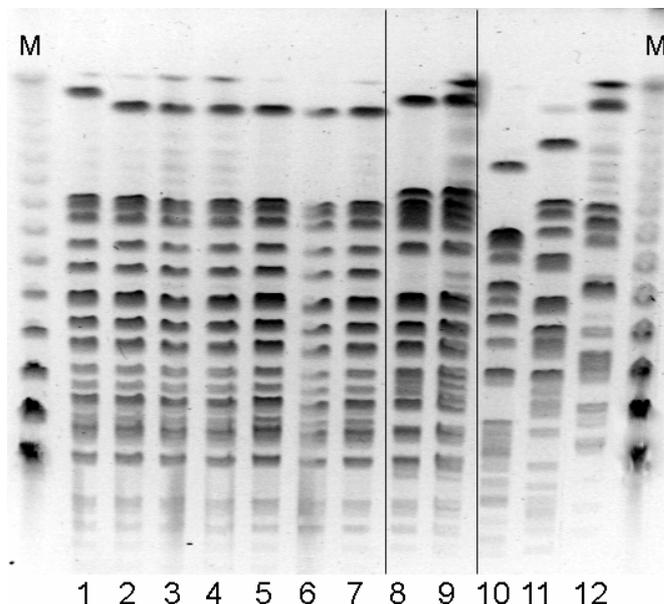


Abb. 9: Analyse II des PFGE-Bandenmuster der untersuchten Isolate nach dem Verdau mit *Xba I* Spur 1= *E. coli* Stamm 764, Spur 2= *E. coli* Stamm 764/3, Spur 3= *E. coli* Stamm 764/4, Spur 4= *E. coli* Stamm 764/5, Spur 5= *E. coli* Stamm 764/6, Spur 5= *E. coli* Stamm 764/7, Spur 7= *E. coli* Stamm 764/8, Spur 8= *E. coli* Stamm 768, Spur 9= *E. coli* Stamm 768-1, Spur 10= *E. coli* Stamm 42, Spur 11= *E. coli* Stamm 58, Spur 12= *E. coli* Stamm 70, M= DNA-Größenmarker

Die Stämme DSM6601 und 7117 mit den dazugehörigen nicht-Curli-bildenden Mutanten wiesen ein identisches PFGE-Muster auf, wohingegen die Stämme 536, 536-22 und 536-31 ein jeweils eigenes Spaltmuster zeigten. Abbildung 10 zeigt das Bandenmuster der genannten Stämme.

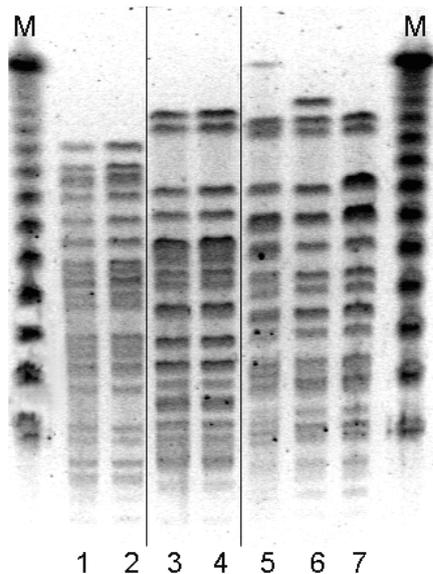


Abb. 10: Analyse III des PFGE-Bandenmuster der untersuchten Isolate nach dem Verdau mit Xba I

Spur 1= *E. coli* Stamm DSM6601, Spur 2= *E. coli* Stamm DSM6601 CR, Spur 3= *E. coli* Stamm 7117, Spur 4= *E. coli* Stamm 7117 CR, Spur 5= *E. coli* Stamm 536, Spur 6= *E. coli* Stamm 536-22, Spur 7= *E. coli* Stamm 536-31, M= DNA-Größenmarker

8. Ausstattung der Stämme mit Pathogenitätsfaktoren und Vergleich mittels Pathoarray

8.1. Vergleich der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen

Bei der Untersuchung der Stammpaare mittels Pathoarray lässt sich feststellen, dass die zum früheren Zeitpunkt abgenommenen Stämme weniger Gene für Pathogenitätsfaktoren besaßen als die zu den späteren Zeitpunkten gewonnenen Isolate. Stammpaar 1 (J 177/ J 1360) unterschied sich insgesamt in der An- und Abwesenheit von 57 Pathogenitätsfaktoren, Stammpaar 2 (J 1739/ J 1745) in 92. Die einzelnen Faktoren können der Tabelle 22 des Anhangs entnommen werden. Der mit der Multiplex-PCR festgestellte Unterschied der Stämme J 1739 und J 1745 bezüglich *ibeA* konnte auch mit dem Pathoarray nachgewiesen werden. Bei der Herkunft der Pathogenitätsfaktoren zeigte sich, dass beim Stamm J 177 57,6 % seiner Pathogenitätsfaktoren PAI-spezifische waren, 34,8 % der Pathogenitätsfaktoren ExPEC-typisch und nur 7,6 % Markergene von IPEC. Beim Stamm J 1360 war die Verteilung ähnlich (54,9 % PAI-, 32,4 % ExPEC-spezifisch), der Stamm besaß jedoch fast doppelt so viele IPEC-typische Faktoren (12,7 %). Beim Stammpaar 2 zeigten sich die gleichen Ergebnisse. J 1739 hatte 61,3 % PAI-spezifische Faktoren, 33,3 % ExPEC- und 5,4 % IPEC-Markergene. J 1745 wies 49,6 % PAI-spezifische, 36,2 % ExPEC- und mit 14,2 % fast dreimal so viele IPEC-typische Pathogenitätsfaktoren auf.

Tab. 18: Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen Die verschiedenfarbig unterlegten Stämme sind ein zu vergleichendes Paar.

	Stammpaar 1		Stammpaar 2	
	J 177 n=118	J 1360 n=173	J 1739 n=111	J 1745 n=127
PAI-spezifische Gene, n=212	68	95	68	63
ExPEC Markergene, n=103	41	56	37	46
IPEC Markergene, n=88, davon:	9	22	6	18
41 EHEC/ EPEC	5	14	2	9
14 ETEC	2	3	1	4
28 EIEC	2	3	3	3
5 EAEC	0	2	0	2

8.2. Nachweis von Virulenz- oder PAI-assoziierten Genen bei den übrigen uropathogenen Stämmen und ECOR B2-Isolaten 42, 58, 70, DSM6601, 7117 sowie deren Kongorot-negativen Mutanten

Die Stämme 42, 58 und 70 zeigten eine individuell verschiedene Ausstattung an Pathogenitätsfaktoren. Stamm 42 und 70 besaßen 42 gleiche Faktoren, deren Auflistung Tabelle 22 im Anhang zu entnehmen ist. Die Aufteilung der Pathogenitätsfaktoren war ähnlich. Stamm 42 besaß 30,9 % PAI-spezifische, 39,7 % ExPEC-spezifische und 29,4 % IPEC-spezifische Gene. Stamm 70 wies 39,4 % PAI-spezifische, 38 % ExPEC-spezifische und 26,8 % IPEC-spezifische Gene auf. Stamm 58 unterschied sich von den beiden anderen Stämmen. Stamm 58 besaß deutlich mehr Pathogenitätsfaktoren, was sich bereits bei der phänotypischen Testung und in der Multiplex-PCR zeigte. Die Gliederung nach der Herkunft der Gene ergab 65,5 % PAI-spezifische Gene, 25 % ExPEC-typische und nur 9,5 % IPEC-typische Gene. Die Stämme DSM6601 CR⁻ und 7117 CR⁻ zeigten jeweils eine verringerte Anzahl von Pathogenitätsfaktoren im Vergleich zu den Ausgangsstämmen. Prozentual verringerte sich am deutlichsten die Anzahl der IPEC Markergene (DSM6601 10 % → DSM6601 CR⁻ 4,4 %, 7117 11,3 % → 7117 CR⁻ 6,2 %).

Tab. 19: Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der übrigen uropathogenen Isolate und Stämme der ECOR Gruppe-B2. Die verschiedenfarbig unterlegten Stämme sind ein zu vergleichendes Paar.

	42 n=68	58 n=220	70 n=71	DSM6601 n=190	DSM6601 CR ⁻ n=137	7117 n=115	7117 CR ⁻ n=65
PAI-spezifische Gene, n=212	21	144	28	122	93	72	46
ExPEC Markergene, n=103	27	55	27	49	38	30	15
IPEC Markergene, n=88, davon:	20	21	16	19	6	13	4
41 EHEC/ EPEC	15	11	12	12	3	6	1
14 ETEC	3	4	3	3	0	3	0
28 EIEC	1	3	1	2	2	3	3
5 EAEC	1	2	0	2	2	1	0

8.3. Vergleich des *E. coli* Stammes 536 und seiner ahämolytischen Mutanten

Die Stämme 536(1) und 536-21 wurden bereits in anderen Arbeiten verwendet und hier zur Verfügung gestellt. Beim Vergleich der beiden identischen Stämme 536(1) und 536 fiel auf, dass der Stamm 536(1) 14 Gene mehr besitzt, als bei den anderen Hybridisierung des Stammes 536 nachweisbar waren. Die ahämolytischen Klone besaßen allgemein weniger Pathogenitätsfaktoren als die Ausgangsstämme. Besonders die PAI-spezifischen ORFs, zu denen auch die *hly*-Cluster auf PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ gehören, waren weniger häufig nachweisbar. Beim Vergleich der beiden Stämme 536-22 und -31 zeigte sich, dass die Anzahl der EHEC/EPEC-spezifischen ORFs prozentual von 2 % beim Stamm 536 auf 14,1 % bei 536-22 und 4,5 % bei 536-31 stiegen.

Tab. 20: Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der ahämolytischen Mutanten des Stammes 536 und des Wildtyps. Die Ergebnisse der Stämme 536(1) und 536-21 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

	536(1) n=260	536-21 n=187	536 n=246	536-22 n=213	536-31 n=221
PAI-spezifische Gene, n=212	210	140	196	134	165
ExPEC Markergene, n=103	49	41	45	49	46
IPEC Markergene, n=88,	7	6	5	30	10
davon:	4	4	2	21	7
41 EHEC/ EPEC	1	1	1	5	1
14 ETEC	1	0	1	1	1
28 EIEC	1	1	1	3	1
5 EAEC					

Die Stämme 764(1) und 764_2 wurden ebenso bereits in anderen Arbeiten verwendet und hier zur Verfügung gestellt. Beim Vergleich der beiden identischen Stämme 764(1) und 764 fiel wieder die unterschiedliche Gesamtzahl an Pathogenitätsfaktoren auf. Die ahämolytischen Klone besaßen jedoch mehr Pathogenitätsfaktoren als die Ausgangsstämme, mit Ausnahme des Stammes 768-1. Die Stämme 768 und 768-1 besaßen prozentual mehr IPEC-typische ORFs (768: 13,3 %, 768-1: 13,1 %).

Tab. 21: Gliederung der mit dem Pathoarray nachgewiesenen Gene der ahämolytischen Isolate der ECOR-Gruppe B2 Stämme 764 und 768. Die verschiedenfarbig unterlegten Stämme sind ein zu vergleichendes Paar. Die Ergebnisse der Stämme 764(1) und 764_2 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

	764(1) n=197	764_2 n=199	764 n=160	764/6 n=169	768 n=233	768-1 n=222
PAI-spezifische Gene, n=212	131	122	116	115	148	137
ExPEC Markergene, n=103	50	53	37	47	54	56
IPEC Markergene, n=88, davon:	16	24	7	7	31	29
41 EHEC/ EPEC	8	16	3	4	20	13
14 ETEC	3	3	0	0	4	6
28 EIEC	3	3	3	2	4	6
5 EAEEC	2	2	1	1	3	4

8.4. Nachweis des α -Hämolsingenclusters bei verschiedenen *E. coli* Isolaten

Bei der Beurteilung der *hly*-Gencluster des Stammes 536, die auf PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ liegen, zeigte sich, dass die ahämolytischen Klone der Stämme jeweils verschiedene Veränderungen zeigten, die eventuell den Verlust der Hämolysefähigkeit erklären. Beim Stamm 536-21 fehlte sowohl auf PAI I₅₃₆ als auch auf PAI II₅₃₆ *hlyA*, beim Stamm 768-1 fehlte dagegen nur *hlyC*. Bei den Stämmen 536-22, 764_2 und 764/6 fehlten beide Cluster ganz. Der Stamm 536-31 besaß dagegen beide Cluster komplett, war jedoch phänotypisch nicht in der Lage zu hämolysieren. Die Ergebnisse des Pathoarray stimmten bezüglich des *hlyA*- Nachweises mit dem Ergebnis der Multiplex-PCR überein.

Tab. 22: Pathoarray-basierter Nachweis des *hlyCABD*-Genclusters bei verschiedenen Isolaten.
Die Ergebnisse der Stämme 536(1), 536-21, 764(1) und 764_2 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

		536(1)	536-21	536	536-22	536-31	764(1)	764_2	764	764/6	768	768-1
<i>hlyC</i>	PAI I	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0
<i>hlyA</i>		+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyB</i>		+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyD(2)</i>		+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyD</i>		+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyD</i>	PAI II	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyD</i>		+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyB</i>		+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyA</i>		+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+
<i>hlyC</i>		+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0

8.5. Grafische Darstellung der mit dem Pathoarray in den untersuchten Stämme nachgewiesenen Virulenz- und PAI-assoziierten Genen

Abb. 11 zeigt die grafische Darstellung der nachgewiesenen Gene in den untersuchten Stämmen. Die schwarzen Bereiche markieren ein vorhandenes Gen. Die Stämme 764_1, 764(1), 536(1) und 536-21 wurden bereits in anderen Arbeiten untersucht und hier zur Verfügung gestellt.

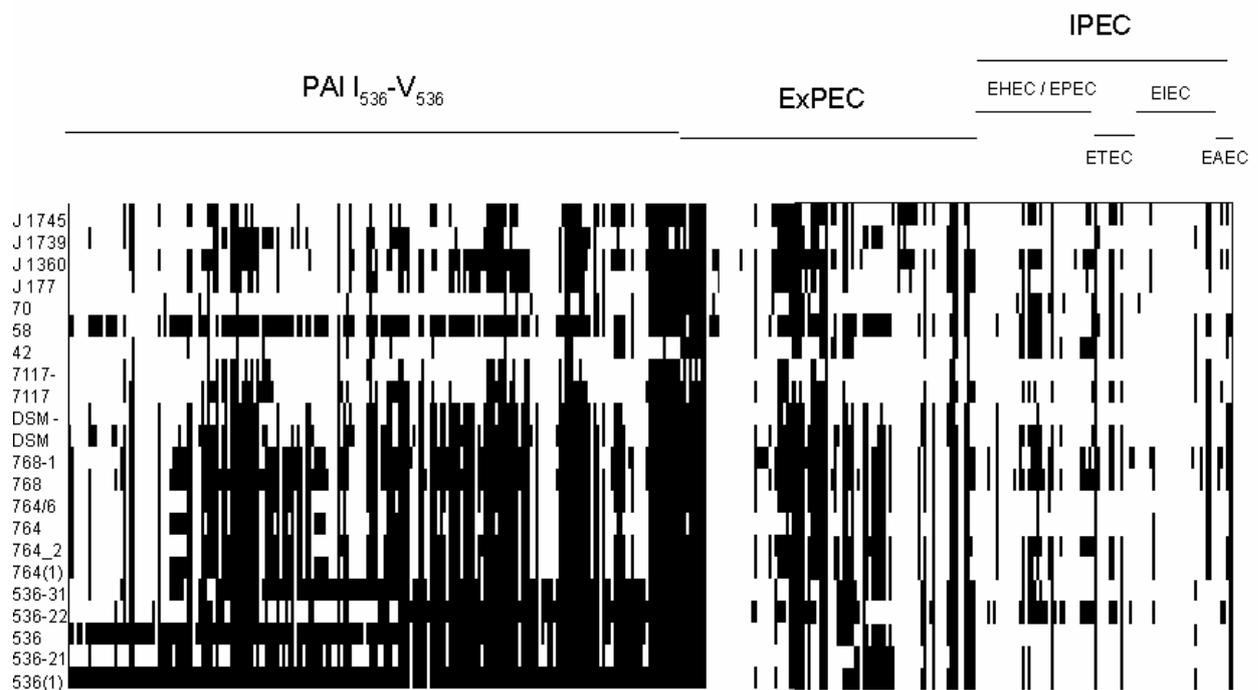


Abb. 11: Grafische Darstellung der mit dem Pathoarray in den untersuchten Stämme nachgewiesenen Virulenz- und PAI-assoziierten Gene.

9. Nicht nachweisbare Genomteile der untersuchten Stämme gegenüber dem *E. coli* K-12 Stammes MG1655

Tab. 22 fasst die Anzahl der fehlenden Gene der untersuchten Stämme gegenüber dem K-12 Stamm MG1655 zusammen. Die Anzahl der Gene, die nicht nachgewiesen werden konnten, war variabel. Sie reichte von 182 beim Stamm J 1739 bis 372 beim Stamm 764. Ein Großteil dieser Gene hat bislang noch unbekannte Funktion. Eine Auswahl an interessanten Genen mit bekannter Funktion, die in manchen Stämmen fehlten, werden genauer in V. Diskussion dargestellt. Die Stämme 536, 536_21 und DSM6601 wurden bereits in anderen Arbeiten untersucht und die Ergebnisse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tab. 23: Nicht nachweisbare Genomteile der untersuchten Stämme gegenüber dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655 Die Ergebnisse des Stämme 536, 536_21 und DSM6601 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Stamm	J 177	J 1360	J 1739	J 1745	536	536-31	536-21	768	768-1	DSM6 601	DSM6 601-	7117	7117-	764	764-6
Anzahl fehlender Gene	192	220	182	251	375	309	365	203	233	393	309	350	284	372	304
Anzahl Gene unbekannter Funktion	135	139	123	173	201	199	200	141	157	173	210	217	179	201	204
Kohlenhydratkatabolismus	2	2	2	3	1	3	1	2	2	5	1	4	2	3	3
Regulatorfunktion	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	3	0
Vermutlich Regulatorfunktion	2	2	3	2	17	5	17	3	4	16	4	2	1	16	4
Phage, Transposon, Plasmid	15	20	16	17	41	25	31	15	18	35	18	25	22	18	19
Zellstruktur	11	9	9	13	29	18	28	9	14	28	18	13	10	36	21
Membranproteine	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	0	0	1	1
Strukturproteine	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
Transport- und Bindeproteine	2	6	4	6	14	5	14	4	3	10	0	5	5	11	4
Vermutlich Transportproteine	1	2	2	1	6	8	6	4	2	4	2	1	0	11	4
Zellprozesse	4	4	3	3	13	5	13	3	4	12	5	6	4	18	7
Vermutlich Chaperone	3	2	2	3	3	3	3	2	3	4	3	1	1	6	3
Energiestoffwechsel	1	3	1	1	3	4	3	2	3	3	2	6	6	8	3
DNA Replikation, Rekombination, Modifikation und Reparatur	3	3	4	4	7	5	7	3	3	8	7	11	5	4	5
Transkription, RNA Modifikation	2	5	1	6	4	4	4	2	2	4	7	8	7	1	4

IV. Ergebnisse

Translation, posttranslationale Modifikation	1	4	2	2	4	2	4	0	3	4	4	10	3	9	1
Stamm	J 177	J 1360	J 1739	J 1745	536	536-31	536-21	768	768-1	DSM6 601	DSM6 601-	7117	7117-	764	764-6
Aminosäurebiosynthese und Stoffwechsel	3	4	2	2	7	3	7	4	5	7	6	8	8	4	6
Nukleotidbiosynthese und Stoffwechsel	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Fettsäuren- und Phospholipidstoffwechsel	0	0	0	0	3	0	3	0	0	4	0	0	0	1	0
Intermediärstoffwechsel	1	4	2	3	8	10	8	1	4	10	8	13	12	6	4
Biosynthese von Kofaktoren, Carrier usw.	0	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	4	0	1
Vermutlich Enzyme	4	7	3	8	6	7	7	4	3	8	6	11	11	10	7
andere	1	1	1	1	5	2	5	2	1	0	5	4	2	5	2

Demzufolge sind die meisten der fehlenden Gene noch von unbekannter Funktion. Gengruppen aus denen häufig Gene fehlen sind z. B. Phage/Transposon/Plasmide oder Zellstrukturgene. Selten oder nie fehlen Gene z. B. aus den Gruppen Stoffwechsel, Strukturproteine oder Regulatorfunktion. Diese scheinen konserviert zu sein.

V. Diskussion

Vertreter der Art *E. coli* sind sehr vielfältig. Man findet sie in verschiedenen Wirtsorganismen (große und kleine Säuger, Vögel). Dort leben sie hauptsächlich in der intestinalen Flora. Neben harmlosen Kommensalen existieren verschiedene *E. coli* Pathotypen, die verschiedenste Infektionen verursachen können (Hacker und Kaper, 1999). Dies lässt auf eine große Diversität in Bezug auf die genetische Ausstattung der Bakterien schließen (Nataro und Kaper, 1998; Kaper et al. 2004). Die verschiedenen *E. coli* Varianten unterscheiden sich nicht nur in der Größe des Genoms, der Art ihrer mobilen genetischen Elemente sowie ihrer Virulenzfaktoren, sondern auch in ihren Phänotypen. Aufgrund dieser geno- und phänotypischen Diversität, stellt *E. coli* einen interessanten Modellorganismus für das Studium bakterieller Evolution auf genomischer Ebene dar. Die Grundlage für die Genomplastizität beruht auf dem Auftreten von Punktmutationen und Rekombination. Diese Mechanismen führen dazu, daß es zu DNA-Rearrangements, Deletionen, aber auch Integration von fremder DNA kommt. Die fremde DNA wird zumeist durch horizontalen Gentransfer erworben. Dies bedeutet, dass genetisches Material, z. B. durch mobile Elemente wie Phagen, Plasmide oder genomische Inseln aufgenommen wird (siehe I. Tab. 4) (Nataro und Kaper, 1998; Ochmann und Jones, 1999; Dobrindt et al., 2004). Weitere mobile Elemente wie Transposons und IS Elemente können sich zwar innerhalb eines Genomes bewegen, sind beim horizontalen Gentransfer aber auf Transportvehikel angewiesen, um von einer Zelle in eine andere zu gelangen. Bei pathogenen Bakterien handelt sich es bei dem genetischen Material neben vielen anderen Funktionen z. B. um Virulenzfaktoren. Oft sind diese Virulenzgene Teile von „Pathogenitätsinseln“ (PAIs), die durch ihre Anwesenheit in pathogenen und ihre Abwesenheit oder nur sporadisches Vorkommen in weniger pathogenen oder apathogenen Stämmen einer Spezies oder verwandten Spezies charakterisiert sind (Hacker et al., 1990; Blum et al., 1994; Hacker und Kaper, 1999). Jedoch auch der Verlust von DNA kann die Pathogenität von Bakterien erklären. So z. B. wenn das verlorene Stück als Virulenzrepressor fungiert (Nakata et al., 1993; Maurelli et al., 1998). Diese flexiblen Teile machen das Genom extrem dynamisch. Daneben verfügt jedes Bakterium auch über einen konservierten Teil seines Genomes (core genome). Dieser umfasst die Gene, die für die grundlegenden zellulären Prozesse essentiell sind.

Zur Erforschung der genetischen Variabilität mittels vergleichender Genomanalysen haben sich DNA-Arrays als eine sehr effektive Methode herausgestellt. Vom Prinzip her immer ähnlich, hybridisieren markierte, einzelsträngige DNA-Sonden mit einzelsträngigen DNA-Fragmenten, die auf einem festen Untergrund, z. B. Glas oder eine Nylonmembran, aufgebracht wurden. In dieser Arbeit wurden neben einem *E. coli*-spezifischen DNA-Array, auf dem Sonden für alle translatierbaren Open Reading Frames (ORFs) des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 aufgespottet sind, ein Pathoarray, auf dem Sonden spezifisch für virulenzassoziierte Gene von verschiedenen *E. coli* Pathovaren und *Shigella* etc. aufgespottet sind, verwendet. Das entstandene Hybridisierungsmuster gibt nach der Auswertung Einblick in die genetische Divergenz der verschiedenen Stämme.

1. Vergleich der Isolate von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen

1.1. Vergleich von UPEC Isolaten zweier Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen, die zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden.

Die erste Stammauswahl umfasste sechs Isolate (uropathogene und fäkale Isolate) von zwei Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen. Die Stämme wurden zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion abgenommen und schon in Vorgängerarbeiten genauer phänotypisch und genotypisch untersucht (Brauchle, 2001). Es sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob die Stämme J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 der ersten Patientin sowie J 1739 und J 1745 der zweiten Patientin Isolate einer Variante darstellen, welche die jeweilige Patientin dauerhaft infiziert hat oder ob es im Krankheitsverlauf zu einer Neuinfektion mit einem anderen Stamm gekommen war. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich im Falle einer dauerhaften Infektion mit einem *E.coli* Stamm die Isolate im fortschreitenden Verlauf der Infektion in ihrer genetischen Ausstattung verändert haben. Bei Neuinfektionen stellt bei Mensch und Tier die Fäkalflora das Reservoir für neue *E. coli* Stämme dar (Moblely et al., 1994; Warren, 1996; Herias et al.; 1997; Mühldorfer et al., 2001; Johnson und Kaster, 2003). In den vorangehenden phänotypischen Tests verhielten sich die Stämme identisch. Auch genotypisch stimmten diese Ergebnisse bis auf eine Ausnahme überein. Erstaunlicherweise konnten keine P-Fimbriendeterminanten bei den Stämmen J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 durch PCR nachgewiesen werden, obwohl diese

phänotypisch nachweisbar waren. Passend dazu erfolgte kein Nachweis der Toxingene *hlyCABD* und *cnf1*, die häufig mit P-Fimbrien-kodierenden Genclustern assoziiert sind (Hacker et al., 1997; Hacker und Kaper 1999; Hacker et al., 1999). Auch phänotypisch waren die Stämme ahämolytisch. Im Pathoarray konnten übereinstimmend dazu keine Gene für P-Fimbrien, Hämolysin oder CNF1 detektiert werden. Dies zeigt die Unsicherheit der phänotypischen Tests. Eventuell kann postuliert werden, dass die für die Tests benutzten Schafserythrozyten auch durch andere Fimbrien, die von UPEC in großer Zahl produziert werden, agglutiniert werden und somit falsch positiv gewertet werden. Aufgrund der großen phäno- und genotypischen Ähnlichkeit wurde zur weiteren Differenzierung der Stämme eine Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt. Bei den Stämmen J 177, J 1153, J 1199 und J 1360 fand sich ein sehr ähnliches Bandenmuster. Jedoch war beim Restriktionsfragmentmuster des Stammes J 1360 ein Bandenshift im Vergleich zu den Fragmentmustern der drei anderen fraglichen Isolaten der Patientin einsichtbar. Die zwei Stämme J 177 und J 1360 wurden aufgrund dieser einerseits vorhandenen Ähnlichkeit, aber den andererseits nachgewiesenen geringen Unterschieden weiter genotypisch mit dem Pathoarray und dem K-12 Makroarray analysiert. Die Stämme J 1739 und J 1745 zeigten zwar ein identisches Spaltpattern im Pulsfeldgel, wurden jedoch aufgrund der geringen Unterschiede in der Multiplex-PCR hinsichtlich der Präsenz des *ibeA* Gens weiter untersucht.

Die Stämme J 171-1/2, J 172, J 68, J 67-1/2, J 987 und J 989-1/2 wurden nicht durch DNA-DNA Hybridisierung weiter differenziert, weil bereits in den Voruntersuchungen festgestellt wurde, dass es sich dabei um Mischkulturen handelt. Aus diesem Grunde deuteten auftretende geno- und phänotypische Unterschiede zwischen der Mischkultur und dem früheren Isolat nicht auf genetische Veränderungen im Infektionsverlauf hin.

Die DNA-DNA Hybridisierung mittels Pathoarray der ausgewählten Stämme J 177 und J 1360 der ersten Patientin und J 1739 und J 1745 der zweiten Patientin ergaben einige Unterschiede in der individuellen Genausstattung der jeweiligen Stammpaare. Die Verteilung bezüglich der Herkunft der Pathogenitätsfaktoren (PAI-spezifische, ExPEC und IPEC Gene) der Stämme war zwar ähnlich, die zum späteren Zeitpunkt abgenommenen Stämme J 1360 bzw. J 1745 besaßen jedoch als auffälligsten Unterschied fast doppelt so viele „IPEC-spezifische“ Gene (J 1360: 12,7 % vs. J 177:

7,6 % bzw. J 1739: 5,5 % vs. J 1745: 14,2 %). Es muss also demnach doch eher von einer Neuinfektion mit einem Stamm aus dem vorhandenen Fäkalreservoir ausgegangen werden. Ein Teil dieser IPEC Gene ist unbekannter Funktion. Einige dieser Gene kodieren für verschiedene Untereinheiten von Adhäsinen z. B. *dafaD* (diffuse adherence fibrillar adhesine), *cooA* (CS 1 Pili) und *tia* (Adhäsine, tia-PAI, intestinal, nur J 1745). Ebenfalls detektiert werden konnten Gene für Fimbrien (*faeG* für K88 Fimbrie, *fanC* für K99 Fimbrie und CS 3 für CS 3 Fimbrie). Diese Hybridisierungssignale müssen nicht notwendigerweise bedeuten, daß die entsprechenden Fimbriengencluster in diesen Stämmen vorhanden sind, sondern können auch eine Kreuzhybridisierung mit Genen anderer homologer Adhäsine darstellen. Die später abgenommenen Stämme J 1360 und J 1745 unterschieden sich zudem in der Anwesenheit von Genen, die für einen Autotransporter Serin-Protease (*pic*) und ein Toxin (*astA*, EAST 1 Toxin) kodieren. Interessanterweise waren diese auch positiv für eine Gruppe von bei EPEC-Plasmid kodierten Regulatoren für die *eaeA* Expression (*perA-D*) (Gomez-Duarte und Kaper 1995; Porter et al. 2004).

Bezüglich der „PAI- und ExPEC-spezifischen“ Gene unterschieden sich die Stämme geringfügiger. Bei den „PAI-spezifischen“ Genen unterschied sich das Stammpaar 1 (J 177/ J 1360) in 29 Genen, das Stammpaar 2 (J 1739/ J 1745) in 51 Genen. Funktionell sind diese Gene der PAI I und II (und auch III) des UPEC Stammes 536 v. a. der Gruppe der mobilen Elemente (Phagen, Transposons und Plasmide usw.) zuzuordnen oder sind noch unbekannter Funktion. Es ist bekannt, dass PAIs oft Mobilitätsgene (z. B. Integrasen, Transposasen) enthalten. Dies führte zu der Vorstellung, dass PAIs sich aus chromosomal integrierten Phagen, Plasmiden oder Transposons entwickelt haben, die man als „Pre-PAIs“ bezeichnet (Ölschläger et al., 2002; Hacker, 1999; Hacker et al., 1999; 1997; Blum et al., 1994).

Es bestanden innerhalb der detektierten „ExPEC-spezifischen“ Gene ebenfalls weniger Unterschiede zwischen den Stammpaaren. Stammpaar 1 unterschied sich in 15 Genen, Stammpaar 2 in 24. Die vorhandenen Gene umfassten diese, die auch phänotypisch und mit der Multiplex-PCR erfasst worden waren. Darunter kapselkodierende Gene, Gene für verschiedene Fimbrien (Typ 1-Fimbrien, S-Fimbrien) und Eisenaufnahmesysteme (Hämin, Aerobaktin, Yersiniabaktin). Interessanterweise konnte das *cdtB* Gen beim Stamm J 177 nicht nachgewiesen werden, obwohl dieses in der Multiplex-PCR detektiert werden konnte. Hinsichtlich

des Invasions-assoziierten Gens *ibeA* bestätigten sich die Unterschiede beim Stammpaar 2.

Die DNA-DNA Hybridisierung durch Arrays bestätigt sich demnach unter Berücksichtigung eines Anteils von möglicherweise falsch positiv oder negativ erscheinenden Genen als eine effiziente und verlässliche Methode zur vergleichenden Analyse von Genomen, besonders in Kombination mit anderen mikrobiologischen Verfahren (Cummins und Relman, 2000). Die Hybridisierungsmuster waren jedoch nicht immer problemlos auszuwerten. Die Muster mussten nach der Computerauswertung nachgeprüft werden, da es durch Schlieren oder Überstrahlung durch einen stark hybridisierenden Nachbarpunkt zu Fehlinterpretationen bei der Auswertung kam. In manchen Fällen konnten die Punkte auch nicht als eindeutig positiv oder negativ bezeichnet werden, da sie im Vergleich zum Hintergrund sehr schwach waren. Die Nachprüfung war jedoch durch die große Anzahl der Spots v. a. auf dem K-12 Array nur stichprobenartig möglich. Im Vergleich der Stämme mit dem *E. coli* K-12 Stamm zeigte sich, dass sich die Stämme J 177 (192 Gene), J 1360 (220 Gene), J 1739 (182 Gene) und J 1745 (251 Gene) hinsichtlich ihres Anteils an K-12 spezifischen Genen unterschieden. Dies entspricht der ungefähren Zahl, die bereits in früheren Arbeiten bei Vergleichen mit dem K-12 Genom zwischen 5 und 10 % lagen (Dobrindt und Reidl, 2000; Dobrindt et al., 2002; Dobrindt et al., 2003). Ebenso waren davon ca. 60 bis 70 % funktionell hypothetisch, unklassifiziert oder von unbekannter Funktion.

Die größte Anzahl (6 bis 9 %) von bekannten Genen gehörte wiederum in die funktionelle Gruppe der mobilen Elemente (Phagen, Transposons, Plasmide). 29 der Gene bekannter Funktion fehlten allen Stämmen gemeinsam. Dies sind nur 0,6 % aller *E. coli* spezifischen Gene. Darunter Gene, die bereits früher als hochvariabel eingestuft wurden (Dobrindt et al. 2003). Beispiele sind Teile des *rfa*-, *mcr*-, *csp*- und *fim*-Operon. An der Synthese des Lipopolysacharids ist u. a. das *rfa*-Gencluster beteiligt. Dieses besteht aus 14 einzelnen Genen in der Anordnung *rfaD-F-C-L-K-Z-Y-J-I-B-S-P-G-Q*. Gemeinsam fehlten allen Stämmen die Gene *rfaZ*, *rfaI* und *rfaB*. Zusätzlich kam es bei den Stämmen J 177 und J 1745 noch zu weiteren Genomveränderungen durch Verlust von *rfaL* und *rfaS*. Insgesamt kam es bei allen untersuchten Stämmen dieser Arbeit zu Genomveränderungen in diesem Bereich, was unterschiedliche Serotypen dieser Isolate widerspiegeln könnte. Beim *mcr*-Operon, das für ein Methylcytosin-spezifisches Restriktionssystem kodiert (Raleigh et al., 1986), fehlten ebenfalls allen in dieser Arbeit untersuchten Stämmen *mcrA*. Im

Gegensatz zu den sonst regelmäßig auf das ganze K-12 Genom verteilten fehlenden Genen, ist dies eine Region, in der mehrere Gene fehlten, neben Regionen wie dem *rfa*-Gencluster (s. o.). Insgesamt besteht das Operon aus mehreren Genen: *mcrA*, das bei 25 min des K-12 Genomes liegt und *mcrB/C/D*, das bei 99 min liegt. *mcrA* ist Bestandteil eines e14 Elementes, das ein unvollständiges λ -Prophagen-Genom darstellt. Phagen spielen eine große Rolle beim Transport von DNA beim horizontalen Gentransfer. Das e14 Element wurde 1980 von Greener und Hill erstmals beschrieben. Metha et al. (2004) postulierten, dass das Element in das *icd* Gen des *E. coli* K-12 Genom integriert ist. Das Element ist 15204 bp lang und hat einen GC-Gehalt von 45 %, wohingegen das *E. coli* Kerngenom einen GC-Gehalt von 50 % aufweist (Blattner et al., 1997). Dies zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die DNA durch horizontalen Gentransfer erworben wurde. Bakterienarten unterscheiden sich deutlich in ihrem GC-Gehalt, wohingegen innerhalb einer Spezies dieser konstant bleibt (Karlin et al., 1998 a und b). Die Wahrscheinlichkeit der DNA-Aufnahme ist demnach hoch, wenn sich der GC-Gehalt des Fragmentes vom durchschnittlichen GC-Gehalt der Spezies unterscheidet (Karlin et al., 1998b). e14 zeigt u. a. Ähnlichkeit mit dem *Shigella flexneri* Phage SfV. Nachdem drei Hauptdeletionen nachgewiesen werden konnten, wurde deutlich, dass das e14 Element kein komplettes Phagengenom mehr darstellt. Insgesamt besitzt das K-12 Genom acht Prophagen. Das e14 Element scheint jedoch K-12 spezifisch zu sein, da bei allen anderen untersuchten Stämmen Teile davon fehlen. Es kodiert u. a. für weitere funktionelle Gene wie *lit* (Genprodukt ist ein Protein, das in der späten T4 Phagen Entwicklung die Proteinexprimierung hemmt) und *pin* (Rekombinase), die auch den meisten Stämmen fehlen. Abb 11 zeigt Teile des e14 Elementes.

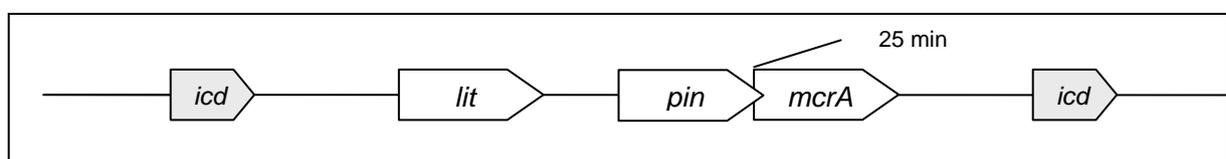


Abb. 12: Die genetische Struktur des e14 Elementes bei *E. coli* K-12. *icd*= Isocitratdehydrogenase, *lit*= Hemmung der späten T4 Phagenentwicklung, *pin*= DNA-Invertase.

mcrB liegt in einem Gencluster, das für ein Restriktionssystem kodiert. Abb. 12 zeigt die Genanordnung des *mcrB/C/D*-Genclusters.

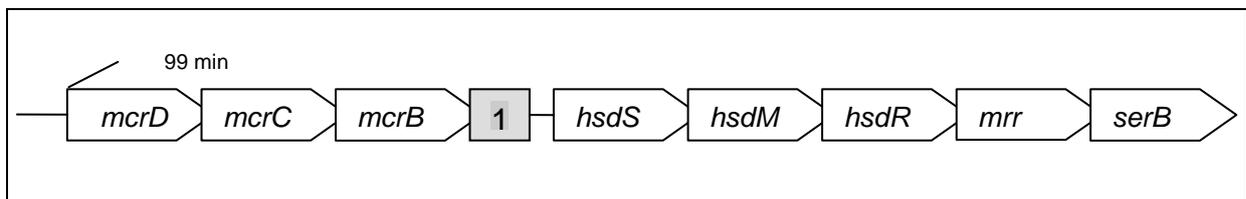


Abb. 13: Genanordnung des *mcrB/C/D*-Genclusters. 1 = *yjiW*, orf, hypothetisches Protein, *mcrB/C/D*= 5-methylcytosin-spezifisches Restriktionssystem, *hsdS/M/R*=, *mrr*= Restriktion von methyliertem Adenin, *serB*= 3-phosphoserinphosphatase.

Allen Stämmen fehlten ebenfalls Abschnitte aus diesem Gencluster. Die Gene *mrr* und *serB* waren hingegen bei allen nachweisbar. Insgesamt scheint der e14 Phage des K-12 Genomes in allen in dieser Arbeit untersuchten Stämmen zu großen Teilen nicht vorzuliegen.

Aus den Genen der *csp*-Familie, die für Proteine der Kälteschockantwort kodieren, fehlte allen Stämmen *cspG* (Nakashima et al., 1996). Ebenso war bei allen Stämmen *fimZ*, das in die Signaltransduktion involviert ist, nicht nachweisbar. Die meisten anderen fehlenden Gene scheinen bei jedem untersuchten Stamm individuell verschieden zu sein. Die Stämme zeigen also große Unterschiede in der genetischen Variabilität. Es kann somit nicht von einer Veränderung eines Ausgangsstammes im Verlauf der Infektion ausgegangen werden, sondern eher von Neuinfektionen mit anderen *E. coli* Varianten.

2. Analyse des Genomgehaltes der Stämme DSM6601 und 7117 und ihrer Kongorot-negativen Mutanten

Beim Vergleich der Wildtypstämme DSM6601 und 7117 und ihren Kongorot-negativen Mutanten waren primär phänotypisch wenig Unterschiede zu erkennen. Im Gegensatz zu den Stämmen 7117 und den Kongorot-negativen Mutanten deutet das Schwärmverhalten des Stammes DSM6601 auf Flagellenexpression hin. Alle bildeten Typ 1-Fimbrien aus. Die Wildtypen waren Kongorot-positiv, interessanterweise bei 30 °C und 37 °C, was bereits für einige enterobakterielle Fäkalisolate gezeigt wurde (Bokranz et al., 2005). Die Mutanten waren Kongorot-negativ. Ebenso verhielt sich das jeweilige Stammpaar gleich in der Multiplex PCR. Als einzige Ausnahme ergab diese beim Stamm DSM6601 kein PCR-Produkt mit *sfaS*-spezifischen Primern, wohingegen diese PCR in der zugehörigen Mutante positiv ausfiel. Dieses Ergebnis

konnte jedoch mittels Pathoarray-Hybridisierung nicht nachgewiesen werden, nach der beide Stämme *sfaS*-negativ waren. Nachdem die Anwesenheit von *sfaS* auch in einer Einzel-PCR überprüft wurde, in der die Kongorot-negative Mutante ebenfalls positiv war, muss eher von einem Fehler im Hybridisierungsmuster ausgegangen werden. Da der Stamm DSM6601 F1C-Fimbrien und keine S-Fimbrien ausbildet, könnte dieser Unterschied im *sfaC*-Nachweis auf eine Mutation im entsprechenden Gen im Wildtyp zurückzuführen sein, durch welche eine Amplifikation durch PCR nicht mehr möglich war. Ein ähnliches Problem lag beim Gen *iutA* vor, das ebenfalls durch den Pathoarray nicht nachgewiesen werden konnte.

Das Spaltmuster der Stämme nach der PFGE war hingegen identisch.

Durch die vergleichende Genomanalyse mittels des Pathoarrays wurden insgesamt wenige Unterschiede in der genetischen Ausstattung der beiden Stammpaare deutlich. Die Hybridisierungsmuster der zwei Stammpaare unterschieden sich nur in ca. 50 Genen des Pathoarray. Die Kongorot-negativen Mutanten wiesen jeweils weniger Gene als die entsprechenden Ausgangsstämme auf, was das Auftreten des Kongorot-negativen Phänotyps auf einen Verlust an genetischer Information zurückführt. Den Hauptteil der fehlenden Gene repräsentieren wiederum „PAI-spezifische“ DNA-Bereiche. Bei beiden Stammpaaren konnten Gene der PAIs I-V des Stammes 536 nachgewiesen werden. Bei den „ExPEC-spezifischen“ Genen dominierten wiederum Gene für Fimbrienbildung (Typ 1-Fimbrien) und Eisenaufnahmesysteme (Aerobaktin). Wenige Virulenz-assoziierte ORFs von IPEC wurden in den beiden Stammpaaren (DSM6601: 10 %, DSM6601 CR⁻: 4,4 %, 7117: 11,3 %, 7117 CR⁻: 6,2 %) nachgewiesen. Die Anzahl der detektierten Gene war bei den Kongorot-negativen Mutanten jeweils geringer als bei den jeweiligen Wildtypen. Da auf dem Pathoarray weder die Gene für die Curli-Adhäsion-Untereinheiten (*CsgA-G*) noch für relevante Regulatoren wie z. B. das *crl* Gen aufgespottet sind, konnte in dieser Arbeit keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Verlust dieser Gene zum beobachteten Kongorot-negativen Phänotyp führte. Die Sequenzierung der Curli-Determinante und der dazugehörigen Regulatoren im Stamm DSM6601 und DSM6601 CR⁻ zeigten allerdings, daß sich die beiden Stämme nicht in der DNA-Sequenz dieser Gene unterscheiden (Grozdanov und Dobrindt, unveröffentlicht).

Beim Vergleich mit dem K-12 Stamm fehlten den Stämmen zwischen 393 (DSM6601) und 284 (7117 CR⁻) Genen. Dem Stamm DSM6601 fehlten demnach die meisten

Gene unter allen untersuchten Stämmen. Der Großteil der Gene ist wiederum unbekannter Funktion.

Die Gene bekannter Funktion waren ähnlich verteilt wie bei den Isolaten von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen (siehe Tab. 22, S. 61). Im Gegensatz zu diesen waren die fehlenden Gene jedoch nicht gleichmäßig über das gesamte Genom des K-12 Stammes verteilt, sondern z. T. konnten grössere Genomteile in Folge nicht nachgewiesen werden. Speziell im Bereich des *csg* Operon fehlten den Kongorot-positiven als auch Kongorot-negativen Stämmen keine Gene oder wichtige Regulatorgene wie *crl*, *ompR* und *cpxR/A*. Auffallend war jedoch, dass den zwei Kongorot-positiven Stämmen DSM6601 und 7117 das Gen *rcaA* fehlte. Den Stämmen 7117 und 7117 CR⁻ *tolA*. Beide Gencluster sind in die komplexe Regulation der Curli Expression involviert. Die *tol* Gene spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und vermitteln neben dem analogen *ton*-System die Aufnahme von Makromolekülen durch diese (Germon et al., 1998). Die *rca* Genprodukte sind in die Regulation der Kapsel- und Flagellensynthese involviert und modulieren die Expression von *csg* Genen (Vianney et al., 2005; Stout et al., 1991). Das Rcs Zweikomponenten-System hemmt sowohl die Expression der *csgD-G* als auch des *csgBA* Operons RcsA-abhängig. Weitere RcsA-abhängig regulierte Gencluster sind *wza-wca* (Operon für Kapselbiosynthese) und *fhIDC* (Masterregulator der Flagellenbiosynthese). RcsA wiederum wird reguliert von H-NS. Innerhalb des Rcs-Systems wird RcsB durch die Übertragung einer Phosphatgruppe vom verwandten RcsC aktiviert. Dies erfolgt via RcsD. RcsF ist vermutlich als Lipoprotein der äußeren Membran in den komplexen Mechanismus involviert. RcsA fungiert als Cofaktor. In *tol*-Mutanten jedoch ist die Aktivierung der *csg*-Gene (über *OmpR*) dominant gegenüber der Hemmung durch Rcs (Vianney et al., 2005). Das *tol-pal* kodierte System spielt durch seine Funktion als Transmembranprotein in der Zellhülle noch bei vielen verschiedenen Vorgängen eine wichtige Rolle. Es besteht aus zwei verschiedenen Komplexen. TolQRA ist in der Zytoplasmamembran lokalisiert, wohingegen TolB und Pal einen Komplex nahe der äußeren Membran bilden. Neben den erwähnten Funktionen spielt TolC eine wichtige Rolle bei der Hämolysefähigkeit von Bakterien (siehe V. 1.4.).

Zu den komplexen Netzwerken der Regulation mit ihren vielen verschiedenen Möglichkeiten der Veränderung zwischen Kongorot-positiven und Kongorot-negativen Stämmen, kommt die Möglichkeit der Mutation z. B. im *csgD* Promotor hinzu. Ulich

und Partner (2001) beschreiben, dass die Mutation einzelner Basenpaare im *csgD* Promotor verschiedene Kongorotbindung durch Curli zur Folge hat. Entsprechende Mutationen wurden allerdings nicht für den *csgD* Promotor der Stämme DSM6601 und DSM6601 CR⁻ beobachtet (Dobrindt, unveröffentlicht). Zur Ausbildung des rdar Phänotyp wird neben der Curli Bildung auch die Produktion von Cellulose benötigt (Romling, 2005). Auch hier scheint der *csgD* Promotor eine regulierende Rolle zu spielen. Zuerst wurde die CsgD abhängige Transkription von *yaiC* festgestellt. Brombacher und Partner postulierten jedoch bis zu 24 durch *csgD* beeinflusste Gene u. a. *yoaD*, das möglicherweise einen negativen Regulator der Cellulose-Biosynthese darstellt (Brombacher et al., 2006). In der Zusammenschau wird deutlich über welche Vielzahl an verschiedenen Mechanismen *Escherichia coli* verfügt, um zum einen die Curli-Bildung zum anderen die Produktion von Cellulose in Abhängigkeit von den Erfordernissen der Umwelt zu modifizieren und damit den rdar Phänotyp zu modifizieren. Betrachtet man den Vergleich der Stämme mittels Pathoarray und K-12 Array fällt auf, dass für die Curli-bildenden Stämme jeweils mehr Gene mittels K-12- und Pathoarray-Hybridisierung nachgewiesen werden konnten als für die jeweiligen CR⁻ Mutanten. Dies könnte bedeuten, daß die CR⁻ Mutanten Gene des konservierten und/oder flexiblen Genpools verloren haben, welche die Expression der Curli- und Cellulose-Determinante beeinflussen. Die offensichtlichen und bekannten direkt an der Curli- und Celluloseexpression beteiligten Gene sind davon aber nicht betroffen. Insgesamt erscheint es aufgrund der komplexen Regulationsmechanismen jedoch eher nicht möglich zu sein, anhand des Hybridisierungsmusters den rdar Phänotyp zu erklären.

3. Vergleich der Genomgehalte von UPEC Stämmen, bei denen unter Antibiotikaeinfluss die Bildung von L-Formen beobachtet wurde

L-Formen von verschiedenen Bakterien sind ein bekanntes Phänomen. Den Bakterien fehlt die Fähigkeit eine Zellwand zu bilden und sind deshalb nur von einer Zellmembran umgeben. Dieses kann durch Antibiotika induzierbar sein und bewirkt dann eine Resistenz gegen diese Antibiotika (Daschner 1976). Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme 42, 58 und 70 bildeten alle unter Zugabe von 100 µg/ml Cefazolin L-Formen. In einer auswärtig durchgeführten PFGE (Prof. Dr. med. U.

Ullmann; Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Universität Kiel) waren jedoch keine Unterschiede im Spaltpattern aufgefallen und sie wurden deshalb in dieser Arbeit genauer untersucht, um festzustellen, ob etwa der Verlust bestimmter Gene zu diesem Phänotyp beiträgt.

Bereits phänotypisch zeigten sich jedoch große Unterschiede zwischen den Stämmen.

Diesem phänotypischen Bild entsprachen auch die Ergebnisse der Multiplex-PCRs. Ebenso fand sich ein jeweils individuelles Bandenmuster beim Verdau mit dem Enzym *XbaI* in der durchgeführten PFGE. Beim Vergleich der Stämme mit Hilfe des Pathoarray zeigte sich eine ähnliche Ausstattung der Stämme 42 und 70. Bei beiden konnten nur ca. 70 Gene mittels des Pathoarrays detektiert werden und diese verteilten sich jeweils zu einem Drittel auf „PAI-spezifische“, „ExPEC-spezifische“ und „IPEC-spezifische“ Gene. Beim Stamm 42 konnten wieder die Typ 1-Fimbriengene detektiert werden. Beim Stamm 70 zusätzlich Gene für das Eisenaufnahmesysteme Yersiniabaktin und das Invasionsvermittelnde Gen *ibeA*, das auch in der Multiplex-PCR nachgewiesen wurde. Der Stamm 58 wies insgesamt die meisten Gene für Virulenzfaktoren auf. Entsprechend der phänotypischen Ergebnisse konnten in der Multiplex-PCR *papAH*, *fimH*, *hlyA* und *papC* detektiert werden. Als einziger von allen untersuchten Stämmen war er *cdtB* und *cnf1* positiv. Diese Gene konnten zum großen Teil mittels Pathoarray-basierter DNA-DNA Hybridisierung ebenfalls detektiert werden. Die Verteilung der Gene war beim Stamm 58 den anderen in dieser Arbeit untersuchten UPEC Stämmen ähnlich. Offensichtlich stellen solche „L-Form Stämme“ keine einheitliche Gruppe an Bakterien dar, was auch auf unterschiedliche Gründe/Mechanismen für die induzierbare L-Formbildung hindeutet.

4. Vergleich des Genomgehaltes der Stämme 536, 764, 768 und ihrer ahämolytischen Klone

Ahämolytische Mutanten von hämolysierenden Wildstämmen sind ein vielfach untersuchtes Phänomen. Mittlerweile werden verschiedenen Mechanismen hinter dem Verlust der Hämolysfähigkeit vermutet. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die Stämme 536, 764 und 768 und ihre Mutanten genauer untersucht.

Freundlicherweise wurden zur Ergänzung weitere bereits in anderen Arbeiten untersuchte Stämme (536(1) und 536-21, 764(1) und 764_2) zur Verfügung gestellt. Der ahämolytische Stamm 536-22 unterschied sich vom Stamm 536 phänotypisch neben der fehlenden Hämolysefähigkeit durch fehlende P-Fimbrienbildung und dementsprechend auch durch fehlenden Nachweis der *pap*-Gene. Der ahämolytische Stamm 536-31 unterschied sich dagegen weiterhin durch fehlende Typ 1-Fimbrienbildung, obwohl *fimH* positiv in der Multiplex-PCR erschien und auch im Pathoarray die Gene detektiert werden konnten. Beim Stamm 536-22 konnte *hlyA* in der Multiplex-PCR nicht detektiert werden, beim 536-31 hingegen schon. Jeder Stamm hatte in der durchgeführten PFGE ein individuelles Spaltpattern. Beim Vergleich der Stämme mittels Pathoarray-basierter DNA-DNA Hybridisierung fiel primär beim früher hybridisierten Stamm 536(1) und 536 ein Unterschied bei 24 Genen auf. Die Verteilung 80 % „PAI-spezifische“, 18 % „ExPEC-spezifische“ und nur 2 % „IPEC-spezifische“ Gene blieb annähernd gleich.

Darin unterschied sich jedoch der Stamm 536-22 mit deutlich mehr „IPEC-spezifischen Genen“ (14 %). Bezüglich der *hly*-Gencluster ist vom Stamm 536-21 bekannt, dass er sowohl PAI I₅₃₆ und II₅₃₆ durch Deletion verloren hat (Hacker et al., 1983; Blum et al., 1994; Dobrindt et al., 2000). Im Pathoarray waren jedoch außer *hly*_{PAI I+II} alle Gene detektierbar. Dies lässt sich am ehesten über multiple Kopien derselben oder verwandter Gene im Genom erklären. Für die PAI I₅₃₆-V₅₃₆ wurden in früheren Arbeiten verschiedene Häufigkeiten für Deletionsereignisse festgestellt. Besonders PAI II₅₃₆ und III₅₃₆ neigen mit einer Häufigkeit von 2 bis 5 x 10⁻⁵ zur Deletion. PAI I₅₃₆ und V₅₃₆ nur mit einer Häufigkeit von 1 bis 2 x 10⁻⁶, wohingegen PAI IV₅₃₆ stabil ist. Dies erklärt sich über die Möglichkeit der site-spezifischen Rekombination der PAIs I₅₃₆, II₅₃₆, III₅₃₆ und V₅₃₆ über ihre flankierenden DR-Sequenzen. PAI IV₅₃₆ hat diese nicht und ist deshalb stabil. Wenn Deletionen dieser PAI stattfinden, sind entweder interne Teile betroffen oder die gesamte PAI mit den angrenzenden Regionen (Middendorf et al, 2001; 2004). Der Stamm 536-22 könnte ebenfalls ein Beispiel für diesen Integrase-vermittelten Mechanismus der ortsspezifischen Rekombination zwischen flankierenden „direct repeat“ Strukturen und damit den Verlust der kompletten PAIs I₅₃₆ und II₅₃₆ darstellen. Dem Stamm fehlten beide *hly*-Gencluster und zusätzlich das P-Fimbriengencenter, das ebenfalls auf PAI II₅₃₆ liegt. Insgesamt waren nur wenige PAI I₅₃₆- und II₅₃₆-spezifische Gene mittels Pathoarray in diesem Stamm detektierbar, wohingegen fast alle PAI III₅₃₆, IV₅₃₆ und V₅₃₆-spezifische Gene vorhanden waren. Diesbezüglich ähnelte das

Hybridisierungsmuster des Stammes 536-22 dem der definierten PAI I₅₃₆ und PAI II₅₃₆ Deletionsmutante 536-21. Beim Stamm 536-31 waren hingegen beide *hly*-Gencluster vorhanden und fast alle PAI I₅₃₆-V₅₃₆ spezifischen Gene waren detektierbar. Der Stamm bildete P- und S-Fimbrien (diese Gene liegen auf PAI II₅₃₆ und III₅₃₆; Dobrindt et al., 2000), was sowohl in der Multiplex-PCR als auch mittels Pathoarray nachweisbar war.

Ebenfalls positiv war *fyuA* in der Multiplex-PCR. Auf dem Pathoarray konnten alle PAI IV₅₃₆-spezifischen Gene nachgewiesen werden, die für das Eisenaufnahmesystem Yersiniabactin kodieren. Der Verlust der phänotypischen Hämolyse beruht in diesem Isolat offensichtlich nicht auf einer Deletion der kompletten PAIs I₅₃₆ und II₅₃₆. Neben der Deletion einer ganzen Inseln existieren jedoch noch weitere Mechanismen, die mit Hilfe der Arrays nicht zu klären sind. Denkbar sind Punktmutationen oder Rearrangements. Dadurch kann wiederum fehlende Transkription durch Verlust der Promotoraktivität hervorgerufen werden.

Als weiterer Mechanismus bei der Regulation der Hämolysefähigkeit spielt TolC eine Rolle. TolC ist ein Protein der äußeren Membran und in diverse zelluläre Funktionen involviert. Es bildet einen Tunnel in der äußeren Membran und erlaubt den aktiven Austausch von Toxinen und Enzymen, vermittelt jedoch auch Resistenzen gegenüber Antibiotika, Detergentien u. ä. (Koronakis, 2003). Das dies ein aktiver Mechanismus ist zeigten Vakharia und Partner 2001. Sie stellten fest, dass TolC Mutanten zwar alpha-Hämolysin bilden, jedoch ist dieses am ehesten aufgrund fehlender erneuter Faltung, nachdem es zum Transport entfaltet wurde, enzymatisch nicht aktiv. Beim Vergleich der Stämme 536, 536-21 und -31 mit dem K-12 Array zeigte sich jedoch kein fehlendes *tolC* Gen. Verschiedene Studien konnten z. B. jedoch auch den Einfluss von *rfa* Mutationen und damit Veränderungen im LPS auf die Hämolysefähigkeit zeigen (Bauer und Welch 1997; Stanley et al, 1993). Im Vergleich zum *E. coli* K-12 Stamm MG1655 fehlten in diesem Bereich allen Stämmen Gene. Dem Stamm 536-31 fehlt zusätzlich *rfaA/D* und *rfaC*. Insgesamt fehlten diesem Stamm im Vergleich zum 536 (573 Gene) oder 536-21 (365 Gene) nur 309 Gene gegenüber dem K-12 Stamm. Von der Verteilung und Art waren diese jedoch ähnlich.

Bei den Stämmen 764 und 768 und ihren ahämolytischen Mutanten müssen ähnliche Mechanismen hinter dem Verlust der Hämolysefähigkeit vermutet werden. Bei den Stämmen 764/3 bis 764/8 wurden, nachdem sich diese phänotypisch und in der PFGE

gleich verhielten, nur der Stamm 764/6 exemplarisch untersucht. Insgesamt waren die phänotypischen Tests schwierig zu bewerten. Die Ergebnisse stimmten nicht mit dem ermittelten genotypischen Merkmalen überein. Phänotypisch hämolysierte der Stamm 764, die Mutante unterschied sich durch fehlende Hämolysiefähigkeit, bildete jedoch im Gegensatz zum Ausgangsstamm P-Fimbrien. Genotypisch konnten sowohl in der Multiplex-PCR als auch auf dem Pathoarray eine deutlich größere Anzahl von Genen für Virulenzfaktoren detektiert werden, als phänotypisch nachweisbar waren. In der PFGE ähnelten sich mit Ausnahme eines Fragments die Bandenmuster der Stämme 764 und 764/6. Das Auftreten einer kleineren Bande im Fragmentmuster des Stammes 764/6 im Vergleich zum Ausgangsstamm deutet auf einen DNA-Verlust hin. Beim Vergleich der Stämme mittels DNA-DNA Hybridisierung durch den Pathoarray wurden die bereits früher hybridisierten Stämme 764(1) und 764_2 mit einbezogen. Beim Stamm 764 konnten im Vergleich zum 764(1) 37 Gene nicht detektiert werden. Alle Stämme waren jedoch bis auf einige wenige Gene sehr ähnlich. Bezüglich des *hly*-Genclusters fehlten beiden ahämolytischen Stämmen 764/6 und 764_2 beide Cluster komplett.

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt zu Erklärung der vielen verschiedenen Möglichkeiten des Verlustes der Hämolysiefähigkeit stellt das Auftreten von Typ I- und Typ II-Deletionen im Fall der PAI III₅₃₆ des Stammes 536 dar (Middendorf et al., 2004). Neben der ortsspezifischen Rekombination und dem Verlust der gesamten Insel gibt es auch die Deletion durch homologe Rekombination, was zum Verlust von nur Teilen einer Insel führen kann oder zu genomischen Umlagerungen oder Rearrangements. Das könnte eventuell als Mechanismus z. B. hinter dem Verlust der Hämolysiefähigkeit der Stämme 764_2 und 764/6 postuliert werden. Im Fall der PAI III des Stammes 536 dienen zwei IS100 Elemente als Basis der Rekombination und des Verlustes eines internen Teil der PAI. Ein IS Element ist vollständig, das anderen kryptisch. Middendorf und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das vollständige IS100 Element auf der PAI verbleibt, das kryptische durch Deletion mit einem Teil der PAI verschwindet. Dieser Vorgang scheint RecA abhängig zu sein. Dabei handelt es sich um ein Protein, das in die homologe Rekombination und DNA Reparatur von *E. coli* involviert ist. Die *recA*-negativen Mutanten zeigten eine geringere Rate an Typ II Deletionen. Beim Vergleich der Stämme mit dem K-12 Stamm MG1655 fallen jedoch keine Veränderungen im Bereich von *recA* auf.

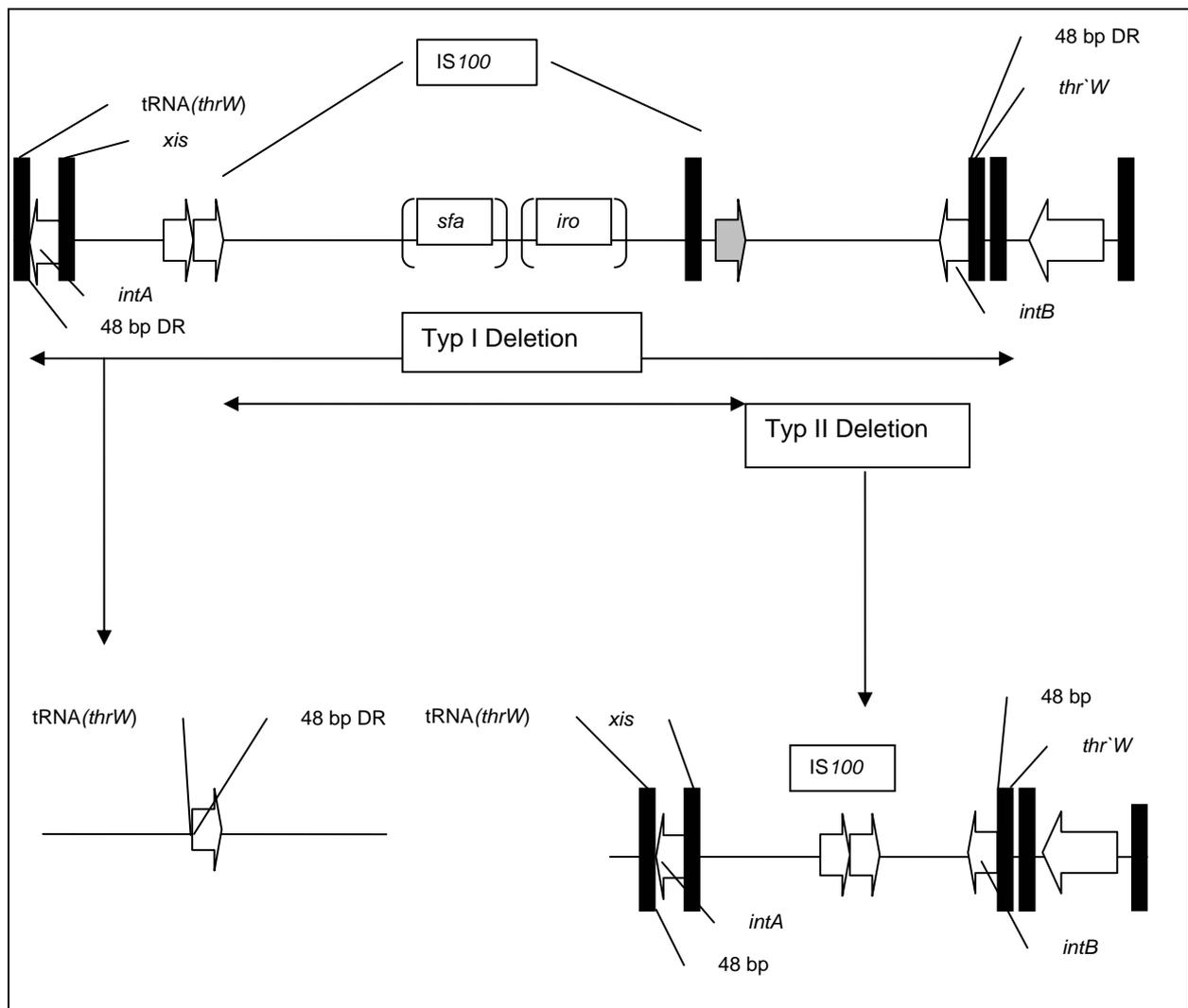


Abb. 14: Typ I und II Deletion der PAI III des Stammes 536. Die Genorganisation mit Lokalisierung der wichtigen Virulenzgene *sfa* (Gencluster für S-Fimbrien) und *iro* (Salmochelin Gencluster) sowie PAI-assoziierte Integrasegene (*intA* und *B*), flankierende „direct repeat“-Regionen und IS100 Kopien sind dargestellt. *xis*= Gen für Excisionase (nach Middendorf et al., 2004).

Beim Vergleich der Stämme 768 und 768-1 unterschied sich der hämolysierende Stamm 768 von seiner ahämolytischen Mutante phänotypisch zusätzlich durch S- und Typ 1-Fimbrienbildung. Genotypisch hatten sie allerdings der Multiplex-PCR zufolge die gleiche Genausstattung und auch ihre Pathoarray Hybridisierungsmuster waren bis auf 30 Gene sehr ähnlich. Auch die Gene für S- und Typ 1-Fimbrien konnten beim Stamm 768-1 detektiert werden, obwohl er sie phänotypisch nicht bildete. Der ahämolytischen Mutante fehlte im Pathoarray-Hybridisierungsmuster in beiden Genclustern das Gen *hlyC*. HlyC wird für die Aktivierung des proHlyA benötigt, bei der Fettsäurereste auf bestimmte Acylierungsstellen (Lys-564 und Lys-690) des proHlyA-Moleküls übertragen werden und somit die Aktivierung in HlyA erfolgt. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationen zur veränderter Hämolysiefähigkeit oder zum Verlust derselben führen (Guzman-Verri et al., 1997).

Beim Vergleich der Stämme mit dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655 fehlten der Mutante 768-1 mehr Gene gegenüber dem Ausgangsstamm 768 (233 vs. 203). Insgesamt zeigen beide Stämme nur einen Unterschied in der An- und Abwesenheit von 84 Genen, sind sich also auch hier ähnlich. Den Stämmen 764 und 764/6 fehlten 372 bzw. 304 Gene gegenüber dem K-12 Stamm.

Die Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierungen deuten daraufhin, dass bei unabhängig voneinander erhaltenen ahämolytischen Mutanten der *E. coli* Stämme 764 und 768 der Verlust der Hämolysefähigkeit auf verschiedenen Mechanismen basiert und nicht ausschließlich auf den Verlust einer kompletten Pathogenitätsinsel zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Spezies *E. coli* durch eine sehr hohe Genomplastizität gekennzeichnet ist, an der verschiedene Mechanismen wie Aufnahme fremder DNA, DNA-Verlust durch Rekombination, DNA-Rearrangements sowie Punktmutationen beteiligt sind. Diese Genomplastizität bedingt die außerordentliche phänotypische Vielfalt von *E. coli* Isolaten und eine fortlaufende Entwicklung neuer Varianten. Eine gesteuerte Veränderung der Genomstruktur im Verlauf einer Infektion und damit eine bakterielle Reaktion auf Wirtssignale und das Infektionsgeschehen konnte in dieser Arbeit anhand verschiedener konsekutiver Isolate von chronischen Harnwegsinfektionen nicht nachgewiesen werden.

VI. Zusammenfassung

Von *Escherichia coli* ist eine enorme Genomplastizität bekannt, welche der phänotypischen Vielfalt zugrunde liegt. Die Grundlage für diese Genomplastizität beruht auf dem Auftreten von Punktmutationen und Rekombination. Diese Mechanismen führen dazu, daß es zu DNA-Rearrangements, Deletionen, aber auch Integration von fremder DNA kommt.

In früheren Arbeiten wurden bereits *Escherichia coli* Stämme von Patientinnen mit chronischen Harnwegsinfektionen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion untersucht. Es wurde vermutet, dass auf der Grundlage dieser Mechanismen ein Stamm sich im Lauf der Infektion genetisch verändert. Dies wurde in der vorliegenden Studie genauer untersucht. Es konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass es sich um Stämme handelt, die sich im Laufe der Infektion in ihrer genomischen Ausstattung verändert haben. Vielmehr muß angenommen werden, dass es sich hierbei um Neuinfektionen mit anderen Stämmen handelt.

Anhand des Vergleichs des Genomgehaltes der Stämme 536, 764, 768 und ihrer ahämolytischen Klone konnte diese verschiedenen Möglichkeiten der genomischen Veränderungen, die hinter dem Auftreten des ahämolytischen Phänotyps stehen, gezeigt werden.

Ebenso konnte diese große Variabilität anhand der L-Formen bildenden Stämme, die offensichtlich keine einheitliche Gruppe darstellen, und an der Analyse des Genomgehaltes der Stämme DSM6601 und 7117 und ihren Kongorot-negativen Mutanten, die wohl ebenfalls verschiedene genomische Veränderungen aufweisen, gezeigt werden.

VII. Literaturverzeichnis

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E (1999)** *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14043-14048
- Agace W, Connell H, Svanborg C (1996)** Host Resistance To Urinary Tract Infection. In: Urinary tract infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Mobley, H. L., T. Warren, Ed.), American Society for Microbiology, Washington D. C., pp:221-243
- Ahrens R, Ott M, Ritter A, Hoschutzky H, Buhler T, Lottspeich F, Boulnois GJ, Jann K, Hacker J (1993)** Genetic analysis of the gene cluster encoding nonfimbrial adhesin I from an *Escherichia coli* uropathogen. Infect. Immun. 61:2505-2512
- Annunziato PW, Wright LF, Vann WF, Silver RP (1995)** Nucleotide sequence and genetic analysis of the neuD and neuB genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. J. Bacteriol. Jan; 177(2):312-9
- Arber W. (1993)** Evolution of prokaryotic genomes. Gene. 135:49-56
- Arnquist A, Ohlsen A, Pfeiffer J, Russel DG, Normark S (1992)** The crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. Mol. Microbiol. 6:2443-2452
- Bauer ME and Welch RA (1997)** Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. Infect. Immun. 65:2218-2224
- Bergthorsson U, Ochman H (1998)** Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. Mol. Biol. Evol. 15:6-16
- Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S (2000)** Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. J. Infect. Dis. Feb; 181(2):602-12
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Villes J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis N, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277, 1453-1474
- Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschäpe H, Hacker J (1994)** Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. Inf. Immun. Feb. p. 606-614

- Bokranz W, Wang X, Tschape H, Romling U (2005)** Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract J. Med. Microbiol. 2005 Dec;54(Pt 12):1171-82
- Bouquet P (2001)** The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF 1) from *Escherichia coli*. Toxicon. Nov;39(11):1673-1680
- Boyd EF, Hartl DL (1998)** Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. J. Bacteriol. Mar;180(5):1195-65
- Brauchle L (2001)** Molekulare Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren bei *Escherichia coli* Isolaten aus Stuhl und Urin von Frauen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen
- Braun V, Hantke K (1992)** Genetics of bacterial iron transport. In: CRC handbook of microbial iron chelates. Boca Raton, FL: CRC Press. pp: 107-138
- Braun V, Schönherr R, Hobbie S (1993)** Enterobacterial hemolysins: activation, secretion and pore formation. Trends in Microbiol. 1:211-216
- Brombacher E, Baratto A, Dorel C, Landini L (2006)** Gene expression regulation by the curli activator CsgD Protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. J. Bacteriol. 2006 März; 188(6):2027-37
- Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Ölschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U (2006)** How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* PNAS 2006;103;12879-12884; originally published online Aug 15, 2006;
- Connell H, Hedlund M, Agace W, Svanborg C (1997)** Bacterial Attachment to uro-epithelial cells: mechanisms and consequences. Adv. Dent. Res. 11:50-58
- Crosa JH (1989)** Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. Microbiol. Rev. 53:517-530
- Cummings CA, Relman DA (2000)** Using DNA Microarrays to study host-microbe interaction. Genomics. Vol. 6. No. 5. p. 513-526
- Daines DA, Wright LF, Chaffin DO, Rubens CE, Silver RP (2000)** NeuD plays a role in the synthesis of sialic acid in *Escherichia coli* K1. FEMS Microbiol. Lett. Aug 15;189(2):281-4
- Daschner F (1976)** Inhibition of cell wall synthesis by sulfonamides and trimethoprim. Chemotherapy. 1976;22(1):12-8

- De Lorenzo V, Herrero M, Neilands JB (1988)** IS1-mediated mobility of the aerobactin system of pColV-K30 in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 213:487-490
- Dobereiner A, Schmid A, Ludwig A, Goebel W, Benz R (1996)** The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by *Escherichia coli* alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. Eur. J. Biochem. Sep 1;240(2):454-60
- Dobrindt U, Janke B, Piechaczek K, Nagy G, Ziebur W, Fischer G, Schierhorn A, Hecker M, Blum-Oehler G, Hacker J (2000)** Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution. Int. J. Med. Microbiol. 290, 307-311
- Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hartsch T, Gottschalk G, Ron EZ, Fünfstück R, Hacker J (2001)** The S fimbriae-encoding determinant *sfa* is located on the pathogenicity island III₅₃₆ of the uropathogenic *E. coli* strain 536. Infect. Immun. Jul. p. 4248-4256
- Dobrindt U, Hentschel U, Kaper JB, Hacker J (2002a)** Genome plasticity in pathogenic and nonpathogenic enterobacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 264(1):157-75
- Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, Schneider G, Johann A, Gottschalk G, Hacker J (2002b)** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I₅₃₆ to PAI IV₅₃₆) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Infect. Immun. Nov. p.6365-6372
- Dobrindt U. , Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J (2003)** Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* using DNA arrays. J. Bacteriol. Mar, 185(6):1831-40
- Dobrindt U, Hacker J (1999)** Plasmids, Phages and pathogenicity islands. Lessons on the evolution of bacterial toxins. pp. 3-23. In: J. E. Alouf and J. H. Freer (eds.). The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, 2.ed., Academic Press, London
- Dobrindt U, Hacker J (2001)** Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 4:550-557
- Dobrindt U, Reidel J (2000)** Pathogenicity islands and phage conversion: evolutionary aspects of bacterial pathogenesis. Int. J. Med. Microbiol. 290, 519-527
- Donnenberg MS, Newman B, Utsalo SJ, Trifillis AL, Hebel JR, Warren JW (1994)** Internalization of *Escherichia coli* into human kidney epithelial cells: comparison of fecal and pyelonephritis-associated strains. J. Infect. Dis. 169:831-838

- Donnenberg MS, Welch RA (1996)** Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. In: Urinary tract infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Moblely, H. L., T. Warren, Ed.), American Society for Microbiologie, Washington D. C., pp 29-66
- Falkow S (1996)** The evolution of pathogenicity in *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. (Neidhardt, F. C., Ed).Washington D.C. American Society for Microbiology Press, pp. 2723-2729
- Fiorentini C, Donelli G, Matarrese P, Fabbri A, Paradisi S, Bouquet P (1995)** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p 21 Rho GTPase. Infect. Immun. 63:3936-3944
- Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Bouquet P (1997)** Toxin-induced activation of the G-protein p21 Rho by deamidation of glutamine. Nature 387:729-733
- Foxman B, Zhang L, Palin K, Tallman P, Marrs CF (1995a)** Bacterial virulence factors of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. J. Infect. Dis. 171:1514-1521
- Foxman B, Zhang L, Tallman P, Palin K, Rode C, Bloch C, Gillespie G, Marrs CF (1995b)** Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. J. Infect. Dis. 172:1536-1541
- Fredeus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, Svanborg C (2001)** *Escherichia coli* P fimbriae utilize the toll like receptor 4 pathway for cell activation. Mol. Microbiol. 40:37-51
- Garcia MI, Jouve M, Nataro JP, Gounon P, Le Bouguenec C (2000)** Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extraintestinal infections. FEBS Lett. 479:111-117
- Germon P, Clavel T, Vianney A, Portalier R, Lazzaroni JC (1998)** Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 tolA N-terminal region and characterization of its tolQ-interacting domain by genetic suppression. J. Bacteriol., Dec. 1998, p. 6433-6439
- Giugnot J, Bernet-Carmard MF, Pous C, Plancon L, Le Bouguenec C, Servin AL (2001)** Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for $\alpha_5\beta_1$ integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamicunstable microtubules. Infect. Immun. 69:1856-1868

- Gomez-Duarte OG, Kaper JB (1995)** A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 63 (5):1767-76
- Gophna U, Barley M, Seijffers R, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ (2001)** Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. Infect. Immun. Apr; p:2659-2665
- Gophna U, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ (2002)** Role of fibrinectin in curli-mediated internalization. FEMS Microbiol. Lett. Jun 18;212(1):55-8
- Greener A and Hill CW (1980)** Identification of a novel genetic element in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 144:312-21
- Groisman AG, Ochman H (1996)** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell. 87:791-794
- Guzman-Verri C, Garcia F, Arvidson S (1997)** Incomplete activation of *Escherichia coli* Hemolysin (HlyA) due to mutations in the 3`region of hlyC. J. Bacteriol., Sept. 1997, p.5959-5962
- Hacker J, Hochhut B, Middendorf B, Schneider G, Buchrieser C, Gottschalk G, Dobrindt U (2004)** Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. Int J Med Microbiol. 2004 Apr;293(7-8):453-61.Review.
- Hacker J, Knapp S, Goebel W (1983)** Spontaneous deletion and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. J. Bacteriol. 154:1145-1154
- Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R, Göbel W (1990)** Deletion of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vivo and in vitro in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. Microb. Pathogen. 8:213-225
- Hacker J, Carniel E (2001)** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity-an darwinian view on the evolution of microbes
- Hacker J, Kaper JB (1999)** The concept of pathogenicity islands. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements (J. B. Kaper, J. Hacker, Eds.). ASM Press, Washington D.C. pp. 1-12
- Hacker J (1992)** Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. Can. J. Microbiol. Jul;38(7):720-7
- Hacker J, Kestler H, Hochschützky H, Jann K, Lottspeich F, Korhonen TK (1993)** Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. Infect. Immun. 61:544-550

- Hacker J, Morschäuser J (1994)** S and F1C fimbriae. In: Fimbriae. Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines. CRC Press. p:27-36
- Hacker J (1996)** Virulenzmerkmale uropathogener Bakterien. Nieren-und Hochdruckkrankheiten. 25:537-540
- Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H (1997)** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23(6):1089-1097
- Hacker J, Blum-Oehler G, Janke B, Nagy G, Goebel W (1999)** Pathogenicity islands of extraintestinal *Escherichia coli*. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements (J. B. Kaper, J. Hacker, Eds.). ASM Press, Washington D.C. pp. 59-71
- Hazen KC, Theisz GW, Howell SA (1999)** Chronic urinary tract infection in due to *candida utilis*. J. Clin. Microbiol. 14:824-827
- Herias MV, Midtvedt T, Hanson A, Wold AE (1997)** *Escherichia coli* K5 capsule expression enhances colonization of the large intestine in the gnotobiotic rat. Infect. Immun. 65:531-536
- Hochhut B, Wilde C, Balling G, Middendorf B, Dobrindt U, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Carniel E, Hacker J (2006)** Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Mol. Microbiol. 2006 Aug;61(3):584-95
- Hofman P, Le Negrate G, Mograbi B, Hofman V, Brest P, Alliana-Schmid A, Flatau G, Boquet P, Rossi B (2000)** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (Cnf1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. J. Leukoc. Biol. 68:522-528
- Huang SH, Wass C, Fu Q, Prasadarao NV, Stins M, Kim KS (1995a)** *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. Infect. Immun. 63:4470-4475
- Huang SH, Fu Q, Wass C, Hoffman J, Kim KS (1995b)** Molecular cloning and characterization of a novel invasion gene *ibe7* encoding the ability to invade brain microvascular endothelial cells (BMEC) in vitro and in vivo. In: Abstracts of the 95th general meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 168
- Huebner J, Goldmann DA (1999)** Coagulase-negative *staphylococci*: role as pathogens. Annu. Rev. Med. 50:223-236

- Hultgren SJ, Normark S (1991)** Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:383-415
- Hutchinson CA, Peterson SN, Gill SR, Cline RT, White O, Fraser CM, Smith HO, Venter JC (1999)** Global transposon mutagenesis and a minimal mycoplasma genome. *Science* 286:2165-2169
- Jann K, Jann B (1992)** Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can. J. Microbiol.* Jul; 38(7):705-10
- Johanson I-M, Lindstedt R, Svanborg C (1992)** Roles of the *pap*- and *prs*-encoded adhesins in *Escherichia coli* adherence to human uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 60: 3416-3422
- Johanson I-M, Plos K, Marklund B-I, Svanborg C (1993)** Pap, papG and prsG DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract. *Microb. Pathogen.* 15:121-129
- Johnson JR, Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV (2003)** Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J. clin. Microbiol.* 2003. Jan;41(1):337-45
- Johnson JR, Russo TA (2002)** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*." *J. Lab. Clin. Med.* 139(3):155-62
- Johnson JR, Stell AL (2000)** Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J. Infect. Dis.* 181:261-72
- Johnson DE, Russel RG, Lockatell CV, Zulty JC, Warren JW, Mobley HLT (1993)** Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 61:2748-2754
- Johnson JR, Brown JJ (1996)** A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal(alpha 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* Apr 173(4):920-6
- Johnson JR (1991)** Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:80-128
- Johnson DE, Drachenberg C, Lockatell CV, Island MD, Warren JW, Donnenberg MS (2000)** The role of cytotoxic necrotizing factor-1 in colonization and tissue injury in a murine model of urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28:37-41

- Jones CH, Dodson K, Hultgren SJ (1996)** Structure, Function and Assembly of adhesive P Pili. In: Urinary tract infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Mobley, H. L., T. Warren, Ed.), American Society for Microbiologie, Washington D. C., pp:175-219
- Jubelin G, Vianney A, Beloin C, Ghigo JM, Lazzaroni JC, Lejeune P, Dorel C (2005)** CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., March 2005, p. 2038-2049
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004)** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40
- Karlin S, Campbell AM, Mrazek J (1998a)** Comparative DNA analysis across diverse genomes. Annu. Rev. Genet. 1998;32:185-225. Review
- Karlin S, Mrazek J, Campbell AM (1998b)** Codon usages in different gene classes of the *Escherichia coli* genome. Mol. Microbiol. 1998 Sep;29(6):1341-55.
- Khan AS, Kniep B, Ölschläger TA, van Die I, Korhonen T, Hacker J (2000)** Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. Inf. Immun. Jun; p:3541-3547
- König B, Ludwig A, Goebel W, König W (1994)** Pore formation by the *Escherichia coli* alpha-hemolysin: role for the mediator release from human inflammatory cells. Infect. Immun. Oct;62(10):4611-4617
- Koronakis K, Hughes C (1996)** Synthesis, maturation and export of the *E. coli* hemolysin. Med. Microbiol. Immunol (Berl). Sep. 185(2):65-71
- Koronakis V (2003)** TolC-the bacterial exit duct for proteins and drugs. FEBS letters Volume 555, Issue 1, Nov. 2003, p. 66-71
- Krogfeld KA (1991)** Bacterial adhesion: genetics, biogenesis and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Infect. Dis. 13:721-735
- Kuehn MJ, Haslam D, Normark S, Hultgren SJ (1994)** Structure, function, and biogenesis of *Escherichia coli* p pili. In: Klemm P. (ed.) Fimbriae Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines. Boca Raton, FL:CRC Press, pp. 37-51
- Lawrence JG, Ochman H (1998)** Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9413-9417
- Ludwig A, Goebel W (1991)** Genetic determinants of cytolytic toxins from gramnegative bacteria. In: Sourcebook of bacterial protein toxins. (Alouf, J. E., J. H. Freer, Eds.), Acd. Press, London, pp.17-146

- Ludwig A, Garcia F, Bauer S, Jarchau T, Benz R, Hoppe J, Göbel W (1996)** Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. Sept. p.5422-5430
- Lundstrom T, Sobel J (2001)** Nosocomial Candiduria: A Review. Clin. Inf. Dis. 32:1602-1607
- Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ (2000)** Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. EMBO J. 19:2803-2812
- Maurelli AT, Fernandez RE, Bloch CA, Rode CK, Fasano A (1998)** "Black holes" and bacterial pathogenicity: A large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* ssp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. March 31;95(7):3943-3948
- Melkerson-Watson LJ, Rode CK, Zhang L, Foxman B, Bloch CA (2000)** Integrated genomic map from uropathogenic *Escherichia coli* J 96. Infect. Immun. 68:5933-5942
- Menestrina G, Moser C, Pellet S, Welch R (1994)** Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (Hly A) and other members of the RTX toxins family. Toxicol. Feb 28;87(1-3):249-67
- Merkle (1997)** Lehrbuch der Urologie
- Mehta P, Krishnaswamy S and Casjens S (2004)** Analysis of the lamboid prophage element e14 in the *E. coli* K-12 genome. BMC Microbiol.2004 Jan 20;4:4
- Middendorf B, Blum-Oehler G, Dobrindt U, Mühldorfer I, Salge S, Hacker J (2001)** The pathogenicity islands (PAIs) of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536: Islandprobing of PAIII₅₃₆. J. Inf. Dis. 2001;183:S17-20
- Middendorf B, Hochhut B, Leipold K, Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hacker J (2004)** Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. J. Bacteriol. May 2004, p. 3086-96
- Mills M, Meysick KC, O'Brien AD (2000)** Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. Inf. Immun. Vol.68, No. 10. p. 5869-5880
- Mobley HLT, Island D, Massad G (1994)** Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Kidney Int. Suppl. 47:129-136
- Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP (1995)** Molecular biology of microbial ureases. Microbiol. Rev. 59:451-480
- Mol O, Oudega B (1996)** Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 19:25-52

- Morschhäuser J, Uhlin BE, Hacker J (1993)** Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol. Gen. Genet.* 238:97-105
- Morschhäuser J, Vetter V, Emödy L, Hacker J (1994)** Adhesin regulatory genes within large, unstable regions of pathogenic *Escherichia coli*: cross-talk between different adhesin gene clusters. *Mol. Microbiol.* 11:555-566
- Mühldorfer I, Hacker J (1994)** Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Pathogen.* 16:171-181
- Mühldorfer I, Ziebuhr W, Hacker J (2001)** *Escherichia coli* in Urinary Tract Infection In: *Mol. Med. Microbiol.* Eds. M. Sussman et al. Acad. Press. 2002. pp. 585-603.
- Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ (1998)** Induction and evasion of host defences by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282:1494-1497
- Nagy G, Dobrindt U, Kupfer M, Emody L, Karch H, Hacker J (2001)** Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* 68:1924-1928
- Nakashima K, Kanamaru K, Mizuno T, Horikoshi K (1996)** A novel member of the *cspA* family genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1996 May; 178(10):2994-7
- Nakata N, Tobe T, Fukuda I, Suzuki T, Komatsu K, Yoshikawa M, Sasakawa C (1993)** The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of *Shigella*: the relationship between the OmpT and *kcpA* loci. *Mol. Microbiol.* 9:459-468
- Nataro JP, Kaper JB (1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201
- Neilands JB (1992)** Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30). *Can. J. Microbiol.* 30:728-733
- Neilands JB (1995)** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* Nov 10;270(45): 26723-6
- Ochman H, Jones IB (2000)** Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J.* Vol. 19. No. 24, 19:6637-6643
- Ohlsen A, Wick MJ, Morgelin M, Bjorck L (1998)** Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* Mar;66(3):944-9

- Ölschläger TA, Dobrindt U, Hacker J (2002a)** Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 19:517-522
- Ölschläger TA, Dobrindt U, Hacker J (2002b)** Virulence factors of uropathogens. *Curr. Opin. Urolog.* 12:33-38
- Pak J, Pu Y, Zhang ZT, Hasty DL, Wu XR (2001)** Tamm-horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J. Biol. Chem.* 276:9924-9930
- Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A; Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001)** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-533
- Phillips JA, Li X, Guyer GM, Mobley HLT (2000)** Identification of a second pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073 containing the secreted autotransporter toxin (sat) and other virulence determinants. Abstracts of the 100th General meeting of the American Society of Microbiology; 21-25 May 2000; Los Angeles, Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2000. p. 80; abstract B-172
- Porter ME, Mitchell P, Roe AJ, Free A, Smith DG, Gally DL (2004)** Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 54(4):1117-33
- Prasadarao NV, Wass CA, Kim KS (1996a)** Endothelial cell GlcNAc β 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* 64:154-160
- Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang S-H, Kim KS (1996b)** Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 64:146-153
- Pupo GM, Lan R, Reeves PR (2000)** Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10567-10572
- Raleigh EA, Trimarchi R und Revel H (1986)** Genetic and physikal mapping of the mcrA (rglA) and mcrB (rglB) loci of *Escherichia coli* K-12

- Rode CK, Melkerson-Watson LJ, Johnson AT, Bloch CA (1999)** Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 19:230-236
- Romling U (2005)** Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in enterobacteriaceae. Cell.Mol. Life. Sci.2005.Juni;62(11):1234-46
- Ritter A, Blum G, Emödy L, Kerenyi M, Böck A, Neuhierl B, Rabsch W, Scheutz F, Hacker J (1995)** TRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 17:109-121
- Ritter A, Gally DL, Ohlsen PB, Dobrindt U, Friedrich A, Klemm P, Hacker J (1997)** The pai-associated leuX specific tRNA^{5(leu)} affects type 1 fimbriation in *Escherichia coli* by control of FimB recombinase expression. Mol. Microbiol. Sept;25(5):871-82
- Rippere-Lampe KE, O'Brien AD, Conran R, Lockman HA (2001)** Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. Vol. 69, No. 6. Jun, p. 3954-3964
- Russo TA, Johnson JR (2000)** Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolate of *Escherichia coli*: ExPEC. J. Inf. Dis. 181:1753-1754
- Russo TA, Wenderoth S, Carlino UB, Merrick JM, Lesse AJ (1998)** Identification, Genomic Organization and Analysis of the Group III Capsular Polysaccharide Genes kpsD, kpsM, kpsT and kpsE from a Extraintestinal Isolate of *Escherichia coli* (CP9, O4/K54/H5). J. Bacteriol. Jan. Vol. 180. No.2. pp:338-349
- Schaeffer AJ (1997)** Classification of urinary tract infection in adults. In: Harnwegsinfektionen. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück R., E. Straube, G. Stein, Eds.), Pabst science publishers, Lengerich, Germany. Pp.140-147
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW (1998)** Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends Biotechnol. Jul. 16(7):301-6
- Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ (2001)** Structure and Function of *Escherichia coli* Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections. J. Inf. Dis. 183:S36-S40
- Schmid G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories A (1997)** Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. Nature 387:725-729

- Schmoll T, Morschhäuser J, Ott M, Ludwig B, van Die I, Hacker J (1990)** Complete genetic organization and functional aspects of *Escherichia coli* S fimbrial adhesin determinant: nucleotide sequence of the genes *sfa* B, C, D, E, F. Microb. Pathog. Nov;9(5):331-43
- Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heeseman J (1998)** Prevalence of the „high-pathogenicity island“ of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect. Immun. 66:480-485
- Sokurenko EV, Chesnokova V, Dykhuizen DE, Ofek I, Wu XR, Krogfeld KA, Struve C, Schembri MA, Hasty DL (1998)** Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. Natl. Acad. Sci. USA. 95:8922-8926
- Sokurenko EV, Schembri MA, Trintchina E, Kjaergaard K, Hasty DL, Klemm P (2001)** Valency conversion in the type 1 fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. Aug; 41(3):675-86
- Soto GE, Hultgren SJ (1999)** Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. J. Bacteriol. Feb. Vol 181. No.4. pp:1059-1071
- Stanley PL, Diaz P, Bailey MJ, Gygi D, Juarez A, Hughes C (1993)** Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysis caused by an *rfaP* lesion in core lipopolysaccharide assembly. Mol. Microbiol. 10:781-787
- Stout V, Torres-Cabassa A, Maurizi MR, Gutnick D, Gottesman S (1991)** RcsA, a unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. J. Bacteriol. Mar.1991, p. 1738-1747
- Svanborg C, Agace W, Hedges S, Lindstedt R, Svenssonml (1994)** Bacterial adherence and mucosal cytokine production. Ann. NY. Acad. Sci. Aug 15;730:162-181
- Uhlich GA, Keen JE, Elder RO (2001)** Mutations in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. AEM, May 2001, p. 2367-2370
- Vakharia H, German GJ, Misra R (2001)** Isolation and characterization of *Escherichia coli* *tolC* mutants defective in secreting enzymatically active alpha-hemolysin. J. Bacteriol., Dec 2001, p. 6908-6916
- Vianney A, Jubelin G, Renault S, Dorel C, Lejeune P, Lazzaroni JC (2005)** *Escherichia coli* *tol* and *rcs* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. Microbiology 151 (2005), 2487-2497
- Warren JW (1996)** Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In: Urinary tract infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Mobley, H. L., T. Warren, Ed.), American Society for Microbiologie, Washington D. C., pp:3-27

Waters VL, Crosa JH (1991) Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* Sept;55(3):437-450

Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS, Blattner FR (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Dec 24;99(26):17020-4

Wullt B, Bergsten G, Samuelsson M, Svanborg C (2002) The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int. J. Antimicrob. Agents.* Jun;19(6):522-26

Wullt B, Bergsten G, Connell H, Rollano P, Gebratsedik N, Hang L, Svanborg C (2001) P-fimbriae trigger mucosal responses to *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Cell. Microbiol.* Apr;3(4):255-64

Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O (1995) Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiol. Immunol.*,39(6):401-4

VIII. Anhang

1. Abkürzungen

Abb.....	Abbildung
bp.....	Basenpaar
BSA.....	Bovine serum albumin
ca.	circa
d. h.	das heißt
DAEC.....	diffus adhärenzte <i>E. coli</i>
dATP.....	Desoxyadenosin-5`-Triphosphat
dCTP.....	Desoxycytosin-5`-Triphosphat
dest.	destilliert
dGTP.....	Desoxyguanosin-5`-Triphosphat
DNA (A).....	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
dNTP.....	Desoxynukleotid-5`-Triphosphat
DTT.....	Dithiothreitol
dTTP.....	Desoxythymidin-5`-Triphosphat
DR.....	„direct repeats“
EAEC.....	enteroaggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA.....	Ethylendiamin-Tetraacetat
EHEC.....	enterohaemorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC.....	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC.....	enteropathogene <i>E. coli</i>
et al.	und andere
ETEC.....	enterotoxische <i>E. coli</i>
etc.	et cetera
ExPEC.....	extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
g.....	Gramm
ggf.....	gegebenenfalls
h.....	Stunde
IPEC.....	intestinal pathogene <i>E. coli</i>
Kap.....	Kapitel
Kb (p).....	Kilobasen (paare)

l.....	Liter
LB.....	Luria-Bertani
LGT-Agarosepuffer	low gelling temperature-Agarosepuffer
max.	maximal
MENEC	Meningitis-verursachende <i>E. coli</i>
mg.....	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM.....	Millimolar
m. M.....	mit Mannose
OD.....	optische Dichte
o. g.	oben genannt
o. M.....	ohne Mannose
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase-chain-reaction
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannte
SDS.....	Sodium dodecyl sulfate
SE	Sodium EDTA
sec.	Sekunde
SEPEC.....	Sepsis-verursachende <i>E. coli</i>
Spez.....	spezifischer
SSPE	Sodium chloride, Sodium Phosphate, EDTA
s. u.	siehe unten
Tab.....	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNE.....	Tris-NaCl-EDTA
TNEX	Tris-NaCl-EDTA-Triton X-200
Tris.....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

u. a.	und anderes
u. ä.	und ähnliches
ÜN.....	über Nacht
UPEC.....	Uropathogene <i>E. coli</i>
UTI.....	Urogenitaltraktinfektion
UV.....	Ultraviolett
V.....	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.....	zum Beispiel
µg.....	Mikrogramm
µl.....	Mikroliter

VIII. Anhang

PAI I536	PAI I-ORF37 (CS12 major subunit)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF38 (CS12 chaperone, FasB-like)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF39 (CS12 chaperone, FasC-like)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF40 (CS12 usher, FasD-like)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF41 (CS12 chaperone, FasE-like)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF42 (CS12 minor subunit, FasF-like)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF43 (CS12 put. Adhäsın, FasG-like)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF44 (Transposase-like, IS110)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF46 (ATP-bind. Protein, ABC Transporter)	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	+
PAI I536	PAI I-ORF47 (Membranprotein, ABC Transporter)	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF48 (probable adhesin, N. meningitidis)	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF49	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF50	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF51	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF52	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF52	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF53	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
PAI I536	PAI I-ORF55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF57	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF63 (delta RT/Maturase)	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF64	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF65 (ORF A, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF66 (ORF B, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF68	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF69	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF72 (delta put. Tnp downstream CS12)	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF73	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+

VIII. Anhang

PAI I536	PAI I-ORF74	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF75	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF77	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI I-ORF78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF 82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI I536	PAI I-ORF84	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF1	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF 2	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF3 (1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF3 (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF3 (3)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF4	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF6 (prfX)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI I536	PAI II-ORF7 (prfG)	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF8 (prfF)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF9 (prfE)	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF10 (prfK)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF11 (prfJ)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF12 (prfD)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+	+	0	0
PAI II536	PAI II-ORF13 (prfC)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF14 (prfH)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+
PAI II536	PAI II-ORF15 (prfA)	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
PAI II536	PAI II-ORF16 (prfB)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF17 (prfI)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0

VIII. Anhang

PAI II536	PAI II-ORF18 (delta hyp. Protein IS911)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF22	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF22	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF23	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF24	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF25	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF33	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF34	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF35 (delta Methyltransferase)	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+
PAI II536	PAI II-ORF39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+
PAI II536	PAI II-ORF40	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+
PAI II536	PAI II-ORF41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF48	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF49	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF50	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF55	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF57	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF58	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF61	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF68	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF69	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF69	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF70	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF71	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF72 (ORF B, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF73 (ORF A, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF74	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF78	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI II536	PAI II-ORF79	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+

VIII. Anhang

PAI II536	PAI II-ORF82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI II536	PAI II-ORF88	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF1	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF2	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF3 (ORF A, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF4 (ORF B, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF5	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF5	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF7 (delta DAHP-Synthase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF8 (put. Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF10 (delta cvaB)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF11 (ähnl. microcin V immunity protein)	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF12 (ähnl. colicin V precursor)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF13 (deltaMceF protein, K. pneumoniae)	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF14 (Z1193/Z1633)	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF15 (delta Z1194/delta Z1634)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF16 (deltaZ1195/deltaZ1635)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF19	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+
PAI III536	PAI III-ORF20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
PAI III536	PAI III-ORF21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+
PAI III536	PAI III-ORF24	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
PAI III536	PAI III-ORF25	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF26	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+

VIII. Anhang

PAI III536	PAI III-ORF26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF27 (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF29	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	+	+
PAI III536	PAI III-ORF30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF32 (delta Transposase, IS4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF34 (delta put. Transposase, O157:H7)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF35 (deltaZ4324)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF36 (deltaHmuR-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF37 (deltanmA1686-like)	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF38 (deltaBH1790, unknown protein)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF39 (delta ORF A, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF40 (ORF B, IS100 Transposase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF41 (delta ORF51, IS679)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF42 (ORF50, IS679)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+
PAI III536	PAI III-ORF43 (delta unknown protein ISEc8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF44 (delta oriCreplication inhibitor-like)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF45 (delta LysU-like)	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF46 (deltaPbIR-like)	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF47 (cadA-like)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI III536	PAI III-ORF48 (CadB-like)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+
PAI III536	PAI III-ORF49 (delta Z1648)	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+
PAI III536	PAI III-ORF50 (Z1209/Z1649-like)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF51 (Z1650-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF52 (Sap-like, S. flexneri 2a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF53 (Z1215-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF54 (Z1216-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+

VIII. Anhang

PAI III536	PAI III-ORF55 (Z1217-like, yeeS)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF56 (Z1218-like, yeeT)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF58 (yeeU-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF59 (L0007, yeeV-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF60 (L0008)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF61 (L0009, Z1663-like)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF63	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF64 (deltaIntegrase)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	+
PAI III536	PAI III-ORF66 (deltaHämoglobinprotease)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	
PAI III536	PAI III-ORF66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+
PAI V536	kpsM, Region 3	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	kpsT, Region 3	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	PAI V, kpsF, K15, Region 1	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
PAI V536	PAI V, kpsE, K15, Region 1	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI V536	PAI V, kpsD, K15, Region 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI V536	PAI V, kpsU, K15, Region 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI V536	PAI V, kpsC, K15, Region 1	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
PAI V536	PAI V, kpsSK5, K15, Region 1	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	PAI V, kpsSK10, K15, Region 1	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	Kapsel536, Region2, K15	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
PAI V536	Kapsel536, Region2, K15	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	Kapsel536, Region2, K15	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	Kapsel536, Region2, K15	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI V536	Kapsel536, Region2, K15	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HPI	PAI IV-ORF1	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+
HPI	PAI IV-ORF2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+	+
HPI	PAI IV-ORF3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
HPI	PAI IV-ORF4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0

VIII. Anhang

HPI	PAI IV-ORF5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
HPI	PAI IV-ORF6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
HPI	PAI IV-ORF7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
HPI	PAI IV-ORF8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+
HPI	PAI IV-ORF9 (ybtU)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
HPI	PAI IV-ORF10 (ybtT)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
HPI	PAI IV-ORF11 (ybtE)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+
HPI	PAI IV-ORF12 (fyuA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
PAI IV536	PAI IV-ORF1	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI IV536	PAI IV-ORF2	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI IV536	PAI IV-ORF8	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+
PAI IV536	PAI IV-ORF9 (ybtU)	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAI IV536	PAI IV-ORF10 (ybtT)	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI IV536	PAI IV-ORF11 (ybtE)	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
PAI IV536	PAI IV-ORF12 (fyuA)	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Typ 1 Fimbrien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
ExPEC	Toxin, extraintestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
ExPEC	Toxin, extraintestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
ExPEC	Cytolethal distending toxin 2, extraintestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
ExPEC	Cytolethal distending toxin 2, extraintestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+
ExPEC	Cytolethal distending toxin 2, extraintestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
ExPEC	Cytolethal distending toxin 3, extraintestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+

VIII. Anhang

EAEC	Shigella enterotoxin 1, intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EAEC	Adhesin, intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EAEC	EAST1 toxin, intestinal	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
EAEC	transcriptional activator of aggregative adherence fimbria II (AAF/II) expression, intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	+	+	
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	
S.f., pWR100	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	
S.f., pWR100; EIEC	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	
S.f., pWR100; EIEC	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SHI-O PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SHI-O PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	+	
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+	
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+
S. f., SHI-2 PAI	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+
S.f., pWR100; EIEC	Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S.f., pWR100, SHI-1	serine protease, Shigella/intestinal	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
Shigella, SHE-PAI	surface-located autotransporter protein, intestinal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Virulenzplasmide, PAIs	ORF A, IS100 Transposase	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
Virulenzplasmide, PAIs	IS100 Transposase	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+
K-12, O157:H7, Salmonella	outer membrane receptor for transport of vitamin B12, E colicins, and bacteriophage BF23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	

3. Genomvergleich mit dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655

Tab. 18: Fehlende Genomteile der untersuchten Stämme gegenüber dem Stamm MG1655 K12

J 177	J 1360	J 1739	J 1745	536	536-31	768	768-1	DSM6601	DSM6601-	7117	7117-	764	764-6
b0017 (yi82_1)	b0017 (yi82_1)	b0017 (yi82_1)	b0017 (yi82_1)	b0001 (thrL)	b0017 (yi82_1)	b0016 (yi81_1)	b0017 (yi82_1)	b0001 (thrL)	b0016 (yi81_1)	b0001 (thrL)	b0001 (thrL)	b0016 (yi81_1)	b0017 (yi82_1)
b0056 (yabP)	b0056 (yabP)	b0056 (yabP)	b0056 (yabP)	b0017 (yi82_1)	b0056 (yabP)	b0017 (yi82_1)	b0056 (yabP)	b0017 (yi82_1)	b0056 (yabP)				
b0057 (yabQ)	b0057 (yabQ)	b0057 (yabQ)	b0057 (yabQ)	b0021 (insB_1)	b0057 (yabQ)	b0056 (yabP)	b0057 (yabQ)	b0023 (rpsT)	b0023 (rpsT)	b0023 (rpsT)	b0056 (yabP)	b0057 (yabQ)	b0057 (yabQ)
b0075 (leuL)	b0062 (araA)	b0062 (araA)	b0062 (araA)	b0022 (insA_1)	b0062 (araA)	b0057 (yabQ)	b0075 (leuL)	b0057 (yabQ)	b0056 (yabP)	b0056 (yabP)	b0057 (yabQ)	b0070 (yabM)	b0062 (araA)
b0079 (fruL)	b0070 (yabM)	b0070 (yabM)	b0070 (yabM)	b0023 (rpsT)	b0070 (yabM)	b0075 (leuL)	b0079 (fruL)	b0079 (fruL)	b0057 (yabQ)	b0057 (yabQ)	b0062 (araA)	b0079 (fruL)	b0070 (yabM)
b0135 (yadC)	b0075 (leuL)	b0079 (fruL)	b0079 (fruL)	b0057 (yabQ)	b0079 (fruL)	b0079 (fruL)	b0100 (f44)	b0105 (f35)	b0075 (leuL)	b0062 (araA)	b0075 (leuL)	b0100 (f44)	b0075 (leuL)
b0165 (f43)	b0079 (fruL)	b0135 (yadC)	b0105 (f35)	b0070 (yabM)	b0135 (yadC)	b0135 (yadC)	b0105 (f35)	b0135 (yadC)	b0079 (fruL)	b0075 (leuL)	b0079 (fruL)	b0118 (acnB)	b0079 (fruL)
b0218 (f112)	b0135 (yadC)	b0165 (f43)	b0135 (yadC)	b0079 (fruL)	b0140 (ecpD)	b0165 (f43)	b0135 (yadC)	b0137 (yadL)	b0100 (f44)	b0079 (fruL)	b0100 (f44)	b0135 (yadC)	b0100 (f44)
b0225 (yafQ)	b0140 (ecpD)	b0218 (f112)	b0165 (f43)	b0105 (f35)	b0165 (f43)	b0218 (f112)	b0140 (ecpD)	b0138 (yadM)	b0105 (f35)	b0100 (f44)	b0105 (f35)	b0136 (yadK)	b0105 (f35)
b0226 (dinJ)	b0165 (f43)	b0226 (dinJ)	b0218 (f112)	b0135 (yadC)	b0218 (f112)	b0225 (yafQ)	b0165 (f43)	b0139 (htrE)	b0135 (yadC)	b0105 (f35)	b0135 (yadC)	b0137 (yadL)	b0135 (yadC)
b0249 (f80)	b0218 (f112)	b0249 (f80)	b0226 (dinJ)	b0137 (yadL)	b0225 (yafQ)	b0226 (dinJ)	b0218 (f112)	b0164 (yaeI)	b0136 (yadK)	b0135 (yadC)	b0165 (f43)	b0138 (yadM)	b0140 (ecpD)
b0254 (perR)	b0226 (dinJ)	b0259 (yi52_1)	b0249 (f80)	b0138 (yadM)	b0226 (dinJ)	b0266 (yagB)	b0225 (yafQ)	b0165 (f43)	b0140 (ecpD)	b0165 (f43)	b0225 (yafQ)	b0141 (yadN)	b0165 (f43)
b0259 (yi52_1)	b0247 (f158)	b0263 (f120)	b0252 (yafZ)	b0139 (htrE)	b0247 (f158)	b0267 (yagA)	b0226 (dinJ)	b0217 (o261)	b0165 (f43)	b0189 (yaeO)	b0226 (dinJ)	b0218 (f112)	b0218 (f112)
b0263 (f120)	b0249 (f80)	b0266 (yagB)	b0259 (yi52_1)	b0165 (f43)	b0249 (f80)	b0276 (yagJ)	b0249 (f80)	b0218 (f112)	b0218 (f112)	b0218 (f112)	b0232 (yafN)	b0225 (yafQ)	b0225 (yafQ)
b0266 (yagB)	b0252 (yafZ)	b0267 (yagA)	b0263 (f120)	b0218 (f112)	b0259 (yi52_1)	b0277 (yagK)	b0259 (yi52_1)	b0225 (yafQ)	b0225 (yafQ)	b0225 (yafQ)	b0247 (f158)	b0226 (dinJ)	b0226 (dinJ)
b0267 (yagA)	b0254 (perR)	b0276 (yagJ)	b0266 (yagB)	b0225 (yafQ)	b0261 (yagD)	b0280 (f146)	b0267 (yagA)	b0226 (dinJ)	b0226 (dinJ)	b0226 (dinJ)	b0249 (f80)	b0245 (f113)	b0247 (f158)
b0270 (yagG)	b0257 (o141)	b0277 (yagK)	b0267 (yagA)	b0226 (dinJ)	b0263 (f120)	b0349 (o309)	b0270 (yagG)	b0232 (yafN)	b0232 (yafN)	b0232 (yafN)	b0252 (yafZ)	b0248 (yafX)	b0249 (f80)
b0276 (yagJ)	b0259 (yi52_1)	b0280 (f146)	b0276 (yagJ)	b0232 (yafN)	b0266 (yagB)	b0497 (rhsD)	b0276 (yagJ)	b0233 (yafO)	b0245 (f113)	b0236 (prfH)	b0254 (perR)	b0250 (yafB)	b0252 (yafZ)
b0277 (yagK)	b0263 (f120)	b0370 (f89)	b0277 (yagK)	b0245 (f113)	b0267 (yagA)	b0500 (ybbD)	b0277 (yagK)	b0245 (f113)	b0247 (f158)	b0245 (f113)	b0259 (yi52_1)	b0254 (perR)	b0259 (yi52_1)
b0280 (f146)	b0266 (yagB)	b0467 (priC)	b0280 (f146)	b0246 (yafW)	b0270 (yagG)	b0501 (o63)	b0280 (f146)	b0246 (yafW)	b0252 (yafZ)	b0247 (f158)	b0263 (f120)	b0259 (yi52_1)	b0261 (yagD)
b0340 (cynS)	b0267 (yagA)	b0500 (ybbD)	b0340 (cynS)	b0248 (yafX)	b0276 (yagJ)	b0539 (f87)	b0340 (cynS)	b0248 (yafX)	b0254 (perR)	b0249 (f80)	b0266 (yagB)	b0261 (yagD)	b0263 (f120)
b0349 (o309)	b0276 (yagJ)	b0501 (o63)	b0347 (o554)	b0249 (f80)	b0277 (yagK)	b0542 (o45)	b0349 (o309)	b0249 (f80)	b0259 (yi52_1)	b0252 (yafZ)	b0267 (yagA)	b0268 (yagE)	b0266 (yagB)
b0370 (f89)	b0277 (yagK)	b0535 (fimZ)	b0349 (o309)	b0250 (yafB)	b0280 (f146)	b0552 (yi52_2)	b0370 (f89)	b0250 (yafB)	b0261 (yagD)	b0254 (perR)	b0270 (yagG)	b0269 (yagF)	b0267 (yagA)
b0500 (ybbD)	b0280 (f146)	b0540 (o102)	b0370 (f89)	b0253 (yafA)	b0281 (f466)	b0557 (bacteriophage)	b0466 (ybaM)	b0253 (yafA)	b0263 (f120)	b0259 (yi52_1)	b0276 (yagJ)	b0271 (o536)	b0270 (yagG)
b0501 (o63)	b0370 (f89)	b0541 (tra5_2)	b0466 (ybaM)	b0254 (perR)	b0340 (cynS)	b0558 (f150)	b0467 (priC)	b0254 (perR)	b0266 (yagB)	b0263 (f120)	b0277 (yagK)	b0272 (yagI)	b0276 (yagJ)
b0532 (o867)	b0449 (mdlB)	b0542 (o45)	b0467 (priC)	b0256 (tra8_1)	b0349 (o309)	b0566 (envY)	b0497 (rhsD)	b0259 (yi52_1)	b0267 (yagA)	b0266 (yagB)	b0280 (f146)	b0276 (yagJ)	b0277 (yagK)
b0535 (fimZ)	b0467 (priC)	b0546 (o265)	b0497 (rhsD)	b0259 (yi52_1)	b0370 (f89)	b0582 (yi81_2)	b0500 (ybbD)	b0260 (yafD)	b0269 (yagF)	b0267 (yagA)	b0281 (f466)	b0277 (yagK)	b0280 (f146)

VIII. Anhang

b0540 (o102)	b0497 (rhsD)	b0548 (o56)	b0500 (ybbD)	b0260 (ykfD)	b0466 (ybaM)	b0632 (dacA)	b0501 (o63)	b0261 (yagD)	b0276 (yagJ)	b0270 (yagG)	b0302 (o89)	b0278 (yagL)	b0309 (f70)
b0542 (o45)	b0500 (ybbD)	b0552 (yi52_2)	b0501 (o63)	b0261 (yagD)	b0467 (priC)	b0644 (f327)	b0539 (f87)	b0262 (yagC)	b0277 (yagK)	b0276 (yagJ)	b0370 (f89)	b0279 (f284)	b0326 (o271)
b0548 (o56)	b0501 (o63)	b0553 (nmpC)	b0532 (o867)	b0262 (yagC)	b0497 (rhsD)	b0645 (o235)	b0542 (o45)	b0263 (f120)	b0279 (f284)	b0277 (yagK)	b0371 (o486)	b0284 (yagR)	b0340 (cynS)
b0552 (yi52_2)	b0535 (fimZ)	b0558 (f150)	b0535 (fimZ)	b0263 (f120)	b0500 (ybbD)	b0656 (yi52_3)	b0546 (o265)	b0266 (yagB)	b0280 (f146)	b0279 (f284)	b0379 (f102)	b0285 (yagS)	b0349 (o309)
b0558 (f150)	b0540 (o102)	b0559 (o68)	b0542 (o45)	b0265 (insA_2)	b0501 (o63)	b0669 (o39)	b0552 (yi52_2)	b0268 (yagE)	b0302 (o89)	b0280 (f146)	b0421 (ispA)	b0302 (o89)	b0370 (f89)
b0559 (o68)	b0541 (tra5_2)	b0566 (envY)	b0546 (o265)	b0266 (yagB)	b0532 (o867)	b0690 (ybfG)	b0553 (nmpC)	b0269 (yagF)	b0326 (o271)	b0281 (f466)	b0466 (ybaM)	b0307 (ykgF)	b0466 (ybaM)
b0566 (envY)	b0542 (o45)	b0632 (dacA)	b0552 (yi52_2)	b0268 (yagE)	b0535 (fimZ)	b0701 (o73)	b0557 (bacteriophage)	b0272 (yagI)	b0370 (f89)	b0302 (o89)	b0467 (priC)	b0326 (o271)	b0467 (priC)
b0582 (yi81_2)	b0546 (o265)	b0645 (o235)	b0553 (nmpC)	b0269 (yagF)	b0542 (o45)	b0717 (f242)	b0558 (f150)	b0276 (yagJ)	b0466 (ybaM)	b0303 (f83)	b0483 (o131)	b0339 (cynT)	b0497 (rhsD)
b0644 (f327)	b0548 (o56)	b0656 (yi52_3)	b0558 (f150)	b0272 (yagI)	b0546 (o265)	b0719 (ybgD)	b0559 (o68)	b0277 (yagK)	b0467 (priC)	b0309 (f70)	b0500 (ybbD)	b0346 (f315)	b0500 (ybbD)
b0645 (o235)	b0552 (yi52_2)	b0690 (ybfG)	b0559 (o68)	b0274 (insB_3)	b0552 (yi52_2)	b0732 (ybgB)	b0566 (envY)	b0278 (yagL)	b0497 (rhsD)	b0370 (f89)	b0501 (o63)	b0349 (o309)	b0501 (o63)
b0650 (f556)	b0553 (nmpC)	b0691 (ybfH)	b0563 (o61)	b0276 (yagJ)	b0553 (nmpC)	b0917 (o60)	b0632 (dacA)	b0279 (f284)	b0500 (ybbD)	b0371 (o486)	b0542 (o45)	b0350 (o271)	b0532 (o867)
b0656 (yi52_3)	b0558 (f150)	b0701 (o73)	b0566 (envY)	b0277 (yagK)	b0558 (f150)	b0942 (o180)	b0656 (yi52_3)	b0280 (f146)	b0501 (o63)	b0389 (yaiA)	b0548 (o56)	b0352 (o337)	b0535 (fimZ)
b0690 (ybfG)	b0559 (o68)	b0706 (ybfD)	b0582 (yi81_2)	b0278 (yagL)	b0559 (o68)	b0984 (f698)	b0690 (ybfG)	b0281 (f466)	b0535 (fimZ)	b0406 (tgt)	b0552 (yi52_2)	b0353 (o418)	b0542 (o45)
b0691 (ybfH)	b0563 (o61)	b0717 (f242)	b0608 (o412)	b0279 (f284)	b0563 (o61)	b0987 (f107)	b0691 (ybfH)	b0286 (yagT)	b0539 (f87)	b0421 (ispA)	b0553 (nmpC)	b0497 (rhsD)	b0546 (o265)
b0701 (o73)	b0582 (yi81_2)	b0719 (ybgD)	b0644 (f327)	b0280 (f146)	b0565 (ompT)	b1028 (o107)	b0701 (o73)	b0302 (o89)	b0542 (o45)	b0461 (ybaJ)	b0557 (bacteriophage)	b0498 (ybbC)	b0552 (yi52_2)
b0717 (f242)	b0632 (dacA)	b0732 (ybgB)	b0645 (o235)	b0281 (f466)	b0566 (envY)	b1029 (o328)	b0717 (f242)	b0326 (o271)	b0546 (o265)	b0466 (ybaM)	b0558 (f150)	b0501 (o63)	b0553 (nmpC)
b0719 (ybgD)	b0645 (o235)	b0863 (artI)	b0656 (yi52_3)	b0286 (yagT)	b0582 (yi81_2)	b1030 (o83)	b0719 (ybgD)	b0339 (cynT)	b0547 (o151)	b0467 (priC)	b0559 (o68)	b0530 (o191)	b0557 (bacteriophage)
b0732 (ybgB)	b0656 (yi52_3)	b0901 (ycaK)	b0690 (ybfG)	b0302 (o89)	b0603 (f300)	b1052 (f32)	b0732 (ybgB)	b0340 (cynS)	b0548 (o56)	b0483 (o131)	b0563 (o61)	b0531 (o230)	b0558 (f150)
b0779 (uvrB)	b0669 (o39)	b0917 (o60)	b0691 (ybfH)	b0326 (o271)	b0608 (o412)	b1058 (f46)	b0917 (o60)	b0346 (f315)	b0552 (yi52_2)	b0497 (rhsD)	b0565 (ompT)	b0533 (o325)	b0559 (o68)
b0901 (ycaK)	b0671 (o50)	b0990 (cspG)	b0701 (o73)	b0339 (cynT)	b0632 (dacA)	b1137 (f221)	b0939 (o233)	b0348 (mhpB)	b0553 (nmpC)	b0500 (ybbD)	b0582 (yi81_2)	b0534 (ybcG)	b0566 (envY)
b0917 (o60)	b0690 (ybfG)	b1016 (o39)	b0717 (f242)	b0340 (cynS)	b0644 (f327)	b1138 (f234)	b0942 (o180)	b0349 (o309)	b0557 (bacteriophage)	b0501 (o63)	b0615 (f510)	b0538 (o186)	b0582 (yi81_2)
b0939 (o233)	b0691 (ybfH)	b1028 (o107)	b0719 (ybgD)	b0346 (f315)	b0645 (o235)	b1139 (lit)	b0943 (o187)	b0352 (o337)	b0558 (f150)	b0542 (o45)	b0632 (dacA)	b0539 (f87)	b0608 (o412)
b0940 (o866)	b0701 (o73)	b1030 (o83)	b0732 (ybgB)	b0348 (mhpB)	b0656 (yi52_3)	b1141 (f81)	b0984 (f698)	b0353 (o418)	b0559 (o68)	b0546 (o265)	b0656 (yi52_3)	b0542 (o45)	b0632 (dacA)
b0984 (f698)	b0717 (f242)	b1031 (o137)	b0779 (uvrB)	b0353 (o418)	b0689 (o164)	b1143 (o128)	b1028 (o107)	b0370 (f89)	b0563 (o61)	b0548 (o56)	b0667 (o45)	b0552 (yi52_2)	b0644 (f327)
b0987 (f107)	b0719 (ybgD)	b1052 (f32)	b0901 (ycaK)	b0370 (f89)	b0690 (ybfG)	b1144 (f94)	b1029 (o328)	b0373 (f102)	b0565 (ompT)	b0552 (yi52_2)	b0669 (o39)	b0557 (bacteriophage)	b0645 (o235)
b0990 (cspG)	b0732 (ybgB)	b1058 (f46)	b0917 (o60)	b0408 (secD)	b0691 (ybfH)	b1145 (f224)	b1030 (o83)	b0462 (acrB)	b0566 (envY)	b0553 (nmpC)	b0671 (o50)	b0558 (f150)	b0656 (yi52_3)
b1016 (o39)	b0762 (o49)	b1138 (f234)	b0939 (o233)	b0462 (acrB)	b0701 (o73)	b1150 (o60)	b1052 (f32)	b0466 (ybaM)	b0582 (yi81_2)	b0557 (bacteriophage)	b0689 (o164)	b0564 (appY)	b0690 (ybfG)
b1028 (o107)	b0779 (uvrB)	b1139 (lit)	b0956 (ybcG)	b0466 (ybaM)	b0706 (ybfD)	b1154 (ycfK)	b1058 (f46)	b0497 (rhsD)	b0603 (f300)	b0558 (f150)	b0690 (ybfG)	b0566 (envY)	b0691 (ybfH)
b1029 (o328)	b0798 (ybiA)	b1140 (f375)	b0984 (f698)	b0497 (rhsD)	b0717 (f242)	b1158 (pin)	b1138 (f234)	b0501 (o63)	b0632 (dacA)	b0559 (o68)	b0691 (ybfH)	b0577 (ybdG)	b0701 (o73)
b1030 (o83)	b0863 (artI)	b1141 (f81)	b1028 (o107)	b0501 (o63)	b0719 (ybgD)	b1166 (o88)	b1139 (lit)	b0530 (o191)	b0644 (f327)	b0563 (o61)	b0701 (o73)	b0644 (f327)	b0717 (f242)
b1031 (o137)	b0876 (o552)	b1143 (o128)	b1030 (o83)	b0530 (o191)	b0732 (ybgB)	b1196 (o146)	b1141 (f81)	b0531 (o230)	b0656 (yi52_3)	b0565 (ompT)	b0719 (ybgD)	b0646 (o475)	b0719 (ybgD)

VIII. Anhang

b1052 (f32)	b0901 (ycaK)	b1159 (mcrA)	b1052 (f32)	b0531 (o230)	b0739 (tolA)	b1239 (ychG)	b1143 (o128)	b0535 (fimZ)	b0669 (o39)	b0582 (yi81_2)	b0732 (ybgB)	b0648 (o235)	b0732 (ybgB)
b1058 (f46)	b0917 (o60)	b1166 (o88)	b1058 (f46)	b0535 (fimZ)	b0779 (uvrB)	b1240 (f76)	b1145 (f224)	b0539 (f87)	b0690 (ybfG)	b0611 (rna)	b0739 (tolA)	b0669 (o39)	b0787 (o237)
b1138 (f234)	b0990 (cspG)	b1196 (o146)	b1138 (f234)	b0540 (o102)	b0798 (ybiA)	b1257 (yciE)	b1150 (o60)	b0540 (o102)	b0701 (o73)	b0615 (f510)	b0762 (o49)	b0690 (ybfG)	b0798 (ybiA)
b1139 (lit)	b1016 (o39)	b1239 (ychG)	b1139 (lit)	b0552 (yi52_2)	b0901 (ycaK)	b1259 (yciG)	b1154 (ycfK)	b0552 (yi52_2)	b0706 (ybfD)	b0632 (dacA)	b0779 (uvrB)	b0700 (rhsC)	b0901 (ycaK)
b1140 (f375)	b1028 (o107)	b1240 (f76)	b1140 (f375)	b0557 (bacteriophage)	b0917 (o60)	b1297 (f498)	b1157 (f179)	b0557 (bacteriophage)	b0717 (f242)	b0656 (yi52_3)	b0826 (moeB)	b0701 (o73)	b0917 (o60)
b1141 (f81)	b1030 (o83)	b1331 (yi52_4)	b1141 (f81)	b0558 (f150)	b0939 (o233)	b1331 (yi52_4)	b1158 (pin)	b0558 (f150)	b0719 (ybgD)	b0667 (o45)	b0876 (o552)	b0702 (ybfB)	b0939 (o233)
b1143 (o128)	b1031 (o137)	b1346 (f79)	b1143 (o128)	b0559 (o68)	b0943 (o187)	b1346 (f79)	b1159 (mcrA)	b0559 (o68)	b0732 (ybgB)	b0669 (o39)	b0917 (o60)	b0704 (ybfC)	b0940 (o866)
b1159 (mcrA)	b1052 (f32)	b1348 (lar)	b1157 (f179)	b0563 (o61)	b0956 (ybcG)	b1347 (ydaC)	b1166 (o88)	b0560 (nohB)	b0779 (uvrB)	b0671 (o50)	b0956 (ybcG)	b0717 (f242)	b0941 (o356)
b1166 (o88)	b1058 (f46)	b1351 (racC)	b1158 (pin)	b0582 (yi81_2)	b0984 (f698)	b1348 (lar)	b1196 (o146)	b0563 (o61)	b0917 (o60)	b0687 (seqA)	b0990 (cspG)	b0718 (f818)	b0942 (o180)
b1196 (o146)	b1138 (f234)	b1352 (ydaD)	b1159 (mcrA)	b0645 (o235)	b0987 (f107)	b1349 (recT)	b1239 (ychG)	b0582 (yi81_2)	b0939 (o233)	b0689 (o164)	b1005 (o76)	b0719 (ybgD)	b0943 (o187)
b1239 (ychG)	b1139 (lit)	b1354 (o58)	b1166 (o88)	b0648 (o235)	b0990 (cspG)	b1351 (racC)	b1240 (f76)	b0645 (o235)	b0956 (ybcG)	b0690 (ybfG)	b1018 (o375)	b0725 (o86)	b0956 (ybcG)
b1240 (f76)	b1140 (f375)	b1357 (o98)	b1196 (o146)	b0650 (f556)	b1028 (o107)	b1352 (ydaD)	b1256 (ycjD)	b0648 (o235)	b0984 (f698)	b0691 (ybfH)	b1028 (o107)	b0730 (farR)	b0984 (f698)
b1331 (yi52_4)	b1141 (f81)	b1358 (o140)	b1256 (ycjD)	b0701 (o73)	b1029 (o328)	b1355 (f59)	b1257 (yciE)	b0650 (f556)	b0987 (f107)	b0701 (o73)	b1030 (o83)	b0795 (f332)	b0987 (f107)
b1346 (f79)	b1143 (o128)	b1370 (yi52_5)	b1331 (yi52_4)	b0702 (ybfB)	b1030 (o83)	b1357 (o98)	b1259 (yciG)	b0656 (yi52_3)	b1028 (o107)	b0719 (ybgD)	b1052 (f32)	b0899 (o540)	b0990 (cspG)
b1348 (lar)	b1158 (pin)	b1374 (f196)	b1346 (f79)	b0704 (ybfC)	b1052 (f32)	b1358 (o140)	b1331 (yi52_4)	b0701 (o73)	b1029 (o328)	b0732 (ybgB)	b1058 (f46)	b0900 (f302)	b0991 (sfa)
b1351 (racC)	b1159 (mcrA)	b1375 (f88)	b1348 (lar)	b0719 (ybgD)	b1058 (f46)	b1364 (o93)	b1346 (f79)	b0702 (ybfB)	b1030 (o83)	b0739 (tolA)	b1122 (f156)	b0938 (o182)	b1028 (o107)
b1352 (ydaD)	b1166 (o88)	b1391 (o167)	b1349 (recT)	b0725 (o86)	b1138 (f234)	b1370 (yi52_5)	b1348 (lar)	b0704 (ybfC)	b1031 (o137)	b0762 (o49)	b1137 (f221)	b0939 (o233)	b1029 (o328)
b1354 (o58)	b1167 (o82)	b1396 (o140)	b1351 (racC)	b0730 (farR)	b1139 (lit)	b1374 (f196)	b1351 (racC)	b0705 (o285)	b1052 (f32)	b0779 (uvrB)	b1138 (f234)	b0941 (o356)	b1030 (o83)
b1355 (f59)	b1196 (o146)	b1426 (ydcH)	b1352 (ydaD)	b0821 (f421)	b1140 (f375)	b1375 (f88)	b1352 (ydaD)	b0719 (ybgD)	b1058 (f46)	b0826 (moeB)	b1139 (lit)	b0942 (o180)	b1052 (f32)
b1357 (o98)	b1229 (tpr)	b1455 (o70)	b1354 (o58)	b0900 (f302)	b1141 (f81)	b1393 (o255)	b1354 (o58)	b0725 (o86)	b1137 (f221)	b0876 (o552)	b1140 (f375)	b0943 (o187)	b1058 (f46)
b1358 (o140)	b1331 (yi52_4)	b1457 (ydcD)	b1355 (f59)	b0938 (o182)	b1143 (o128)	b1396 (o140)	b1355 (f59)	b0730 (farR)	b1138 (f234)	b0880 (cspD)	b1141 (f81)	b0944 (ybcF)	b1137 (f221)
b1364 (o93)	b1348 (lar)	b1458 (o248)	b1356 (f158)	b0941 (o356)	b1154 (ycfK)	b1407 (ydbD)	b1356 (f158)	b0740 (tolB)	b1139 (lit)	b0912 (himD)	b1143 (o128)	b0982 (f152)	b1138 (f234)
b1370 (yi52_5)	b1351 (racC)	b1459 (o66)	b1357 (o98)	b0942 (o180)	b1157 (f179)	b1437 (f65)	b1357 (o98)	b0809 (glnQ)	b1140 (f375)	b0917 (o60)	b1144 (f94)	b0983 (f379)	b1139 (lit)
b1375 (f88)	b1352 (ydaD)	b1461 (ydcE)	b1358 (o140)	b0943 (o187)	b1158 (pin)	b1455 (o70)	b1358 (o140)	b0821 (f421)	b1141 (f81)	b0956 (ybcG)	b1145 (f224)	b0984 (f698)	b1141 (f81)
b1391 (o167)	b1355 (f59)	b1472 (f96)	b1364 (o93)	b0944 (ybcF)	b1159 (mcrA)	b1457 (ydcD)	b1364 (o93)	b0900 (f302)	b1142 (f103)	b0990 (cspG)	b1150 (o60)	b0985 (f248)	b1143 (o128)
b1396 (o140)	b1357 (o98)	b1484 (f328)	b1370 (yi52_5)	b0981 (yccC)	b1166 (o88)	b1458 (o248)	b1370 (yi52_5)	b0938 (o182)	b1143 (o128)	b1005 (o76)	b1152 (o263)	b0986 (f214)	b1157 (f179)
b1407 (ydbD)	b1370 (yi52_5)	b1544 (o88)	b1375 (f88)	b0984 (f698)	b1196 (o146)	b1459 (o66)	b1374 (f196)	b0941 (o356)	b1144 (f94)	b1028 (o107)	b1154 (ycfK)	b0987 (f107)	b1158 (pin)
b1426 (ydcH)	b1375 (f88)	b1549 (o141)	b1389 (o95)	b0985 (f248)	b1239 (ychG)	b1461 (ydcE)	b1375 (f88)	b0942 (o180)	b1145 (f224)	b1030 (o83)	b1157 (f179)	b1001 (yccE)	b1159 (mcrA)
b1437 (f65)	b1391 (o167)	b1550 (f58)	b1391 (o167)	b0986 (f214)	b1240 (f76)	b1472 (f96)	b1391 (o167)	b0943 (o187)	b1150 (o60)	b1052 (f32)	b1158 (pin)	b1028 (o107)	b1164 (o78)
b1455 (o70)	b1393 (o255)	b1551 (f63)	b1393 (o255)	b0987 (f107)	b1256 (ycjD)	b1484 (f328)	b1396 (o140)	b0944 (ybcF)	b1152 (o263)	b1058 (f46)	b1159 (mcrA)	b1029 (o328)	b1166 (o88)
b1457 (ydcD)	b1396 (o140)	b1552 (f70)	b1396 (o140)	b0988 (insB_4)	b1299 (ycjC)	b1487 (f516)	b1407 (ydbD)	b0981 (yccC)	b1154 (ycfK)	b1061 (dinI)	b1160 (f107)	b1030 (o83)	b1167 (o82)
b1458 (o248)	b1426 (ydcH)	b1561 (rem)	b1407 (ydbD)	b0991 (sfa)	b1331 (yi52_4)	b1488 (f193)	b1426 (ydcH)	b0984 (f698)	b1157 (f179)	b1089 (rpmF)	b1164 (o78)	b1039 (csgE)	b1196 (o146)

VIII. Anhang

b1459 (o66)	b1455 (o70)	b1563 (relE)	b1411 (o430)	b1001 (yccE)	b1346 (f79)	b1496 (yddA)	b1437 (f65)	b0985 (f248)	b1158 (pin)	b1122 (f156)	b1166 (o88)	b1069 (mviN)	b1239 (ychG)
b1461 (ydcE)	b1457 (ydcD)	b1567 (f49)	b1426 (ydcH)	b1016 (o39)	b1347 (ydaC)	b1500 (f65)	b1455 (o70)	b0986 (f214)	b1159 (mcrA)	b1137 (f221)	b1167 (o82)	b1137 (f221)	b1240 (f76)
b1472 (f96)	b1459 (o66)	b1629 (o740)	b1437 (f65)	b1027 (f102)	b1348 (lar)	b1510 (ydeK)	b1457 (ydcD)	b0987 (f107)	b1160 (f107)	b1138 (f234)	b1183 (umuD)	b1138 (f234)	b1256 (ycjD)
b1487 (f516)	b1461 (ydcE)	b1707 (f237)	b1455 (o70)	b1028 (o107)	b1349 (recT)	b1515 (o330)	b1458 (o248)	b0990 (cspG)	b1164 (o78)	b1139 (lit)	b1237 (hns)	b1139 (lit)	b1257 (yciE)
b1488 (f193)	b1472 (f96)	b1811 (f59)	b1457 (ydcD)	b1029 (o328)	b1351 (racC)	b1518 (o96)	b1459 (o66)	b0991 (sfa)	b1166 (o88)	b1140 (f375)	b1280 (yciM)	b1141 (f81)	b1259 (yciG)
b1510 (ydeK)	b1544 (o88)	b1877 (o169)	b1458 (o248)	b1030 (o83)	b1352 (ydaD)	b1527 (o371)	b1461 (ydcE)	b1001 (yccE)	b1167 (o82)	b1141 (f81)	b1331 (yi52_4)	b1142 (f103)	b1331 (yi52_4)
b1518 (o96)	b1549 (o141)	b1935 (f116)	b1459 (o66)	b1031 (o137)	b1354 (o58)	b1544 (o88)	b1472 (f96)	b1027 (f102)	b1196 (o146)	b1143 (o128)	b1347 (ydaC)	b1143 (o128)	b1346 (f79)
b1527 (o371)	b1550 (f58)	b1998 (o86)	b1461 (ydcE)	b1052 (f32)	b1355 (f59)	b1545 (o196)	b1487 (f516)	b1028 (o107)	b1240 (f76)	b1144 (f94)	b1370 (yi52_5)	b1144 (f94)	b1348 (lar)
b1544 (o88)	b1551 (f63)	b2001 (o512)	b1472 (f96)	b1058 (f46)	b1356 (f158)	b1549 (o141)	b1496 (yddA)	b1029 (o328)	b1256 (ycjD)	b1145 (f224)	b1375 (f88)	b1145 (f224)	b1349 (recT)
b1549 (o141)	b1552 (f70)	b2018 (hisL)	b1488 (f193)	b1061 (dinI)	b1357 (o98)	b1550 (f58)	b1500 (f65)	b1030 (o83)	b1259 (yciG)	b1150 (o60)	b1382 (o61)	b1146 (o167)	b1351 (racC)
b1550 (f58)	b1557 (cspB)	b2032 (yefI)	b1500 (f65)	b1137 (f221)	b1358 (o140)	b1551 (f63)	b1510 (ydeK)	b1031 (o137)	b1297 (f498)	b1152 (o263)	b1411 (o430)	b1147 (o189)	b1352 (ydaD)
b1551 (f63)	b1561 (rem)	b2034 (yefG)	b1506 (f59)	b1138 (f234)	b1364 (o93)	b1552 (f70)	b1518 (o96)	b1052 (f32)	b1331 (yi52_4)	b1154 (ycfK)	b1416 (gapC_2)	b1150 (o60)	b1354 (o58)
b1552 (f70)	b1567 (f49)	b2037 (rfbX)	b1509 (f466)	b1139 (lit)	b1367 (o77)	b1559 (f260)	b1544 (o88)	b1058 (f46)	b1346 (f79)	b1155 (o137)	b1419 (o57)	b1151 (o157)	b1355 (f59)
b1561 (rem)	b1587 (o808)	b2082 (ogrK)	b1510 (ydeK)	b1140 (f375)	b1370 (yi52_5)	b1561 (rem)	b1549 (o141)	b1061 (dinI)	b1347 (ydaC)	b1157 (f179)	b1426 (ydcH)	b1152 (o263)	b1356 (f158)
b1563 (relE)	b1629 (o740)	b2089 (tra5_4)	b1511 (f530)	b1141 (f81)	b1374 (f196)	b1563 (relE)	b1550 (f58)	b1137 (f221)	b1348 (lar)	b1158 (pin)	b1455 (o70)	b1153 (o194)	b1357 (o98)
b1567 (f49)	b1707 (f237)	b2117 (molR_3)	b1516 (o340)	b1142 (f103)	b1375 (f88)	b1564 (relB)	b1551 (f63)	b1138 (f234)	b1351 (racC)	b1159 (mcrA)	b1457 (ydcD)	b1154 (ycfK)	b1358 (o140)
b1570 (dicA)	b1788 (f50)	b2191 (o40)	b1518 (o96)	b1143 (o128)	b1382 (o61)	b1565 (o101)	b1552 (f70)	b1139 (lit)	b1352 (ydaD)	b1160 (f107)	b1458 (o248)	b1155 (o137)	b1364 (o93)
b1579 (o398)	b1796 (f60)	b2192 (yi52_8)	b1527 (o371)	b1144 (f94)	b1389 (o95)	b1566 (o110)	b1557 (cspB)	b1140 (f375)	b1354 (o58)	b1164 (o78)	b1459 (o66)	b1156 (ycfA)	b1367 (o77)
b1707 (f237)	b1811 (f59)	b2238 (yfaH)	b1544 (o88)	b1145 (f224)	b1391 (o167)	b1567 (f49)	b1559 (f260)	b1141 (f81)	b1355 (f59)	b1165 (o90)	b1500 (f65)	b1160 (f107)	b1370 (yi52_5)
b1803 (o321)	b1824 (f47)	b2273 (f238)	b1545 (o196)	b1146 (o167)	b1393 (o255)	b1570 (dicA)	b1561 (rem)	b1142 (f103)	b1357 (o98)	b1166 (o88)	b1544 (o88)	b1166 (o88)	b1374 (f196)
b1877 (o169)	b1877 (o169)	b2274 (o158)	b1549 (o141)	b1147 (o189)	b1396 (o140)	b1576 (ydfD)	b1563 (relE)	b1143 (o128)	b1358 (o140)	b1167 (o82)	b1549 (o141)	b1173 (o70)	b1375 (f88)
b1935 (f116)	b1935 (f116)	b2334 (f162)	b1550 (f58)	b1148 (o112)	b1407 (ydbD)	b1803 (o321)	b1565 (o101)	b1144 (f94)	b1364 (o93)	b1183 (umuD)	b1550 (f58)	b1174 (minE)	b1389 (o95)
b2018 (hisL)	b2000 (o1091)	b2442 (o431)	b1551 (f63)	b1150 (o60)	b1426 (ydcH)	b1877 (o169)	b1566 (o110)	b1145 (f224)	b1365 (o87)	b1237 (hns)	b1551 (f63)	b1196 (o146)	b1391 (o167)
b2032 (yefI)	b2001 (o512)	b2444 (o81)	b1552 (f70)	b1151 (o157)	b1437 (f65)	b1932 (o159)	b1567 (f49)	b1146 (o167)	b1370 (yi52_5)	b1276 (acnA)	b1552 (f70)	b1240 (f76)	b1393 (o255)
b2034 (yefG)	b2018 (hisL)	b2445 (o127)	b1553 (f165)	b1152 (o263)	b1450 (o240)	b1933 (f63)	b1568 (f96)	b1147 (o189)	b1375 (f88)	b1331 (yi52_4)	b1571 (ydfA)	b1256 (ycjD)	b1396 (o140)
b2035 (rfc)	b2032 (yefI)	b2448 (o130)	b1561 (rem)	b1153 (o194)	b1455 (o70)	b1935 (f116)	b1570 (dicA)	b1148 (o112)	b1382 (o61)	b1347 (ydaC)	b1575 (dicB)	b1257 (yciE)	b1407 (ydbD)
b2037 (rfbX)	b2034 (yefG)	b2449 (o130)	b1563 (relE)	b1154 (ycfK)	b1457 (ydcD)	b1965 (o69)	b1576 (ydfD)	b1150 (o60)	b1389 (o95)	b1348 (lar)	b1587 (o808)	b1259 (yciG)	b1420 (f55)
b2088 (o102)	b2037 (rfbX)	b2510 (f83)	b1565 (o101)	b1155 (o137)	b1458 (o248)	b2012 (yeeD)	b1629 (o740)	b1151 (o157)	b1396 (o140)	b1370 (yi52_5)	b1629 (o740)	b1297 (f498)	b1426 (ydcH)
b2191 (o40)	b2038 (rfbC)	b2541 (o270)	b1566 (o110)	b1156 (ycfA)	b1459 (o66)	b2032 (yefI)	b1707 (f237)	b1152 (o263)	b1407 (ydbD)	b1375 (f88)	b1639 (ydhA)	b1299 (ycjC)	b1437 (f65)
b2238 (yfaH)	b2117 (molR_3)	b2549 (f1124)	b1567 (f49)	b1157 (f179)	b1460 (ydcC)	b2034 (yefG)	b1788 (f50)	b1153 (o194)	b1419 (o57)	b1382 (o61)	b1707 (f237)	b1305 (pspB)	b1450 (o240)
b2273 (f238)	b2191 (o40)	b2624 (alpA)	b1568 (f96)	b1160 (f107)	b1461 (ydcE)	b2071 (o153)	b1803 (o321)	b1154 (ycfK)	b1420 (f55)	b1405 (ydbA_2)	b1788 (f50)	b1338 (f441)	b1455 (o70)
b2274 (o158)	b2238 (yfaH)	b2626 (o208)	b1570 (dicA)	b1166 (o88)	b1470 (f111)	b2083 (f48)	b1877 (o169)	b1155 (o137)	b1426 (ydcH)	b1407 (ydbD)	b1796 (f60)	b1339 (o302)	b1457 (ydcD)

VIII. Anhang

b2334 (f162)	b2273 (f238)	b2631 (o106)	b1571 (ydfA)	b1217 (chaB)	b1472 (f96)	b2191 (o40)	b1933 (f63)	b1157 (f179)	b1437 (f65)	b1419 (o57)	b1811 (f59)	b1346 (f79)	b1458 (o248)
b2394 (o372)	b2274 (o158)	b2636 (o230)	b1572 (ydfB)	b1229 (tpr)	b1484 (f328)	b2238 (yfaH)	b1935 (f116)	b1160 (f107)	b1455 (o70)	b1420 (f55)	b1824 (f47)	b1347 (ydaC)	b1459 (o66)
b2442 (o431)	b2334 (f162)	b2638 (f104)	b1573 (ydfC)	b1239 (ychG)	b1487 (f516)	b2334 (f162)	b1965 (o69)	b1166 (o88)	b1457 (ydcD)	b1426 (ydcH)	b1933 (f63)	b1348 (lar)	b1461 (ydcE)
b2444 (o81)	b2363 (o101)	b2640 (f66)	b1576 (ydfD)	b1265 (trpL)	b1488 (f193)	b2354 (f146)	b2018 (hisL)	b1174 (minE)	b1458 (o248)	b1455 (o70)	b1934 (f106)	b1351 (racC)	b1472 (f96)
b2445 (o127)	b2394 (o372)	b2641 (f38)	b1707 (f237)	b1289 (ycjD)	b1500 (f65)	b2363 (o101)	b2032 (yefI)	b1202 (f955)	b1459 (o66)	b1457 (ydcD)	b1935 (f116)	b1352 (ydaD)	b1487 (f516)
b2450 (o279)	b2442 (o431)	b2642 (o567)	b1803 (o321)	b1295 (f81)	b1506 (f59)	b2364 (dsdC)	b2034 (yefG)	b1229 (tpr)	b1460 (ydcC)	b1458 (o248)	b1965 (o69)	b1353 (sieB)	b1488 (f193)
b2485 (o216)	b2444 (o81)	b2646 (o109)	b1811 (f59)	b1296 (f479)	b1511 (f530)	b2442 (o431)	b2037 (rfbX)	b1239 (ychG)	b1461 (ydcE)	b1459 (o66)	b1974 (o186)	b1355 (f59)	b1500 (f65)
b2510 (f83)	b2445 (o127)	b2648 (f47)	b1877 (o169)	b1298 (o258)	b1513 (o511)	b2444 (o81)	b2038 (rfbC)	b1265 (trpL)	b1472 (f96)	b1470 (f111)	b1994 (yi52_6)	b1356 (f158)	b1510 (ydeK)
b2558 (pheL)	b2448 (o130)	b2649 (f263)	b1933 (f63)	b1305 (pspB)	b1515 (o330)	b2445 (o127)	b2071 (o153)	b1289 (ycjD)	b1488 (f193)	b1488 (f193)	b1995 (o139)	b1357 (o98)	b1511 (f530)
b2624 (alpA)	b2449 (o130)	b2650 (f160)	b1935 (f116)	b1331 (yi52_4)	b1518 (o96)	b2446 (o138)	b2083 (f48)	b1295 (f81)	b1500 (f65)	b1494 (yddC)	b1998 (o86)	b1358 (o140)	b1513 (o511)
b2626 (o208)	b2510 (f83)	b2651 (o43)	b2003 (o73)	b1338 (f441)	b1527 (o371)	b2448 (o130)	b2084 (f88)	b1296 (f479)	b1506 (f59)	b1499 (f253)	b2003 (o73)	b1364 (o93)	b1518 (o96)
b2631 (o106)	b2541 (o270)	b2653 (f57)	b2012 (yeeD)	b1339 (o302)	b1544 (o88)	b2485 (o216)	b2117 (molR_3)	b1298 (o258)	b1518 (o96)	b1500 (f65)	b2012 (yeeD)	b1365 (o87)	b1527 (o371)
b2636 (o230)	b2549 (f1124)	b2656 (o62)	b2018 (hisL)	b1347 (ydaC)	b1549 (o141)	b2488 (o181)	b2191 (o40)	b1305 (pspB)	b1544 (o88)	b1506 (f59)	b2018 (hisL)	b1366 (o119)	b1544 (o88)
b2638 (f104)	b2558 (pheL)	b2658 (o90)	b2032 (yefI)	b1348 (lar)	b1550 (f58)	b2558 (pheL)	b2192 (yi52_8)	b1331 (yi52_4)	b1545 (o196)	b1544 (o88)	b2032 (yefI)	b1367 (o77)	b1545 (o196)
b2640 (f66)	b2596 (o68)	b2754 (ygbF)	b2034 (yefG)	b1349 (recT)	b1551 (f63)	b2624 (alpA)	b2238 (yfaH)	b1338 (f441)	b1549 (o141)	b1549 (o141)	b2034 (yefG)	b1370 (yi52_5)	b1549 (o141)
b2641 (f38)	b2624 (alpA)	b2756 (f199)	b2035 (rfc)	b1351 (racC)	b1552 (f70)	b2626 (o208)	b2270 (f575)	b1339 (o302)	b1550 (f58)	b1550 (f58)	b2035 (rfc)	b1374 (f196)	b1550 (f58)
b2646 (o109)	b2626 (o208)	b2847 (o269)	b2037 (rfbX)	b1352 (ydaD)	b1557 (cspB)	b2629 (f87)	b2273 (f238)	b1347 (ydaC)	b1551 (f63)	b1551 (f63)	b2036 (yefE)	b1375 (f88)	b1551 (f63)
b2648 (f47)	b2631 (o106)	b2848 (o164)	b2039 (rfbA)	b1353 (sieB)	b1558 (cspF)	b2631 (o106)	b2274 (o158)	b1348 (lar)	b1552 (f70)	b1552 (f70)	b2037 (rfbX)	b1384 (f301)	b1552 (f70)
b2649 (f263)	b2636 (o230)	b2849 (f145)	b2071 (o153)	b1354 (o58)	b1559 (f260)	b2637 (o155)	b2334 (f162)	b1349 (recT)	b1557 (cspB)	b1557 (cspB)	b2038 (rfbC)	b1387 (f681)	b1557 (cspB)
b2650 (f160)	b2637 (o155)	b2852 (o458)	b2083 (f48)	b1355 (f59)	b1561 (rem)	b2638 (f104)	b2354 (f146)	b1351 (racC)	b1558 (cspF)	b1571 (ydfA)	b2039 (rfbA)	b1389 (o95)	b1558 (cspF)
b2651 (o43)	b2638 (f104)	b2854 (o138)	b2085 (f125)	b1356 (f158)	b1563 (relE)	b2640 (f66)	b2363 (o101)	b1352 (ydaD)	b1561 (rem)	b1572 (ydfB)	b2040 (rfbD)	b1390 (o248)	b1561 (rem)
b2653 (f57)	b2640 (f66)	b2855 (f148)	b2117 (molR_3)	b1357 (o98)	b1565 (o101)	b2641 (f38)	b2364 (dsdC)	b1353 (sieB)	b1563 (relE)	b1575 (dicB)	b2041 (rfbB)	b1392 (o356)	b1563 (relE)
b2656 (o62)	b2641 (f38)	b2856 (f51)	b2191 (o40)	b1358 (o140)	b1566 (o110)	b2646 (o109)	b2394 (o372)	b1354 (o58)	b1564 (relB)	b1576 (ydfD)	b2082 (ogrK)	b1393 (o255)	b1565 (o101)
b2658 (o90)	b2642 (o567)	b2857 (f143)	b2238 (yfaH)	b1365 (o87)	b1567 (f49)	b2648 (f47)	b2442 (o431)	b1355 (f59)	b1565 (o101)	b1587 (o808)	b2083 (f48)	b1399 (o316)	b1566 (o110)
b2754 (ygbF)	b2646 (o109)	b2858 (f73)	b2269 (o403)	b1366 (o119)	b1568 (f96)	b2649 (f263)	b2444 (o81)	b1356 (f158)	b1566 (o110)	b1629 (o740)	b2084 (f88)	b1400 (o196)	b1567 (f49)
b2756 (f199)	b2648 (f47)	b2859 (f141)	b2273 (f238)	b1367 (o77)	b1570 (dicA)	b2650 (f160)	b2445 (o127)	b1357 (o98)	b1567 (f49)	b1639 (ydhA)	b2085 (f125)	b1407 (ydbD)	b1568 (f96)
b2757 (f226)	b2649 (f263)	b2862 (f99)	b2274 (o158)	b1368 (o342)	b1571 (ydfA)	b2653 (f57)	b2446 (o138)	b1358 (o140)	b1570 (dicA)	b1707 (f237)	b2117 (molR_3)	b1426 (ydcH)	b1570 (dicA)
b2847 (o269)	b2650 (f160)	b2937 (speB)	b2275 (o283)	b1369 (o51)	b1572 (ydfB)	b2656 (o62)	b2448 (o130)	b1365 (o87)	b1571 (ydfA)	b1788 (f50)	b2147 (yeiI)	b1433 (f478)	b1571 (ydfA)
b2848 (o164)	b2651 (o43)	b3083 (ygiN)	b2332 (f278)	b1370 (yi52_5)	b1573 (ydfC)	b2658 (o90)	b2449 (o130)	b1366 (o119)	b1572 (ydfB)	b1796 (f60)	b2149 (mgIA)	b1437 (f65)	b1573 (ydfC)
b2849 (f145)	b2653 (f57)	b3142 (yraH)	b2334 (f162)	b1371 (o153)	b1575 (dicB)	b2754 (ygbF)	b2450 (o279)	b1367 (o77)	b1573 (ydfC)	b1811 (f59)	b2191 (o40)	b1455 (o70)	b1575 (dicB)
b2852 (o458)	b2656 (o62)	b3146 (yral)	b2345 (o352)	b1372 (o1122)	b1576 (ydfD)	b2755 (f305)	b2485 (o216)	b1368 (o342)	b1575 (dicB)	b1823 (cspC)	b2238 (yfaH)	b1456 (rhsE)	b1576 (ydfD)
b2854 (o138)	b2658 (o90)	b3215 (yhcA)	b2354 (f146)	b1374 (f196)	b1579 (o398)	b2756 (f199)	b2488 (o181)	b1369 (o51)	b1576 (ydfD)	b1824 (f47)	b2247 (f405)	b1458 (o248)	b1579 (o398)

VIII. Anhang

b2856 (f51)	b2754 (ygbF)	b3217 (yhcE)	b2363 (o101)	b1384 (f301)	b1587 (o808)	b2757 (f226)	b2489 (o252)	b1370 (yi52_5)	b1629 (o740)	b1836 (o83)	b2252 (ais)	b1459 (o66)	b1629 (o740)
b2857 (f143)	b2755 (f305)	b3219 (o238)	b2427 (f285)	b1389 (o95)	b1629 (o740)	b2761 (ygcB)	b2490 (o158)	b1371 (o153)	b1707 (f237)	b1927 (amyA)	b2273 (f238)	b1461 (ydcE)	b1707 (f237)
b2858 (f73)	b2756 (f199)	b3427 (ygzL)	b2442 (o431)	b1390 (o248)	b1639 (ydhA)	b2847 (o269)	b2510 (f83)	b1372 (o1122)	b1788 (f50)	b1932 (o159)	b2274 (o158)	b1470 (f111)	b1803 (o321)
b2859 (f141)	b2757 (f226)	b3483 (yhhH)	b2444 (o81)	b1395 (o475)	b1707 (f237)	b2848 (o164)	b2558 (pheL)	b1374 (f196)	b1796 (f60)	b1933 (f63)	b2275 (o283)	b1471 (f318)	b1811 (f59)
b2862 (f99)	b2849 (f145)	b3624 (rfaZ)	b2445 (o127)	b1397 (o401)	b1788 (f50)	b2849 (f145)	b2596 (o68)	b1384 (f301)	b1803 (o321)	b1934 (f106)	b2332 (f278)	b1472 (f96)	b1824 (f47)
b2982 (yi52_9)	b2852 (o458)	b3627 (rfal)	b2446 (o138)	b1426 (ydcH)	b1801 (o481)	b2852 (o458)	b2624 (alpA)	b1389 (o95)	b1811 (f59)	b1935 (f116)	b2334 (f162)	b1483 (f308)	b1877 (o169)
b3083 (ygiN)	b2854 (o138)	b3628 (rfaB)	b2448 (o130)	b1437 (f65)	b1803 (o321)	b2853 (o72)	b2626 (o208)	b1390 (o248)	b1824 (f47)	b1951 (rcsA)	b2354 (f146)	b1484 (f328)	b1932 (o159)
b3107 (yhal)	b2856 (f51)	b3633 (kdtA)	b2449 (o130)	b1457 (ydcD)	b1811 (f59)	b2854 (o138)	b2629 (f87)	b1395 (o475)	b1877 (o169)	b1965 (o69)	b2364 (dsdC)	b1485 (f298)	b1933 (f63)
b3142 (yraH)	b2857 (f143)	b3682 (glvB)	b2450 (o279)	b1459 (o66)	b1824 (f47)	b2855 (f148)	b2631 (o106)	b1396 (o140)	b1906 (yecH)	b1974 (o186)	b2387 (f108)	b1486 (f340)	b1935 (f116)
b3146 (yral)	b2858 (f73)	b3696 (yidX)	b2485 (o216)	b1471 (f318)	b1877 (o169)	b2856 (f51)	b2636 (o230)	b1397 (o401)	b1932 (o159)	b1995 (o139)	b2394 (o372)	b1488 (f193)	b1965 (o69)
b3215 (yhcA)	b2859 (f141)	b3707 (tnaL)	b2510 (f83)	b1472 (f96)	b1933 (f63)	b2857 (f143)	b2637 (o155)	b1398 (o437)	b1933 (f63)	b1998 (o86)	b2406 (xapB)	b1500 (f65)	b1966 (o134)
b3217 (yhcE)	b2862 (f99)	b3715 (o221)	b2541 (o270)	b1484 (f328)	b1935 (f116)	b2858 (f73)	b2638 (f104)	b1425 (f67)	b1935 (f116)	b2012 (yeeD)	b2408 (yfeN)	b1507 (hipA)	b2012 (yeeD)
b3219 (o238)	b2869 (f592)	b3717 (yieJ)	b2549 (f1124)	b1485 (f298)	b1965 (o69)	b2859 (f141)	b2640 (f66)	b1426 (ydcH)	b1952 (dsrB)	b2018 (hisL)	b2420 (o244)	b1508 (hipB)	b2018 (hisL)
b3427 (ygzL)	b2881 (o956)	b3776 (f91)	b2624 (alpA)	b1486 (f340)	b2001 (o512)	b2862 (f99)	b2641 (f38)	b1437 (f65)	b1953 (o80)	b2030 (yi52_7)	b2444 (o81)	b1509 (f466)	b2032 (yeff)
b3558 (yi5B)	b2890 (lysS)	b3777 (f86)	b2626 (o208)	b1488 (f193)	b2012 (yeeD)	b3047 (o252)	b2646 (o109)	b1438 (o145)	b1965 (o69)	b2032 (yeff)	b2445 (o127)	b1510 (ydeK)	b2034 (yefG)
b3622 (rfaL)	b2964 (nupG)	b3817 (yigF)	b2631 (o106)	b1500 (f65)	b2018 (hisL)	b3142 (yraH)	b2648 (f47)	b1457 (ydcD)	b1966 (o134)	b2034 (yefG)	b2446 (o138)	b1512 (f317)	b2035 (rfc)
b3624 (rfaZ)	b2982 (yi52_9)	b3818 (yigG)	b2636 (o230)	b1502 (f304)	b2032 (yeff)	b3146 (yral)	b2649 (f263)	b1459 (o66)	b1974 (o186)	b2035 (rfc)	b2447 (o197)	b1515 (o330)	b2037 (rfbX)
b3627 (rfal)	b3083 (ygiN)	b3875 (f230)	b2638 (f104)	b1506 (f59)	b2034 (yefG)	b3215 (yhcA)	b2650 (f160)	b1471 (f318)	b2012 (yeeD)	b2036 (yefE)	b2448 (o130)	b1516 (o340)	b2038 (rfbC)
b3628 (rfaB)	b3119 (tdcR)	b3876 (f487)	b2640 (f66)	b1510 (ydeK)	b2035 (rfc)	b3217 (yhcE)	b2651 (o43)	b1472 (f96)	b2018 (hisL)	b2037 (rfbX)	b2449 (o130)	b1518 (o96)	b2083 (f48)
b3682 (glvB)	b3142 (yraH)	b3890 (yiiF)	b2641 (f38)	b1511 (f530)	b2037 (rfbX)	b3219 (o238)	b2653 (f57)	b1484 (f328)	b2032 (yeff)	b2038 (rfbC)	b2450 (o279)	b1537 (ydeJ)	b2084 (f88)
b3696 (yidX)	b3146 (yral)	b3941 (metF)	b2642 (o567)	b1512 (f317)	b2039 (rfbA)	b3371 (yhfN)	b2655 (o164)	b1485 (f298)	b2034 (yefG)	b2039 (rfbA)	b2510 (f83)	b1544 (o88)	b2085 (f125)
b3707 (tnaL)	b3215 (yhcA)	b3994 (thiC)	b2646 (o109)	b1516 (o340)	b2040 (rfbD)	b3373 (yhfP)	b2656 (o62)	b1486 (f340)	b2037 (rfbX)	b2040 (rfbD)	b2528 (yfhF)	b1545 (o196)	b2117 (molR_3)
b3715 (o221)	b3217 (yhcE)	b4014 (aceB)	b2648 (f47)	b1517 (o291)	b2041 (rfbB)	b3427 (ygzL)	b2658 (o90)	b1488 (f193)	b2038 (rfbC)	b2041 (rfbB)	b2541 (o270)	b1548 (nohA)	b2191 (o40)
b3717 (yieJ)	b3219 (o238)	b4047 (yjbL)	b2649 (f263)	b1532 (marB)	b2082 (ogrK)	b3483 (yhhH)	b2754 (ygbF)	b1500 (f65)	b2039 (rfbA)	b2082 (ogrK)	b2549 (f1124)	b1549 (o141)	b2192 (yi52_8)
b3776 (f91)	b3299 (rpmJ)	b4048 (yjbM)	b2651 (o43)	b1541 (o67)	b2083 (f48)	b3558 (yi5B)	b2756 (f199)	b1506 (f59)	b2040 (rfbD)	b2083 (f48)	b2558 (pheL)	b1550 (f58)	b2238 (yfaH)
b3777 (f86)	b3427 (ygzL)	b4066 (yjcF)	b2653 (f57)	b1544 (o88)	b2084 (f88)	b3624 (rfaZ)	b2761 (ygcB)	b1510 (ydeK)	b2041 (rfbB)	b2084 (f88)	b2596 (o68)	b1551 (f63)	b2269 (o403)
b3817 (yigF)	b3443 (o138)	b4215 (o166)	b2656 (o62)	b1545 (o196)	b2117 (molR_3)	b3627 (rfal)	b2847 (o269)	b1511 (f530)	b2071 (o153)	b2085 (f125)	b2623 (f318)	b1552 (f70)	b2273 (f238)
b3818 (yigG)	b3483 (yhhH)	b4348 (hsdS)	b2658 (o90)	b1549 (o141)	b2191 (o40)	b3628 (rfaB)	b2848 (o164)	b1516 (o340)	b2082 (ogrK)	b2117 (molR_3)	b2624 (alpA)	b1553 (f165)	b2274 (o158)
b3890 (yiiF)	b3551 (bisC)		b2754 (ygbF)	b1550 (f58)	b2192 (yi52_8)	b3629 (rfaS)	b2849 (f145)	b1517 (o291)	b2083 (f48)	b2147 (yehA)	b2625 (o469)	b1555 (f103)	b2275 (o283)
b3900 (frvA)	b3558 (yi5B)		b2756 (f199)	b1551 (f63)	b2238 (yfaH)	b3681 (glvG)	b2850 (o148)	b1532 (marB)	b2084 (f88)	b2191 (o40)	b2626 (o208)	b1557 (cspB)	b2332 (f278)
b4047 (yjbL)	b3624 (rfaZ)		b2757 (f226)	b1552 (f70)	b2269 (o403)	b3682 (glvB)	b2852 (o458)	b1541 (o67)	b2085 (f125)	b2192 (yi52_8)	b2627 (f729)	b1558 (cspF)	b2334 (f162)
b4048 (yjbM)	b3627 (rfal)		b2847 (o269)	b1553 (f165)	b2273 (f238)	b3696 (yidX)	b2853 (o72)	b1544 (o88)	b2191 (o40)	b2238 (yfaH)	b2629 (f87)	b1559 (f260)	b2354 (f146)

VIII. Anhang

b4066 (yjcF)	b3628 (rfaB)		b2849 (f145)	b1554 (f177)	b2274 (o158)	b3707 (tnaL)	b2854 (o138)	b1545 (o196)	b2238 (yfaH)	b2252 (ais)	b2631 (o106)	b1561 (rem)	b2363 (o101)
b4215 (o166)	b3633 (kdtA)		b2852 (o458)	b1555 (f103)	b2275 (o283)	b3776 (f91)	b2855 (f148)	b1548 (nohA)	b2274 (o158)	b2269 (o403)	b2632 (o289)	b1563 (relE)	b2394 (o372)
b4250 (o54)	b3691 (yidT)		b2854 (o138)	b1558 (cspF)	b2332 (f278)	b3777 (f86)	b2856 (f51)	b1549 (o141)	b2332 (f278)	b2273 (f238)	b2635 (o130)	b1564 (relB)	b2427 (f285)
b4282 (yjhE)	b3696 (yidX)		b2856 (f51)	b1559 (f260)	b2334 (f162)	b3817 (yigF)	b2857 (f143)	b1550 (f58)	b2334 (f162)	b2274 (o158)	b2636 (o230)	b1565 (o101)	b2442 (o431)
b4341 (o54)	b3707 (tnaL)		b2857 (f143)	b1560 (f362)	b2354 (f146)	b3818 (yigG)	b2858 (f73)	b1551 (f63)	b2354 (f146)	b2275 (o283)	b2637 (o155)	b1566 (o110)	b2444 (o81)
b4348 (hsdS)	b3715 (o221)		b2858 (f73)	b1561 (rem)	b2363 (o101)	b3900 (frvA)	b2859 (f141)	b1552 (f70)	b2363 (o101)	b2332 (f278)	b2638 (f104)	b1567 (f49)	b2445 (o127)
	b3717 (yieJ)		b2859 (f141)	b1563 (relE)	b2394 (o372)	b3941 (metF)	b2862 (f99)	b1553 (f165)	b2394 (o372)	b2334 (f162)	b2640 (f66)	b1568 (f96)	b2446 (o138)
	b3776 (f91)		b2862 (f99)	b1564 (relB)	b2427 (f285)	b4047 (yjbL)	b2890 (lysS)	b1554 (f177)	b2444 (o81)	b2350 (o120)	b2641 (f38)	b1570 (dicA)	b2448 (o130)
	b3777 (f86)		b2890 (lysS)	b1565 (o101)	b2442 (o431)	b4048 (yjbM)	b3007 (f51)	b1555 (f103)	b2445 (o127)	b2354 (f146)	b2642 (o567)	b1573 (ydfC)	b2449 (o130)
	b3782 (rhol)		b2964 (nupG)	b1566 (o110)	b2444 (o81)	b4066 (yjcF)	b3047 (o252)	b1558 (cspF)	b2448 (o130)	b2363 (o101)	b2646 (o109)	b1575 (dicB)	b2450 (o279)
	b3786 (rffE)		b3046 (o821)	b1567 (f49)	b2445 (o127)	b4157 (yjeN)	b3120 (yhaB)	b1559 (f260)	b2449 (o130)	b2364 (dsdC)	b2651 (o43)	b1677 (lpp)	b2485 (o216)
	b3817 (yigF)		b3083 (ygjN)	b1568 (f96)	b2446 (o138)	b4215 (o166)	b3142 (yraH)	b1560 (f362)	b2558 (pheL)	b2387 (f108)	b2658 (o90)	b1715 (pheM)	b2488 (o181)
	b3818 (yigG)		b3120 (yhaB)	b1571 (ydfA)	b2447 (o197)	b4225 (chpB)	b3146 (yral)	b1561 (rem)	b2596 (o68)	b2394 (o372)	b2754 (ygbF)	b1717 (rpmI)	b2489 (o252)
	b3890 (yiiF)		b3142 (yraH)	b1572 (ydfB)	b2448 (o130)	b4341 (o54)	b3215 (yhcA)	b1563 (relE)	b2623 (f318)	b2406 (xapB)	b2755 (f305)	b1730 (f271)	b2510 (f83)
	b3941 (metF)		b3146 (yral)	b1573 (ydfC)	b2449 (o130)	b4345 (mcrC)	b3217 (yhcE)	b1564 (relB)	b2624 (alpA)	b2408 (yfeN)	b2756 (f199)	b1803 (o321)	b2541 (o270)
	b3994 (thiC)		b3215 (yhcA)	b1575 (dicB)	b2450 (o279)	b4348 (hsdS)	b3219 (o238)	b1565 (o101)	b2626 (o208)	b2420 (o244)	b2757 (f226)	b1824 (f47)	b2549 (f1124)
	b4014 (aceB)		b3217 (yhcE)	b1576 (ydfD)	b2485 (o216)	b4350 (hsdR)	b3375 (yhfR)	b1566 (o110)	b2629 (f87)	b2444 (o81)	b2758 (f363)	b1831 (yebJ)	b2558 (pheL)
	b4047 (yjbL)		b3219 (o238)	b1577 (ydfE)	b2488 (o181)		b3427 (yzgL)	b1567 (f49)	b2631 (o106)	b2445 (o127)	b2849 (f145)	b1877 (o169)	b2596 (o68)
	b4048 (yjbM)		b3427 (yzgL)	b1579 (o398)	b2489 (o252)		b3483 (yhhH)	b1568 (f96)	b2635 (o130)	b2446 (o138)	b2853 (o72)	b1932 (o159)	b2623 (f318)
	b4066 (yjcF)		b3443 (o138)	b1653 (lhr)	b2490 (o158)		b3490 (yhiL)	b1571 (ydfA)	b2636 (o230)	b2447 (o197)	b2854 (o138)	b1933 (f63)	b2624 (alpA)
	b4128 (yjdK)		b3483 (yhhH)	b1659 (ydhB)	b2510 (f83)		b3558 (yi5B)	b1572 (ydfB)	b2638 (f104)	b2448 (o130)	b2856 (f51)	b1934 (f106)	b2626 (o208)
	b4152 (frdC)		b3488 (yhiJ)	b1715 (pheM)	b2549 (f1124)		b3622 (rfaL)	b1573 (ydfC)	b2640 (f66)	b2449 (o130)	b2857 (f143)	b1935 (f116)	b2629 (f87)
	b4215 (o166)		b3489 (yhiK)	b1730 (f271)	b2596 (o68)		b3624 (rfaZ)	b1576 (ydfD)	b2641 (f38)	b2450 (o279)	b2858 (f73)	b1965 (o69)	b2631 (o106)
	b4247 (yigG)		b3490 (yhiL)	b1762 (f387)	b2624 (alpA)		b3627 (rfaL)	b1577 (ydfE)	b2644 (o160)	b2461 (f159)	b2859 (f141)	b1966 (o134)	b2632 (o289)
	b4250 (o54)		b3535 (f62)	b1831 (yebJ)	b2626 (o208)		b3628 (rfaB)	b1579 (o398)	b2646 (o109)	b2501 (ppk)	b2862 (f99)	b2012 (yeeD)	b2636 (o230)
	b4271 (intB)		b3558 (yi5B)	b1877 (o169)	b2629 (f87)		b3629 (rfaS)	b1653 (lhr)	b2648 (f47)	b2510 (f83)	b2881 (o956)	b2031 (yefJ)	b2637 (o155)
	b4281 (yjhD)		b3622 (rfaL)	b1893 (insB_5)	b2631 (o106)		b3682 (glvB)	b1659 (ydhB)	b2649 (f263)	b2524 (yfhJ)	b2890 (lysS)	b2037 (rfbX)	b2638 (f104)
	b4282 (yjhE)		b3624 (rfaZ)	b1894 (insA_5)	b2636 (o230)		b3696 (yidX)	b1715 (pheM)	b2650 (f160)	b2549 (f1124)	b2937 (speB)	b2071 (o153)	b2640 (f66)
	b4293 (fecI)		b3627 (rfaL)	b1930 (yedF)	b2637 (o155)		b3707 (tnaL)	b1730 (f271)	b2653 (f57)	b2558 (pheL)	b2938 (speA)	b2082 (ogrK)	b2641 (f38)
	b4299 (yjhI)		b3628 (rfaB)	b1932 (o159)	b2638 (f104)		b3715 (o221)	b1762 (f387)	b2655 (o164)	b2596 (o68)	b2939 (yqgB)	b2083 (f48)	b2642 (o567)
	b4304 (yjhN)		b3629 (rfaS)	b1933 (f63)	b2640 (f66)		b3776 (f91)	b1831 (yebJ)	b2656 (o62)	b2617 (smpA)	b2964 (nupG)	b2191 (o40)	b2646 (o109)
	b4305 (yjhO)		b3682 (glvB)	b1934 (f106)	b2641 (f38)		b3777 (f86)	b1877 (o169)	b2658 (o90)	b2623 (f318)	b3007 (f51)	b2238 (yfaH)	b2648 (f47)

VIII. Anhang

	b4344 (mcrD)		b3696 (yidX)	b1935 (f116)	b2642 (o567)		b3800 (aslB)	b1893 (insB_5)	b2754 (ygbF)	b2624 (alpA)	b3027 (f110)	b2333 (f179)	b2649 (f263)
	b4345 (mcrC)		b3707 (tnaL)	b1965 (o69)	b2646 (o109)		b3817 (yigF)	b1930 (yedF)	b2756 (f199)	b2625 (o469)	b3083 (ygiN)	b2334 (f162)	b2650 (f160)
			b3715 (o221)	b1966 (o134)	b2648 (f47)		b3818 (yigG)	b1932 (o159)	b2757 (f226)	b2626 (o208)	b3104 (yhal)	b2335 (f170)	b2651 (o43)
			b3717 (yieJ)	b1974 (o186)	b2649 (f263)		b3890 (yiiF)	b1933 (f63)	b2761 (ygcB)	b2627 (f729)	b3119 (tdcR)	b2336 (f250)	b2653 (f57)
			b3776 (f91)	b1994 (yi52_6)	b2650 (f160)		b3900 (frvA)	b1934 (f106)	b2782 (chpA)	b2628 (f538)	b3215 (yhcA)	b2339 (f187)	b2655 (o164)
			b3777 (f86)	b2001 (o512)	b2651 (o43)		b3941 (metF)	b1935 (f116)	b2783 (chpR)	b2629 (f87)	b3217 (yhcE)	b2351 (o306)	b2656 (o62)
			b3782 (rhoL)	b2018 (hisL)	b2653 (f57)		b3994 (thiC)	b1951 (rcsA)	b2847 (o269)	b2631 (o106)	b3218 (yi52_10)	b2352 (o443)	b2658 (o90)
			b3817 (yigF)	b2030 (yi52_7)	b2655 (o164)		b4047 (yjbL)	b1952 (dsrB)	b2848 (o164)	b2632 (o289)	b3219 (o238)	b2354 (f146)	b2754 (ygbF)
			b3818 (yigG)	b2034 (yefG)	b2656 (o62)		b4048 (yjbM)	b1953 (o80)	b2849 (f145)	b2633 (o273)	b3254 (f33)	b2355 (f172)	b2755 (f305)
			b3890 (yiiF)	b2036 (yefE)	b2658 (o90)		b4066 (yjcF)	b1955 (o271)	b2850 (o148)	b2635 (o130)	b3284 (smg)	b2363 (o101)	b2756 (f199)
			b3897 (frvR)	b2037 (rfbX)	b2754 (ygbF)		b4157 (yjeN)	b1965 (o69)	b2852 (o458)	b2636 (o230)	b3299 (rpmJ)	b2364 (dsdC)	b2757 (f226)
			b3900 (frvA)	b2041 (rfbB)	b2756 (f199)		b4215 (o166)	b1966 (o134)	b2853 (o72)	b2637 (o155)	b3362 (yhfG)	b2445 (o127)	b2847 (o269)
			b3941 (metF)	b2082 (ogrK)	b2757 (f226)		b4341 (o54)	b1974 (o186)	b2854 (o138)	b2638 (f104)	b3442 (yhhZ)	b2448 (o130)	b2848 (o164)
			b3994 (thiC)	b2084 (f88)	b2847 (o269)		b4345 (mcrC)	b1994 (yi52_6)	b2855 (f148)	b2640 (f66)	b3443 (o138)	b2481 (yffE)	b2849 (f145)
			b4047 (yjbL)	b2191 (o40)	b2848 (o164)		b4348 (hsdS)	b2018 (hisL)	b2856 (f51)	b2641 (f38)	b3446 (yrhB)	b2483 (o322)	b2850 (o148)
			b4048 (yjbM)	b2192 (yi52_8)	b2849 (f145)			b2030 (yi52_7)	b2857 (f143)	b2642 (o567)	b3483 (yhhH)	b2485 (o216)	b2852 (o458)
			b4066 (yjcF)	b2273 (f238)	b2850 (o148)			b2034 (yefG)	b2858 (f73)	b2644 (o160)	b3489 (yhiK)	b2488 (o181)	b2853 (o72)
			b4127 (yjdJ)	b2274 (o158)	b2852 (o458)			b2036 (yefE)	b2859 (f141)	b2645 (o105)	b3505 (yi52_11)	b2490 (o158)	b2854 (o138)
			b4128 (yjdK)	b2333 (f179)	b2853 (o72)			b2037 (rfbX)	b2862 (f99)	b2646 (o109)	b3535 (f62)	b2492 (o282)	b2855 (f148)
			b4157 (yjeN)	b2334 (f162)	b2854 (o138)			b2040 (rfbD)	b2881 (o956)	b2651 (o43)	b3551 (bisC)	b2537 (f327)	b2856 (f51)
			b4215 (o166)	b2335 (f170)	b2855 (f148)			b2041 (rfbB)	b2937 (speB)	b2658 (o90)	b3558 (yi5B)	b2539 (digoxigenin)	b2857 (f143)
			b4246 (pyrL)	b2349 (yfdB)	b2856 (f51)			b2082 (ogrK)	b2939 (yqgB)	b2754 (ygbF)	b3596 (yibG)	b2540 (o106)	b2858 (f73)
			b4250 (o54)	b2350 (o120)	b2857 (f143)			b2084 (f88)	b3007 (f51)	b2755 (f305)	b3622 (rfaL)	b2558 (pheL)	b2859 (f141)
			b4271 (intB)	b2351 (o306)	b2858 (f73)			b2191 (o40)	b3027 (f110)	b2756 (f199)	b3624 (rfaZ)	b2596 (o68)	b2862 (f99)
			b4274 (yigW)	b2352 (o443)	b2859 (f141)			b2192 (yi52_8)	b3047 (o252)	b2757 (f226)	b3627 (rfal)	b2623 (f318)	b2939 (yqgB)
			b4281 (yjhD)	b2353 (o114)	b2862 (f99)			b2273 (f238)	b3083 (ygiN)	b2758 (f363)	b3628 (rfaB)	b2624 (alpA)	b3007 (f51)
			b4282 (yjhE)	b2354 (f146)	b2881 (o956)			b2274 (o158)	b3104 (yhal)	b2775 (o425)	b3629 (rfaS)	b2626 (o208)	b3027 (f110)
			b4304 (yjhN)	b2355 (f172)	b2937 (speB)			b2305 (f296)	b3119 (tdcR)	b2849 (f145)	b3633 (kdtA)	b2629 (f87)	b3037 (ygiB)
			b4341 (o54)	b2356 (f102)	b3007 (f51)			b2333 (f179)	b3120 (yhaB)	b2853 (o72)	b3636 (rpmG)	b2630 (o357)	b3046 (o821)
			b4344 (mcrD)	b2357 (f164)	b3027 (f110)			b2334 (f162)	b3142 (yraH)	b2854 (o138)	b3696 (yidX)	b2631 (o106)	b3047 (o252)
			b4345 (mcrC)	b2358 (f122)	b3083 (ygiN)			b2335 (f170)	b3146 (yral)	b2856 (f51)	b3707 (tnaL)	b2634 (o233)	b3083 (ygiN)
			b4346 (mcrB)	b2359 (o148)	b3119 (tdcR)			b2336 (f250)	b3153 (yhbO)	b2857 (f143)	b3715 (o221)	b2635 (o130)	b3107 (yhal)

VIII. Anhang

			b4348 (hsdS)	b2360 (o274)	b3120 (yhaB)			b2349 (yfdB)	b3215 (yhcA)	b2858 (f73)	b3731 (atpC)	b2639 (f172)	b3119 (tdcR)
				b2361 (o187)	b3142 (yrah)			b2350 (o120)	b3217 (yhcE)	b2859 (f141)	b3736 (atpF)	b2640 (f66)	b3120 (yhaB)
				b2362 (o120)	b3146 (yral)			b2351 (o306)	b3219 (o238)	b2862 (f99)	b3766 (ilvL)	b2641 (f38)	b3142 (yrah)
				b2363 (o101)	b3215 (yhcA)			b2352 (o443)	b3220 (yhcG)	b2869 (f592)	b3782 (rhol)	b2643 (o152)	b3146 (yral)
				b2394 (o372)	b3217 (yhcE)			b2353 (o114)	b3362 (yhfG)	b2881 (o956)	b3786 (rffE)	b2646 (o109)	b3215 (yhcA)
				b2420 (o244)	b3219 (o238)			b2354 (f146)	b3427 (ygzL)	b2890 (lysS)	b3800 (aslB)	b2647 (f1569)	b3217 (yhcE)
				b2427 (f285)	b3427 (ygzL)			b2355 (f172)	b3443 (o138)	b2937 (speB)	b3817 (yigF)	b2648 (f47)	b3219 (o238)
				b2442 (o431)	b3443 (o138)			b2356 (f102)	b3483 (yhhh)	b2938 (speA)	b3818 (yigG)	b2649 (f263)	b3220 (yhcG)
				b2443 (o213)	b3483 (yhhh)			b2357 (f164)	b3489 (yhiK)	b2939 (yqgB)	b3836 (hypothetical)	b2650 (f160)	b3254 (f33)
				b2444 (o81)	b3488 (yhiJ)			b2358 (f122)	b3490 (yhiL)	b2941 (yqgD)	b3941 (metF)	b2653 (f57)	b3371 (yhfN)
				b2445 (o127)	b3490 (yhiL)			b2359 (o148)	b3535 (f62)	b2964 (nupG)	b3994 (thiC)	b2654 (o110)	b3375 (yhfR)
				b2446 (o138)	b3505 (yi52_11)			b2360 (o274)	b3558 (yi5B)	b2982 (yi52_9)	b4014 (aceB)	b2656 (o62)	b3427 (ygzL)
				b2448 (o130)	b3558 (yi5B)			b2361 (o187)	b3587 (yiaW)	b3007 (f51)	b4047 (yjbL)	b2657 (o210)	b3443 (o138)
				b2449 (o130)	b3596 (yibG)			b2362 (o120)	b3596 (yibG)	b3027 (f110)	b4066 (yjcF)	b2658 (o90)	b3459 (yhhK)
				b2485 (o216)	b3622 (rfaL)			b2363 (o101)	b3622 (rfaL)	b3083 (ygjN)	b4102 (phnF)	b2698 (oraA)	b3483 (yhhh)
				b2486 (o526)	b3624 (rfaZ)			b2394 (o372)	b3624 (rfaZ)	b3104 (yhal)	b4128 (yjdK)	b2702 (srlA_1)	b3488 (yhiJ)
				b2510 (f83)	b3627(rfal)			b2420 (o244)	b3627(rfal)	b3107 (yhal)	b4157 (yjeN)	b2733 (mutS)	b3489 (yhiK)
				b2537 (f327)	b3628 (rfaB)			b2427 (f285)	b3628 (rfaB)	b3119 (tdcR)	b4158 (yjeO)	b2756 (f199)	b3490 (yhiL)
				b2596 (o68)	b3629 (rfaS)			b2442 (o431)	b3629 (rfaS)	b3215 (yhcA)	b4204 (yjfZ)	b2761 (ygcB)	b3535 (f62)
				b2598 (pheL)	b3633 (kdtA)			b2443 (o213)	b3633 (kdtA)	b3216 (yhcD)	b4215 (o166)	b2786 (barA)	b3558 (yi5B)
				b2617 (smpA)	b3682 (glvB)			b2444 (o81)	b3636 (rpmG)	b3217 (yhcE)	b4217 (ytfK)	b2846 (o230)	b3622 (rfaL)
				b2622 (intA)	b3696 (yidX)			b2445 (o127)	b3649 (rpoZ)	b3218 (yi52_10)	b4246 (pyrL)	b2847 (o269)	b3624 (rfaZ)
				b2624 (alpA)	b3707 (tnaL)			b2446 (o138)	b3696 (yidX)	b3219 (o238)	b4247 (yigG)	b2848 (o164)	b3627(rfal)
				b2626 (o208)	b3715 (o221)			b2448 (o130)	b3707 (tnaL)	b3254 (f33)	b4299 (yjhI)	b2849 (f145)	b3628 (rfaB)
				b2628 (f538)	b3717 (yieJ)			b2449 (o130)	b3715 (o221)	b3284 (smg)	b4302 (yjhL)	b2850 (o148)	b3629 (rfaS)
				b2629 (f87)	b3776 (f91)			b2485 (o216)	b3717 (yieJ)	b3299 (rpmJ)	b4305 (yjhO)	b2851 (o163)	b3659 (yicK)
				b2630 (o357)	b3777 (f86)			b2486 (o526)	b3776 (f91)	b3302 (rpmD)	b4307 (yjhQ)	b2852 (o458)	b3682 (glvB)
				b2631 (o106)	b3800 (aslB)			b2510 (f83)	b3777 (f86)	b3362 (yhfG)	b4308 (yjhR)	b2853 (o72)	b3684 (yidP)
				b2633 (o273)	b3817 (yigF)			b2537 (f327)	b3782 (rhol)	b3417 (malP)	b4344 (mcrD)	b2854 (o138)	b3696 (yidX)
				b2635 (o130)	b3818 (yigG)			b2541 (o270)	b3800 (aslB)	b3442 (yhhZ)	b4345 (mcrC)	b2855 (f148)	b3707 (tnaL)
				b2636 (o230)	b3875 (f230)			b2596 (o68)	b3817 (yigF)	b3443 (o138)	b4346 (mcrB)	b2856 (f51)	b3715 (o221)
				b2638 (f104)	b3876 (f487)			b2598 (pheL)	b3818 (yigG)	b3446 (yrhB)	b4348 (hsdS)	b2857 (f143)	b3717 (yieJ)

VIII. Anhang

				b2640 (f66)	b3884 (yihW)			b2616 (recN)	b3876 (f487)	b3483 (yhhH)	b4350 (hsdR)	b2858 (f73)	b3766 (ilvL)
				b2641 (f38)	b3890 (yiiF)			b2617 (smpA)	b3941 (metF)	b3489 (yhiK)	b4360 (yjjA)	b2859 (f141)	b3776 (f91)
				b2646 (o109)	b3897 (frvR)			b2622 (intA)	b4014 (aceB)	b3512 (yhiE)		b2862 (f99)	b3777 (f86)
				b2648 (f47)	b3900 (frvA)			b2624 (alpA)	b4047 (yjbL)	b3535 (f62)		b2863 (f278)	b3782 (rhoI)
				b2649 (f263)	b3941 (metF)			b2626 (o208)	b4048 (yjbM)	b3557 (yi5A)		b2918 (ygfD)	b3817 (yigF)
				b2650 (f160)	b4014 (aceB)			b2627 (f729)	b4066 (yjcF)	b3558 (yi5B)		b2932 (f118)	b3818 (yigG)
				b2651 (o43)	b4047 (yjbL)			b2628 (f538)	b4103 (f73)	b3596 (yibG)		b2939 (yqgB)	b3890 (yiiF)
				b2653 (f57)	b4048 (yjbM)			b2629 (f87)	b4128 (yjdK)	b3618 (f290)		b2973 (f848)	b3897 (frvR)
				b2847 (o269)	b4066 (yjcF)			b2631 (o106)	b4157 (yjeN)	b3622 (rfaL)		b3007 (f51)	b3900 (frvA)
				b2857 (f143)	b4157 (yjeN)			b2635 (o130)	b4158 (yjeO)	b3623 (rfaK)		b3021 (f131)	b3941 (metF)
				b2942 (metK)	b4204 (yjfZ)			b2636 (o230)	b4204 (yjfZ)	b3624 (rfaZ)		b3022 (f98)	b3994 (thiC)
				b2982 (yi52_9)	b4215 (o166)			b2638 (f104)	b4215 (o166)	b3627 (rfal)		b3043 (ygiL)	b4047 (yjbL)
				b3007 (f51)	b4247 (yigG)			b2640 (f66)	b4224 (chpS)	b3628 (rfaB)		b3047 (o252)	b4048 (yjbM)
				b3121 (yhaC)	b4248 (yigH)			b2641 (f38)	b4247 (yigG)	b3629 (rfaS)		b3083 (ygiN)	b4066 (yjcF)
				b3142 (yraH)	b4250 (o54)			b2646 (o109)	b4248 (yigH)	b3633 (kdtA)		b3104 (yhaI)	b4128 (yjdK)
				b3143(yral)	b4251 (o84)			b2648 (f47)	b4250 (o54)	b3636 (rpmG)		b3120 (yhaB)	b4157 (yjeN)
				b3145 (yraK)	b4257 (hypothetical)			b2649 (f263)	b4251 (o84)	b3649 (rpoZ)		b3142 (yraH)	b4215 (o166)
				b3217 (yhcE)	b4281 (yjhD)			b2650 (f160)	b4257 (hypothetical)	b3672 (ilvBN)		b3144 (yraJ)	b4246 (pyrL)
				b3218 (yi52_10)	b4282 (yjhE)			b2651 (o43)	b4271 (intB)	b3696 (yidX)		b3146 (yral)	b4341 (o54)
				b3219 (o238)	b4299 (yjhI)			b2653 (f57)	b4274 (yigW)	b3703 (rpmH)		b3164 (pnp)	b4344 (mcrD)
				b3322 (pinO)	b4301 (yjhK)			b2759 (f160)	b4281 (yjhD)	b3707 (tnaL)		b3215 (yhcA)	b4345 (mcrC)
				b3444 (insA_6)	b4305 (yjhO)			b2782 (chpA)	b4282 (yjhE)	b3715 (o221)		b3217 (yhcE)	b4348 (hsdS)
				b3445 (insB_6)	b4307 (yjhQ)			b2783 (chpR)	b4345 (mcrC)	b3731 (atpC)		b3219 (o238)	
				b3483 (yhhH)	b4344 (mcrD)			b2847 (o269)	b4346 (mcrB)	b3766 (ilvL)		b3227 (yhcL)	
				b3489 (yhiK)	b4345 (mcrC)			b2857 (f143)	b4348 (hsdS)	b3776 (f91)		b3309 (rplX)	
				b3490 (yhiL)	b4348 (hsdS)			b2942 (metK)	b4349 (hsdM)	b3777 (f86)		b3312 (rpmC)	
				b3501 (arsR)	b4356 (hypothetical)			b2982 (yi52_9)	b4350 (hsdR)	b3782 (rhoI)		b3362 (yhfG)	
				b3502 (arsB)				b3007 (f51)		b3786 (rfiE)		b3371 (yhfN)	
				b3505 (yi52_11)				b3121 (yhaC)		b3800 (aslB)		b3372 (yhfO)	
				b3506 (slp)				b3142 (yraH)		b3817 (yigF)		b3373 (yhfP)	
				b3556 (cspA)				b3143 (yral)		b3818 (yigG)		b3375 (yhfR)	
				b3558 (yi5B)				b3145 (yraK)		b3923 (yiiT)		b3427 (ygzL)	

VIII. Anhang

			b3584 (yiaT)			b3153 (yhbO)		b3928 (yiiU)		b3443 (o138)	
			b3593 (rhsA)			b3216 (yhcD)		b3941 (metF)		b3482 (rhsB)	
			b3594 (yibA)			b3217 (yhcE)		b3975 (f51)		b3483 (yhhH)	
			b3595 (yibJ)			b3218 (yi52_10)		b3994 (thiC)		b3489 (yhiK)	
			b3618 (f290)			b3219 (o238)		b4014 (aceB)		b3490 (yhiL)	
			b3622 (rfaL)			b3220 (yhcG)		b4038 (yjbI)		b3501 (arsR)	
			b3623 (rfaK)			b3322 (pinO)		b4047 (yjbL)		b3505 (yi52_11)	
			b3624 (rfaZ)			b3350 (kefB)		b4048 (yjbM)		b3556 (cspA)	
			b3626 (rfaJ)			b3371 (yhfN)		b4066 (yjcF)		b3557 (yi5A)	
			b3627 (rfaI)			b3375 (yhfR)		b4102 (phnF)		b3558 (yi5B)	
			b3628 (rfaB)			b3410 (yhgG)		b4127 (yjdJ)		b3577 (yiaM)	
			b3629 (rfaS)			b3482 (rhsB)		b4128 (yjdK)		b3578 (yiaN)	
			b3630 (rfaP)			b3483 (yhhH)		b4152 (frdC)		b3586 (yiaV)	
			b3631 (rfaG)			b3488 (yhiJ)		b4157 (yjeN)		b3593 (rhsA)	
			b3632 (rfaQ)			b3489 (yhiK)		b4158 (yjeO)		b3594 (yibA)	
			b3681 (glvG)			b3490 (yhiL)		b4181 (yjfI)		b3595 (yibJ)	
			b3682 (glvB)			b3501 (arsR)		b4204 (yjfZ)		b3622 (rfaL)	
			b3684 (yidP)			b3502 (arsB)		b4215 (o166)		b3623 (rfaK)	
			b3707 (tnaL)			b3505 (yi52_11)		b4246 (pyrL)		b3624 (rfaZ)	
			b3717 (yieJ)			b3556 (cspA)		b4247 (yigG)		b3625 (rfaY)	
			b3766 (ilvL)			b3558 (yi5B)		b4297 (yjhG)		b3626 (rfaJ)	
			b3776 (f91)			b3584 (yiaT)		b4299 (yjhI)		b3627(rfaI)	
			b3777 (f86)			b3593 (rhsA)		b4301 (yjhK)		b3628 (rfaB)	
			b3848 (yigZ)			b3594 (yibA)		b4302 (yjhL)		b3629 (rfaS)	
			b3879 (yihR)			b3595 (yibJ)		b4304 (yjhN)		b3630 (rfaP)	
			b3880 (yihS)			b3618 (f290)		b4305 (yjhO)		b3631 (rfaG)	
			b3884 (yihW)			b3622 (rfaL)		b4307 (yjhQ)		b3632 (rfaQ)	
			b3900 (frvA)			b3623 (rfaK)		b4308 (yjhR)		b3636 (rpmG)	
			b3913 (hypothetical)			b3624 (rfaZ)		b4344 (mcrD)		b3637 (rpmB)	
			b4017 (arp)			b3626 (rfaJ)		b4345 (mcrC)		b3650 (spoT)	
			b4158 (yjeO)			b3627 (rfaI)		b4346 (mcrB)		b3681 (glvG)	
			b4204 (yjfZ)			b3628 (rfaB)		b4348 (hsdS)		b3682 (glvB)	

VIII. Anhang

				b4224 (chpS)				b3629 (rfaS)		b4349 (hsdM)		b3684 (yidP)	
				b4225 (chpB)				b3630 (rfaP)		b4350 (hsdR)		b3696 (yidX)	
				b4250 (o54)				b3631 (rfaG)		b4360 (yjiA)		b3707 (tnaL)	
				b4253 (yjgL)				b3632 (rfaQ)		b4402 (yjiY)		b3776 (f91)	
				b4279 (yjhB)				b3681 (glvG)				b3777 (f86)	
				b4280 (yjhC)				b3682 (glvB)				b3817 (yigF)	
				b4281 (yjhD)				b3684 (yidP)				b3818 (yigG)	
				b4284 (tra8_3)				b3707 (tnaL)				b3872 (o236)	
				b4287 (fecE)				b3766 (ilvL)				b3897 (frvR)	
				b4288 (fecD)				b3776 (f91)				b3899 (frvB)	
				b4289 (fecC)				b3777 (f86)				b3900 (frvA)	
				b4290 (fecB)				b3875 (f230)				b3989 (htrC)	
				b4292 (fecR)				b3879 (yihR)				b4017 (arp)	
				b4293 (fecI)				b3880 (yihS)				b4031 (xylE)	
				b4294 (insA_7)				b3883 (yihV)				b4047 (yjbL)	
				b4299 (yjhI)				b3884 (yihW)				b4048 (yjbM)	
				b4300 (yjhJ)				b3890 (yiiF)				b4066 (yjcF)	
				b4301 (yjhK)				b3897 (frvR)				b4157 (yjeN)	
				b4302 (yjhL)				b3900 (frvA)				b4172 (hfq)	
				b4303 (yjhM)				b3913 (hypothetical)				b4215 (o166)	
				b4325 (yjiC)				b4017 (arp)				b4224 (chpS)	
				b4337 (yjiO)				b4031 (xylE)				b4225 (chpB)	
				b4340 (yjiR)				b4047 (yjbL)				b4341 (o54)	
				b4344 (mcrD)				b4048 (yjbM)				b4351 (mrr)	
				b4345 (mcrC)				b4158 (yjeO)				b4356 (hypothetical)	
				b4346 (mcrB)				b4160 (psd)				b4402 (yjiY)	
				b4348 (hsdS)				b4204 (yjfZ)					
				b4350 (hsdR)				b4224 (chpS)					
				b4356 (hypothetical)				b4225 (chpB)					
								b4250 (o54)					
								b4253 (yjgL)					

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Jörg Hacker für die Durchführung der Doktorarbeit in seinem Institut und für die Bereitstellung der Mittel bedanken.

Für die geduldige und ausführliche Erklärung jedweder Frage (was ist ein *E. coli*?), die Unterstützung und Hilfe in Labor- und Auswertungsfragen, sprachlichen Krücken, das Verbessern der ewig gleichen Fehlern und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Dr. Ulrich Dobrindt.

Liebe Barbara Plaschke, mein ganz besonderer Dank gilt Dir, ohne Dich wäre diese Arbeit gar nicht zustande gekommen.

Meinem Freund Oliver Hauf danke ich für das ewig offene Ohr, die Motivationshilfe, die Computerunterstützung und die Recherchen, wie schreibe ich ... korrekt.

Last, but not least ... Danke an meine Familie und Freunde. Das Jammern hat jetzt ein Ende.

LEBENS LAUF

Name: Maura-Maria Fuchs
Anschrift: *nicht veröffentlicht*

Geburtsdatum: 18.02.1978
Geburtsort: Ellwangen
Nationalität: Deutsch



WEITERBILDUNG

SEIT JUNI 2005 Diakoniekrankenhaus Schwäbisch Hall, Assistenzärztin in der Weiterbildung im Fachbereich der Inneren Medizin

STUDIENABSCHLUSS

28.04.2005 Approbation

PRAKTISCHES JAHR

04/04-03/05 Praktisches Jahr an der Universität Heidelberg mit den Tertialen

- Gynäkologie u. Geburtshilfe, Diakoniekrankenhaus Schwäbisch Hall, Deutschland
- Chirurgie, Spitalzentrum Oberwallis Standort Visp, Schweiz
- Innere Medizin, Diakoniekrankenhaus Schwäbisch Hall, Deutschland

STUDIUM

2002-2004 Zweiter klinischer Abschnitt, Universität Würzburg - 2. Staatsexamen

09/2001-02/2002 Experimenteller Teil der Dissertation mit dem Titel „Phäno- und genotypische Charakterisierung extraintestinal pathogener E. coli Stämme“ im Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg

2000-2001 Erster klinischer Abschnitt, Universität Würzburg - 1. Staatsexamen

1998-2000 Grundstudium, Universität Würzburg - Physikum

SOZIALES

1997-1998 Freiwilliges Soziales Jahr Malteser Hilfsdienst, Ellwangen

- Ambulante Alten- und Krankenpflege
- Familienpflege
- Fahrdienste
- Betreuung behinderter Kinder im Regelkindergarten

SCHULBILDUNG

1988-1997 Peutinger Gymnasium, Ellwangen - Allgemeine Hochschulreife

1984-1988 Grundschule Rindelbach

M.-M. Fuchs
Maura-Maria Fuchs