

Beschreibung und Charakterisierung einer neuen Pathogenitätsinsel,  
integriert in das *se/C*-Gen von "Locus of enterocyte effacement"-  
negativen, Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Ulrike Hemmrich  
aus Heilbronn-Sontheim

Würzburg 2002

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>1a. Abstract</b> .....	3
<b>2. Einleitung</b> .....	5
<b>2.1. Bakterielle Infektionskrankheiten</b> .....	5
<b>2.2. Neuere Erkenntnisse zur Pathogenität gramnegativer Bakterien</b>	6
<b>2.3. Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i></b> .....	9
<b>2.4. Shiga Toxine</b> .....	11
<b>2.5. Weitere Virulenzfaktoren der STEC</b> .....	13
2.5.1. Aufbau des Plasmids pO157.....	13
2.5.2. Die Pathogenitätsinsel LEE.....	15
<b>2.6. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit</b> .....	17
<b>3. Material und Methoden</b> .....	18
<b>3.1. Material</b> .....	18
3.1.1. Geräte.....	18
3.1.2. Reagenzien.....	19
3.1.3. Sonstige Materialien.....	19
3.1.4. Bakterienstämme.....	20
3.1.5. Plasmide.....	21
3.1.6. Oligonukleotide.....	22
3.1.7. Bioreagenzien.....	22
3.1.8. Medien.....	23
3.1.9. Puffer und allgemeine Lösungen.....	24
<b>3.2. Methoden</b> .....	25
3.2.1. Erstellen einer Genbank aus dem Chromosom von <i>E. coli</i> Stamm 4797/97.....	25
3.2.2. Plasmidpräparation.....	28
3.2.3. Restriktion von DNA.....	29
3.2.4. Horizontale Gelelektrophorese.....	28
3.2.5. Präparation von DNA aus Agarosegelen.....	29
3.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	32

3.2.7. DNA-Sequenzierung.....	33
3.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.2.9. DNA-DNA-Hybridisierung/ Cosmid-Screening.....	40
3.2.10.Präparation von Kulturüberständen.....	42
3.2.11.Präparation von äußeren Membranen.....	43
3.2.12.SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	43
3.2.13.Immunoblot.....	45
3.2.14.N-terminale Aminosäuresequenzierung.....	46
3.2.15.Protease-Aktivitätstests.....	47
3.2.15.1. IgA-Protease-Test.....	47
3.2.15.2. Zymogram Gele.....	47
3.2.15.3. Spaltung von Plasmaproteinen und anderen Proteinsubstraten.....	48
3.2.15.4. Inhibition der Protease-Aktivität.....	49
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. Charakterisierung von eae-negativen STEC-Stämmen.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2. Analyse der Randbereiche von se/C in STEC-Stämmen.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3. Klonierung von Restriktionsfragmenten.....</b>	<b>51</b>
<b>4.4. Bestimmung der vollständigen DNA-Sequenz einer neuen             Pathogenitätsinsel.....</b>	<b>52</b>
<b>4.5. Nachweis von LPA in klinischen STEC-Isolaten.....</b>	<b>60</b>
<b>4.6. Charakterisierung einer exrtazellulären Serinprotease.....</b>	<b>65</b>
4.6.1. Nachweis des sezernierten Proteins.....	65
4.6.2. Nachweis der Abspaltung eines Translokators.....	66
4.6.3. Aminosäuresequenzierung.....	67
4.6.4. Die Proteaseaktivität.....	68
4.6.5. Nachweis von EspI im Wildtyp-Stamm 4797/97.....	72
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. Genomflexibilität bei <i>E. coli</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2. Die Heterogenität Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5.3. Der „Locus of Protease activity and adhesion“ .....</b>	<b>76</b>
<b>5.4. Das EspI-Protein.....</b>	<b>78</b>
<b>5.4. Ausblick.....</b>	<b>81</b>

<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>93</b>
Abkürzungen.....	93
Verwendete Symbole für Aminosäuren.....	94
Liste der Veröffentlichungen.....	96
Lebenslauf.....	97
Danksagung.....	98

## 1. Zusammenfassung

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) verursachen Diarrhöen und hämorrhagische Colitis. Als lebensbedrohliche Komplikation können sie ein hämolytisch-urämisches Syndrom auslösen. Bisher identifizierte Virulenzfaktoren der STEC sind auf Bakteriophagen, Plasmiden und Pathogenitätsinseln kodiert. Bei der Mehrzahl der klinischen STEC-Isolate konnte die Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyte effacement) nachgewiesen werden. Der LEE ist stromabwärts des Gens für eine Selenocystein-tRNA (*se/C*) ins Chromosom integriert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von STEC, denen der LEE fehlt und die funktionelle Analyse von potentiellen Virulenz-assoziierten Genen. Dabei wurde eine Fokussierung auf Gene vorgenommen, die im Bereich der *se/C*-Region vorkommen.

Mittels PCR wurde zunächst überprüft, ob bei den LEE-negativen STEC-Stämmen Fremd-DNA in der *se/C*-Region integriert ist. Hierzu wurden 35 LEE-negative STEC getestet. Bei 13 Stämmen konnte eine Insertion von Fremd-DNA gezeigt werden. Von einem dieser Stämme (*E. coli* 4797/97, Serovar O91:H-) wurde aus einer Genbank ein die *se/C*-Region enthaltendes DNA-Fragment identifiziert. Ein 37,7 kb großes Fragment dieses Cosmids wurde vollständig sequenziert. Die Analyse der gesamten Sequenz ergab 30 offene Leserahmen mit Längen zwischen 95 und 4092 bp. Der G+C-Gehalt betrug 47,4%. An mehreren Stellen wurden Bereiche mit hoher Homologie zu verschiedenen Insertionssequenzen, *inverted repeats* und Integrasen gefunden. Drei Leserahmen hatten eine hohe Homologie zu bereits bekannten Genen. Hierbei handelt es sich um die *iha-*, *btuB-* und *espP*-Gene von *E. coli*. Das *iha*-Gen kodiert für ein Adhärenz-vermittelndes Protein, *btuB* für den Vitamin B12 Rezeptor und *espP* für eine Serinprotease. Bei den *iha*-Adhäsinen und Serinproteasen handelt es sich um potentielle Pathogenitätsfaktoren. Der sequenzierte Bereich hat somit die charakteristischen Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel: Die Präsenz von mehreren Pathogenitätsgenen und mobilen Elementen (Insertionselemente, Integrasen), die Lokalisation nahe an tRNA-Genen sowie ein veränderter G+C-Gehalt gegenüber dem Restgenom.

Zur weiteren Charakterisierung des *espP*-Genprodukts wurde *espP* subkloniert. Bei der Untersuchung von Kulturüberständen zeigte sich, dass der Subklon DH5/pzh4 ein Protein von etwa 110 kDa sezernierte. In weiteren Experimenten konnte gezeigt

werden, dass die Serinprotease des Stammes 4797/97 als 140,8 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert und während des anschließenden Exportvorganges sowohl N-terminal als auch C-terminal prozessiert wird. Das C-terminale Ende wirkt als Translokator durch die äußere Membran, wo es nach Abspaltung des reifen EspI-Proteins verbleibt. Das reife Protein weist eine Größe von 110,5 kDa auf. Der hier gezeigte Transportmechanismus ist charakteristisch für sogenannte Autotransporter-Proteine. Trotz der hohen Sequenzhomologie zur IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*, die als Prototyp der Autotransporter-Proteine gilt, konnte für EspI keine Proteaseaktivität gegenüber IgA gezeigt werden. EspI weist auch hohe Sequenzhomologie zu Exoproteinen von *Shigella flexneri* (SepA, Mucinase und SigA), EHEC (EspP) und vogelpathogenen *E. coli* (Tsh) auf, allerdings konnte keines der Substrate dieser Proteasen von EspI gespalten werden. Dagegen konnte eine proteolytische Aktivität gegenüber Schweine-Pepsin A und Apolipoprotein A1 nachgewiesen werden.

Die putative Virulenz und räumliche Nähe der Gene *espI*, *btuB* und *iha* macht diese Region zum interessantesten Stück der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten neuen Pathogenitätsinsel. Eine PCR-Untersuchung zur Verbreitung dieser Gene zeigte, dass diese Region bei LEE-negativen STEC weit verbreitet ist. Inwieweit diese Pathogenitätsinsel einen Einfluss auf die Virulenz von STEC hat, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

## 1a. Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) cause diarrhea and hemorrhagic colitis. As life-threatening disease they can trigger a hemolytic-uremic syndrome. Virulence factors of STEC identified so far are encoded on bacteriophages, plasmids and pathogenicity islands. The majority of clinical STEC-isolates could be proven to harbour the pathogenicity island LEE (locus of enterocyte effacement). LEE is integrated in the chromosome downstream of the gene encoding a selenocystein-tRNA (*se/C*).

Target of this work was the characterisation of STEC lacking LEE and the functional analysis of potential virulence-associated genes. The focus was put on genes found in the *se/C*-region.

Using PCR analysis it was checked whether LEE-negative STEC-strains have integrated foreign DNA. Of 35 LEE-negative STEC 13 strains could be shown to have an insertion of foreign DNA. From one of these strains (*E.coli* 4797/97, serogroup O91:H-) a DNA-fragment was detected from a cosmid library that harboured the *se/C* region. The sequence of a 37,7 kb long fragment of this cosmid was fully analysed. 30 open reading frames (ORF) between 95 and 4092 bp length were identified. The G+C-content was 47,4 %. In different parts the sequence shows a high homology to diverse insertion sequences, inverted repeats and integrase genes. Three ORF had high homology to already known genes, which are the *iha*-*btuB*- and *espP*-genes of *E.coli*. The *iha*-gene is encoding an adherence-conferring protein, *btuB* the receptor for vitamin B12 and *espP* a serine protease. Iha-adhesines and serine proteases are potential pathogenicity factors. Thus the sequenced area shows the characteristic attributes of a pathogenicity island: The presence of different pathogenicity genes and mobile elements (insertion elements, integrases), the localisation next to a tRNA-gene and a G+C-content different from that of the whole genome.

We termed the *espP*-homologue *espI* for "extracellular serine protease encoded on an island". For further characterisation of its product, *espI* was subcloned. In the analysis of culture supernatants its size was about 110 kDa. In following experiments it could be proven that the serine protease of the strain 4797/97 is synthesised as a 140,8 kDa protein and cleaved on the N- and C-terminal part while its export through the cell membrane. The c-terminal part functions as a locator through the outer

membrane, where it remains after the cleavage of the mature EspI-protein. The size of this mature protein is 110,5 kDa. The transport mechanism found here is characteristic for so called autotransporter-proteins.

Despite the high sequence-homology to the IgA1-protease of *Neisseria gonorrhoeae*, which is taken as prototype of autotransporter proteins, a proteolytic activity of EspI towards IgA could not be shown. There are also high sequence-homologies to exoproteins of *Shigella flexneri* (SepA, mucinase and SigA), EHEC (EspP) and avian pathogenic *E. coli* (Tsh). Nevertheless none of the substrates of these proteases could be cleaved by EspI. In contrast a proteolytic activity against swine pepsin A1 and apolipoprotein A1 could be shown.

The putative virulence and the close location of the genes *espl*, *btuB* and *iha* make this region the most interesting part of the new pathogenicity island identified in this work. A PCR-analysis about the spreading of these genes showed, that this region is widespread amongst LEE-negative STEC. The influence of this pathogenicity island on the virulence of STEC has to be clarified in further experiments.

## 2. Einleitung

### 2.1. Bakterielle Infektionskrankheiten

Als Begründer der modernen infektionsbiologischen Forschung darf Robert Koch (1843-1910) gelten. Mit seinen Arbeiten zur Biologie des Milzbranderreger *Bacillus anthracis* (1876), zur Ursache der Tuberkulose (1882) und zur Verbreitung der Cholera (1884) schuf er die Voraussetzungen zur breiten Wahrnehmung übertragbarer Krankheiten als mikrobiologisches Problem und Folge von bakteriellen Infektionen. Sehr früh erkannt wurden so die obligat pathogenen Mikroorganismen, zu denen die Erreger des Typhus (*Salmonella typhi*), der Diphtherie (*Corynebacterium diphtheriae*) oder der Pest (*Yersinia pestis*) gehören.

Heute wird dagegen die Mehrzahl der bakteriellen Infektionen in den Industrienationen durch fakultativ pathogene Organismen ausgelöst. Das bedeutet, dass an sich harmlose, apathogene Mikroorganismen unter bestimmten Voraussetzungen, beispielsweise bei abwehrschwachen Wirten, Krankheiten auslösen können. So kann ein *Escherichia coli* Keim der normalen Darmflora oder ein Umweltkeim wie *Pseudomonas aeruginosa* fieberhafte Erkrankungen auslösen. In diesen Fällen ist es wichtig, nicht nur die Spezies der potentiellen Krankheitserreger festzustellen, sondern auch ihre biologischen Eigenschaften zu bestimmen.

Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten werden durch eine breite Palette von Erregerspezies verursacht, die in den Tierbeständen der landwirtschaftlichen Produktion vorkommen können. In der Regel fallen die Tiere klinisch nicht auf und die Erreger gelangen so als sehr geringe, kaum zu entdeckende Kontamination in die Lebensmittelkette und damit zum Verbraucher. Durch bestimmte hygienische Fehler in der Lebensmittelherstellung oder beim Verbraucher können sich derartige, nur in geringen Spuren vorkommende Erreger zu klinisch relevanten Konzentrationen vermehren. Von besonderer epidemiologischer Bedeutung bleiben hier nach wie vor die Salmonellen, Campylobacter und STEC.

## 2.2. Neuere Erkenntnisse zur Pathogenität gramnegativer Bakterien

Seit im Jahre 1990 von Hacker und Mitarbeitern bei uropathogenen *E.coli*-Stämmen (UPEC) die ersten Pathogenitätsinseln (PAI) gefunden wurden [Hacker *et al.*, 1990], wurden durch fortschreitende Sequenzierung für viele andere gramnegative pathogene Bakterien solche genetischen Strukturen beschrieben. So folgten den PAI I – IV bei UPEC, die beispielsweise das Gen für  $\alpha$ -Hämolyisin tragen, bald der LEE (Locus of enterocyte effacement) bei enteropathogenen *E.coli*-Stämmen (EPEC), der unter 2.5.2. näher beschrieben wird. Auch die HPI (*high pathogenicity island*) bei *Yersinia enterocolitica* und *Y. pestis* konnte die Gruppe um Carniel 1996 und 1998 nachweisen [Carniel *et al.*, 1996; Buchrieser *et al.*, 1998]. Diese HPI konnte auch bei STEC der Serogruppe O26 [Karch *et al.*, 1999] und anderen *Enterobacteriaceae* [Hacker & Kaper, 1999] gefunden werden. Ebenso wurde die cagPAI (cag = cytotoxin associated gene) bei *Helicobacter pylori* [Censini *et al.*, 1996] und bei *Shigella flexneri* die *she* Pathogenitätsinsel beschrieben [Rajakumar *et al.*, 1997].

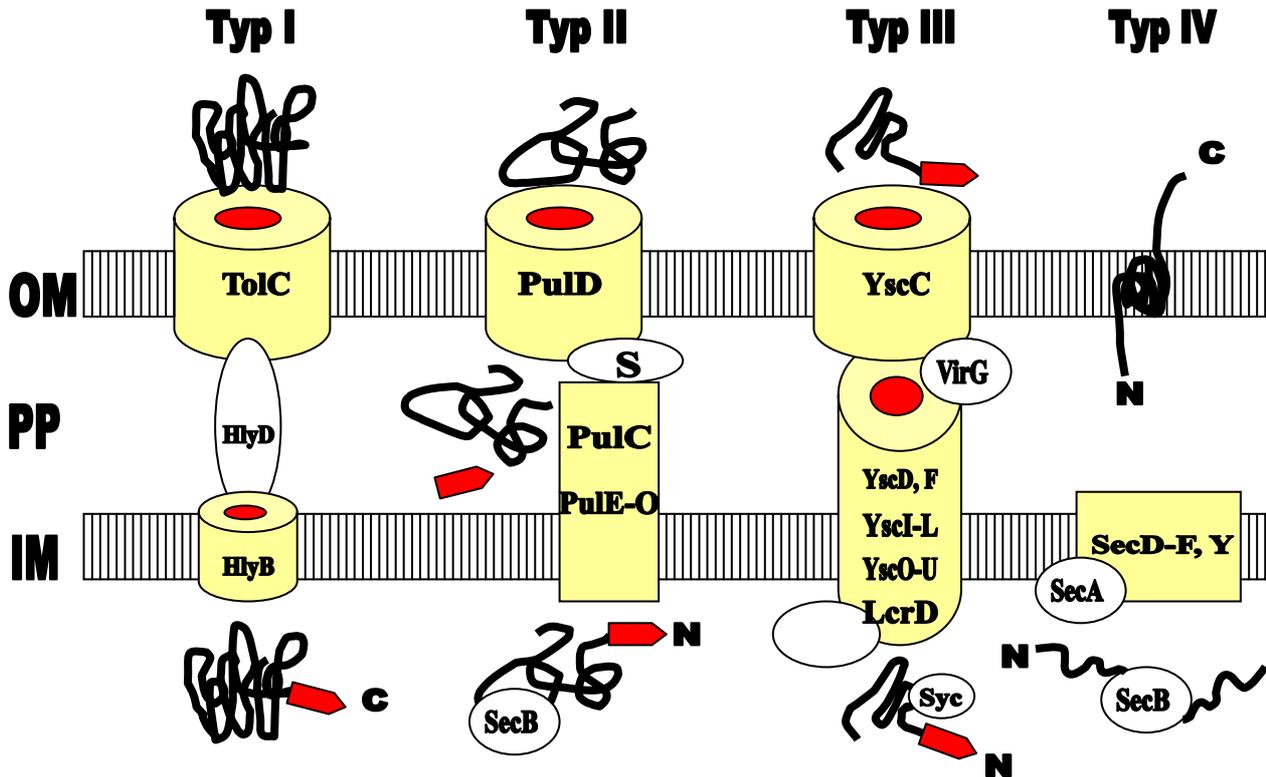
Tatsächlich sind inzwischen auch PAI für grampositive Keime beschrieben, so zum Beispiel die SaPI1-Insel bei *Staphylococcus aureus*, die das *toxic shock toxin* kodierende *tst* Gen enthält [Lindsay *et al.*, 1998]. Hier gelten jedoch auch die 1997 von Hacker und Mitarbeitern postulierten Kriterien zur Klassifizierung einer Pathogenitätsinsel. Danach handelt es sich bei einer PAI um ein distinktes genetisches Element von etwa 20 – 200 kb Länge, das für einen oder mehrere Pathogenitätsfaktoren, wie Adhesine, Invasine, Eisenaufnahmesysteme, Toxine oder Proteinsekretionssysteme kodiert und nur bei pathogenen, nicht bei apathogenen Bakterien vorkommt. Oft wird der Bereich flankiert von *direct repeats* und zeigt einen anderen G+C-Gehalt und eine andere Kodierung zwischen Basen und Aminosäuren (*codon usage*). Meist sind die Pathogenitätsinseln mit tRNA Genen assoziiert, ähnlich wie Phagen. Da auch oft kryptische Phagen-Integrase-Gene gefunden werden, geht man davon aus, dass Pathogenitätsinseln, oder zumindest Teile davon, Phagensequenzen darstellen. Ebenfalls häufig nachgewiesen werden Insertionselemente (IS) und Transposasen, die aus Plasmiden stammen. Daher wurde die Hypothese entwickelt, dass Pathogenitätsinseln aus ehemaligen Plasmiden und Bakteriophagen zusammengesetzte Elemente sind, die nach ihrer Integration ins Bakteriengenom Punktmutationen und Umlagerungen erfahren haben,

die sie zu relativ stabilen Inkorporationen machen. Dies erklärt auch die typische Mosaik-ähnliche Struktur der Pathogenitätsinseln [Hacker & Kaper, 1999].

Erst kürzlich konnte eine Tellurit-Resistenz und Adhärenz vermittelnde Insel (TAI) von Tarr und Mitarbeitern beschrieben werden [Tarr *et al.*, 2000]. Hier zeigt sich bei einem O157:H7 ein exprimiertes Protein Iha (IrgA homologes Adhesin), das die Eigenschaft, Adhärenz an Zellen zu zeigen, auf einen Laborstamm übertragen kann. Iha könnte also in *eae*-negativen Stämmen als Adhärenz- und Kolonisationsfaktor anstelle von Intimin genutzt werden. Außerdem finden sich vier Leserahmen, die hohe Homologien zeigen zu Genen aus *Serratia marcescens*, die Tellurit Resistenz vermitteln. Sie wurden daher als *t1pA-D* bezeichnet. Bei TAI handelt es sich um ein mobiles genetisches Element mit konservierter Struktur und Präsenz in vielen *E.coli* Stämmen, die entfernt mit O157:H7 verwandt sind. Die Erlangung dieser Insel muss also ein relativ neues Ereignis in der Evolution von O157:H7 und seiner Differenzierung zu O157:H-, die Tellurit sensitiv sind, sein.

Da auch bei nicht pathogenen Organismen ähnliche strukturelle Elemente vorkommen, spricht man hier von Genominseln, die für metabolische Leistungen, Sekretionssysteme, Symbiosefaktoren oder Resistenzen kodieren können. Solche Inseln können zur allgemeinen Fitneß der Bakterien beitragen und ihnen unabhängig von pathogenen Prozessen einen Selektionsvorteil in der Evolution verschaffen.

Oft auf Pathogenitätsinseln kodiert sind Proteinsekretionssysteme, die sowohl zur Pathogenität beitragen können, indem sie Proteine ausschleusen, die Pathogenitätsfaktoren sind oder, wie die Typ IV-Sekretionssysteme, selbst als Pathogenitätsfaktoren fungieren. Allerdings sind diese Sekretionssysteme nicht nur mit pathogenen Bakterien assoziiert, sondern sie repräsentieren vielmehr generelle bakterielle Transportsysteme. Bei gramnegativen Bakterien sind vier Typen von Sekretionssystemen bekannt, die in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt werden.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Sekretionssysteme Typ I-IV von links nach rechts. Dargestellt ist die innere Membran (IM), das Periplasma (PP) und die äußere Membran (OM). Als Beispiel gewählt wurden hier das  $\alpha$ -Hämolyysin von *E.coli* (TypI), die Pullulanase von *Klebsiella oxytoca* (TypII), das Yop von *Yersinia* (TypIII) und die IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*.

Ein typischer Vertreter eines Typ I-Sekretionssystems ist das  $\alpha$ -Hämolyysin aus *Escherichia coli*. Hier wirken drei Proteine am Transport zusammen, die alle gemeinsam mit dem Toxinstrukturgen auf einer PAI kodiert sind. Nach Anlagerung von HlyC an die innere Membran erfolgt die Restriktion der Transportsignalsequenz am C-Terminus von HlyA durch HlyC, wodurch HlyA aktiviert wird. Durch eine Pore, die Hly B und HlyD bilden, wird das HlyA-Toxin aus dem Cytoplasma ausgeschleust. HlyA wird dann durch das ebenfalls beteiligte Protein TolC, das eine Pore in der äußeren Membran bildet, aus der Zelle geschleust. Auch viele weitere Toxine und Proteasen werden durch solche Proteinsekretionssysteme vom TypI ausgeschleust. Bei den TypII-Sekretionssystemen handelt es sich um eine Proteinkaskade von 12-14 teils membranständigen Proteinen. Außerdem werden bei Diesem System Komponenten des Sec-abhängigen „general secretory pathway“ verwendet [Russel *et al.*, 1998]. Das bestuntersuchte System dieser Art ist das Pullulanasesystem von *Klebsiella oxytoca*, an dem 14 Proteine beteiligt sind. So trennt zunächst eine Signalpeptidase das N-terminale Signalpeptid vom zu transportierenden Protein, dann sind mehrere Proteine der inneren Membran, eine cytoplasmatisch lokalisierte

ATPase und ein Chaperon am Transport durch die innere Membran beteiligt. Vom Periplasma kann das Protein durch einen Kanal aus PulD in der äußeren Membran ganz aus der Zelle geschleust werden. Diese Art von Transportsystemen wird beispielsweise auch beim Transport von Untereinheits-Proteinen der TypIV-Pili von EPEC oder *Pseudomonas aeruginosa* genutzt.

Sekretionssysteme vom TypIII wurden zunächst bei *Yersinia* beschrieben, gehören inzwischen aber zu den interessantesten Systemen und wurden schon bei *Shigellen*, *Salmonella typhimurium*, EPEC und STEC und auch bei pflanzenpathogenen Bakterien wie *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* und *Xanthomonas campestris* nachgewiesen. In diesen Sekretionssystemen wirken etwa 20 Proteine zusammen, die teilweise in der äußeren Membran liegen. Dort bilden sie einen Kanal aus, der dann von anderen Proteinen durchs Periplasma verlängert wird. Diese Proteine haben wiederum Verbindung zu Proteinen, die schließlich einen Kanal durch die innere Membran bilden. Alle diese Proteine sind bei *Yersinia* nach dem transportierten Yop-Protein mit Ysc (Yop secretion protein) bezeichnet, in *E.coli* mit Sep (secretion of *E.coli* proteins) und in anderen Bakterien entsprechend.

TypIV Sekretionssysteme sind Sec-abhängige Autotransportersysteme, wie die IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*. Dieses Protein integriert sich nach Transport durch die innere Membran in die äußere Membran. Nach weiteren autoproteolytischen Prozessierungen kann es schließlich in die Bakteriumumgebung ausgeschleust werden. Viele Proteasen werden auf diese Weise aus der Zelle transportiert, daneben zum Beispiel aber auch das VagA-Toxin von *Helicobacter pylori*.

### **2.3. Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli***

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) sind seit etwa 20 Jahren als eine neue Gruppe von Durchfallerregern bekannt. 1982 kam es in Kanada und den USA zu mehreren Ausbrüchen schwerer, blutiger Durchfallerkrankungen. Die dort isolierten *E. coli* des Serotyps O157:H7 stellten eine neue Wirkgruppe darmpathogener *E. coli* dar und erhielten den Namen „enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)“ [Riley *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1983]. Von diesen Erregern produzierte

Cytotoxine konnten identifiziert werden, die in Struktur und Wirkungsweise dem Shiga Toxin aus *Shigella dysenteriae* Typ 1 sehr ähneln [O'Brien *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1983]. Aus diesem Grund werden sie als Shiga Toxine (Stx) bezeichnet (siehe 2.4.). Alle *E. coli* die Stx produzieren bekamen daher unabhängig von ihrer Pathogenität den Namen STEC. Seit ihrer Entdeckung wurden in vielen Ländern Infektionen mit STEC festgestellt [Huppertz *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 1987; Griffin *et al.*, 1988; Beutin *et al.*, 1994; Karch *et al.*, 1995; 1996; Tarr, 1995]. Diese äußern sich teilweise nicht nur in schweren, oft blutigen Durchfällen (hämorrhagische Kolitis) sondern bei 5-10 % der Fälle auch im lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) [Karmali *et al.*, 1985; Boyce *et al.*, 1995; Bockemühl *et al.*, 1997].

Stämme der Serogruppe O157 werden weltweit immer noch am häufigsten isoliert [Griffin *et al.*, 1991, Verweyen *et al.*, 1999, Decludt *et al.*, 2000], allerdings werden vermehrt, vor allem in Europa, Shiga Toxin-produzierende *E. coli* anderer Serogruppen gefunden. Hierzu zählen vor allem Stämme der Serogruppen O26, O111 und O103, welche ebenfalls als Verursacher blutiger Diarrhöe und des HUS auftreten, [Bitzan *et al.*, 1991; Bockemühl *et al.*, 1992; Mariani-Kurkdjian *et al.*, 1993; Caprioli *et al.*, 1994; Rüssmann *et al.*, 1995, Karch *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1996b; 1998, Bonnet *et al.*, 1998]. Daher wird heute im allgemeinen von STEC gesprochen und nicht mehr streng in EHEC und STEC getrennt.

Infektionen beim Menschen können bereits durch recht geringe Mengen von STEC-Keimen ausgelöst werden, die meist durch kontaminierte Lebensmitteln aus dem Hauptreservoir, den Rindern übertragen werden. Dabei sind Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde und auch Tauben [Beutin *et al.*, 1995] meist symptomlose Träger. Sie können auf fäkal-oralem Weg über kontaminierte Rohmilch, Hackfleisch, Wurst oder auch Trinkwasser und Gemüse ihre Keime auf den Menschen übertragen. Auch fäkal-orale Infektionen von Mensch zu Mensch sind möglich, was vor allem in Kindergärten und Pflegeheimen zu Ausbrüchen führte [Reida *et al.*, 1994].

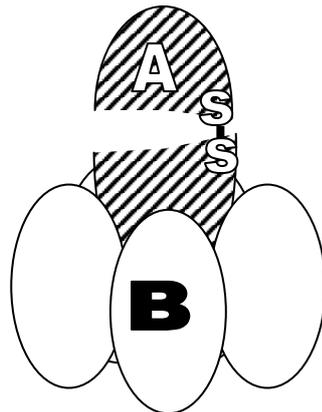
## 2.4. Shiga Toxine

Schon 1977 wurden *E. coli* beschrieben, die eine irreversible, zytotoxische Wirkung auf Verozellen haben. Die auslösenden Zytotoxine wurden daher Verotoxine genannt [Konowalchuk *et al.*, 1977]. Durch die Ergebnisse verschiedener Forscher [O'Brien *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1983] zeigten sich die Homologien zu dem Toxin aus *Shigella dysenteriae* Typ 1, was zunächst zu der Bezeichnung „Shiga like toxin“ führte. Als 1988 die Identität des Toxins aus *Escherichia coli* O157:H7 und des Shiga Toxins aus *Shigella dysenteriae* Typ 1 festgestellt wurde [Takao *et al.*, 1988], setzte sich der Name Shiga Toxin allmählich durch. Entdeckt wurden *Shigella dysenteriae* 1898 vom japanischen Bakteriologen Kyoshi Shiga, der ihnen zunächst den Namen *Bacillus dysenteriae* gab. Sie waren die ursprünglichen Träger der Shiga Toxin Gene und lösten bei Befallenen die Ruhr aus. Durch das moderne Gesundheitswesen und die zugehörigen Hygienevorschriften konnte diese Krankheit in den Industrienationen weitgehend zurückgedrängt werden. Aber Durchfall- oder HUS-auslösende STEC-Stämme zeichnen sich anderen *E. coli*-Stämmen gegenüber durch die Bildung eben dieses Shiga Toxins aus. Es stellte sich also die Frage, wie ein Protein aus *Shigella* von einem *E. coli*-Stamm produziert werden kann.

Die Gene für die Shiga Toxine (*stx*) sind, soweit untersucht, auf temperenten Bakteriophagen kodiert, die in das Chromosom der STEC inseriert sind [Smith *et al.*, 1983; Scotland *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984; Muniesa *et al.*, 2000]. Die Lokalisation der *stx*-Gene auf Phagen als mobilen genetischen Elemente kann ihr Auftauchen bei *E. coli* erklären. Inzwischen konnte durch Sequenzierung der Phagen H19B und 933W, in deren Genom die *stx1*- bzw. *stx2*-Gene liegen, gezeigt werden, dass die *stx* Gene Teil dieser lambdoiden Phagen sind [Neely&Friedman, 1998; Plunkett *et al.*, 1999]. Aufgrund dieses Befundes wurde vermutet, dass die Toxinproduktion mit der Freisetzung der Phagen während des lytischen Zyklus zusammenhängt. Diese Annahme konnte durch Untersuchungen zu Phagenfreisetzung und Shiga Toxinproduktion untermauert werden [Köhler *et al.*, 2000].

Gemeinsam ist den Shiga Toxinen ihr Aufbau aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten (siehe Abb.2.2), welcher durch Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Holotoxins bestätigt wurde [Fraser *et al.*, 1994]. Die B-Untereinheiten binden an ein membranständiges Glykosphingolipid

(Gb<sub>3</sub> bzw. CD77), danach wird das Toxin durch Endocytose in die Zielzellen internalisiert. Die A-Untereinheit ist eine rRNA-N-Glykosidase, die nach Spaltung einer Schwefelbindung zwischen Cystein 242 und 261 aktiviert wird. Sie spaltet einen spezifischen Adenosin-Rest in der 28S rRNA der 60S ribosomalen Untereinheit ab, was zur Hemmung der Proteinbiosynthese der Zielzellen durch enzymatische Inhibierung der Proteintranslation führt [O'Brien *et al.*, 1992].



**Abb. 2: Schematische Darstellung der AB<sub>5</sub>-Struktur von Shiga Toxin**, ein Heteromer aus einem A-Monomeren und einem B-Pentamer.

Allerdings lösen nicht alle Shiga Toxin-produzierenden *E. coli*-Stämme Diarrhöen oder gar HUS aus. In den meisten Fällen spielen bei diesen Krankheitsbildern weitere Pathogenitätsfaktoren eine wichtige Rolle (siehe 2.5.). Kinder und ältere Menschen sind jedoch deutlich empfindlicher für Infektionen. Nicht zuletzt hat aber auch die Art des Shiga Toxins einen wesentlichen Einfluß auf die Pathogenität des Stammes. So gibt es neben dem Shiga Toxin 1 (Stx1), welches in STEC O157:H7 gefunden wurde und in seiner Aminosäuresequenz identisch mit dem Toxin aus *Shigella dysenteriae* Typ 1 [Takao *et al.*, 1988] ist, noch eine weitere Hauptgruppe, das Shiga Toxin 2 (Stx2). Dieses Protein zeigt eine 55%ige Homologie zu dem Toxin aus *Shigella dysenteriae*. Vom Shiga Toxin 2 existieren auch Subtypen (bisher bekannt: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f). Untersuchungen zeigten, dass besonders Stx2 mit HUS korreliert [Nataro & Kaper, 1998, Donohue *et al.*, 2000] wohingegen seine Subtypen eine geringere Pathogenität aufweisen [Nishikawa *et al.*, 2000]. STEC die Stx2d exprimieren, beschrieb erstmals Pierard [Pierard *et al.*, 1998]. Stämme die nur dieses *stx*-Gen tragen, wurden bisher nur von Patienten mit einem wässrigen Durchfall oder asymptomatischen Trägern isoliert und weisen alle kein *eae*-Gen auf [Zhang *et al.*, 2000].

Stx2e hingegen wurde zuerst bei Ferkeln gefunden und löst dort die Oedemkrankheit [Weinstein *et al.*, 1988] und lebensbedrohlichen Durchfall [Osek, 1999] aus. Dagegen ist es nur sehr selten bei Menschen zu finden und ruft hier bei Trägern keinerlei Symptome hervor. Zudem ist auch bei keinem der Stämme, die einzig dieses Shiga Toxin tragen das *eae*-Gen nachgewiesen worden.

Stx2f ist ebenfalls nicht für den Menschen pathogen und wurde bei Tauben gefunden [Schmidt *et al.*, 2000].

Diese sehr unterschiedlichen Auswirkungen auf den Menschen hängen nicht nur von der Art des Shiga Toxins ab. Allerdings scheint es so, dass Stämme, die die gleichen Shiga Toxine sekretieren, sich trotz unterschiedlichen Serotyps oft ähnlich verhalten.

## 2.5. Weitere Pathogenitätsfaktoren der STEC

### 2.5.1. Aufbau des Plasmids pO157

Nahezu alle STEC O157:H7-Stämme verfügen über ein ca. 90 kb großes Plasmid, das pO157 genannt wird. Diese Stämme zeigen auf Blutagarplatten aus gewaschenen Erythrocyten eine so genannte verzögerte Hämolyse. Dafür verantwortlich ist das EHEC-Hämolysin [Schmidt *et al.*, 1994a; 1995b; 1996a], dessen genetische Information im Hämolysin-Operon mit den Genen *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD* plasmidkodiert ist. Dieses System ist typisch für die RTX-Toxine (Repeats in Toxin), zu deren Familie das EHEC-Hämolysin, das Produkt von *hlyA*, gehört. Dieses wird durch das Enzym HlyC acetyliert und so aktiviert. Die Sekretion erfolgt unter Zuhilfenahme der Proteine HlyB und HlyD in einem TypI-Sekretionssystem (siehe 2.2.), wobei das EHEC-Hämolysin überwiegend zellassoziiert ist und nicht in den Kulturüberstand abgegeben wird [Schmidt *et al.*, 1995b]. Andere Mitglieder der RTX-Familie wurden bei verschiedenen gramnegativen Bakterien gefunden und können als Porenbildner, Proteasen oder Lipasen essentiell für deren Pathogenese sein.

Das EHEC-Hämolysin ist als Porenbildner einzustufen, da Versuche mit künstlichen Lipidmembranen zeigten, dass es dort kationenselektive Kanäle mit einem Durchmesser von etwa 2,6 nm ausbildet [Schmidt *et al.*, 1996c]. Seine Rolle in der

Pathogenese ist noch nicht ganz aufgeklärt, wobei das EHEC-Hämolysin statistisch signifikant mit HUS-Infektionen korreliert. Man nimmt an, dass die Freisetzung von Hämoglobin durch die Lyse der Erythrocyten zur Eisenversorgung der STEC dient [Schmidt *et al.*, 1996c].

Außerdem befindet sich ein Gen für eine bifunktionelle Katalase-Peroxidase auf dem Plasmid pO157 [Brunder *et al.*, 1996], welches neben den chromosomal kodierten Katalase-Peroxidasen HPI und HPII exprimiert wird. Diese Katalase mit dem Namen KatP ist nach Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids, das den Transport durch die Cytoplasmamembran vermitteln kann, im Periplasma lokalisiert.

Weiterhin findet sich auf dem Plasmid pO157 das *espP*-Gen, das für ein 141,8 kDa großes Protein EspP kodiert. Dieses wird nach Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz und eines C-terminalen prozessierten Translokators als Serinprotease sezerniert. Es handelt sich hierbei also auch um ein sogenanntes TypIV-Sekretionssystem (siehe 2.2.). Das Protein EspP spaltet *in vitro* den Gerinnungsfaktor V, was *in vivo* zur verlangsamten Blutgerinnung führen könnte und so an der Auslösung beziehungsweise Verstärkung der bei STEC-Infektionen oftmals auftretenden blutigen Durchfälle beteiligt sein könnte [Brunder *et al.*, 1997].

Ebenfalls auf diesem Plasmid lokalisiert ist ein Gencluster mit 13 offenen Leserahmen, die Sequenzähnlichkeiten zwischen 38% und 70% zu Genen des Pullulanase-Operons aus *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca*, einem TypII-Sekretionssystem (siehe 2.2.), aufweisen. Daher wurde postuliert, dass diese 13 ORF für ein Transportsystem kodieren, welches als *etpC* bis *etpO* (EHEC type II secretion pathway) bezeichnet wird [Schmidt *et al.*, 1997]. Inzwischen ist die Sequenz von pO157 vollständig bekannt [Burland *et al.*, 1998]. Abbildung 2.3 zeigt allerdings nur die hier erwähnten Gene in ihrer Lage auf dem Plasmid.

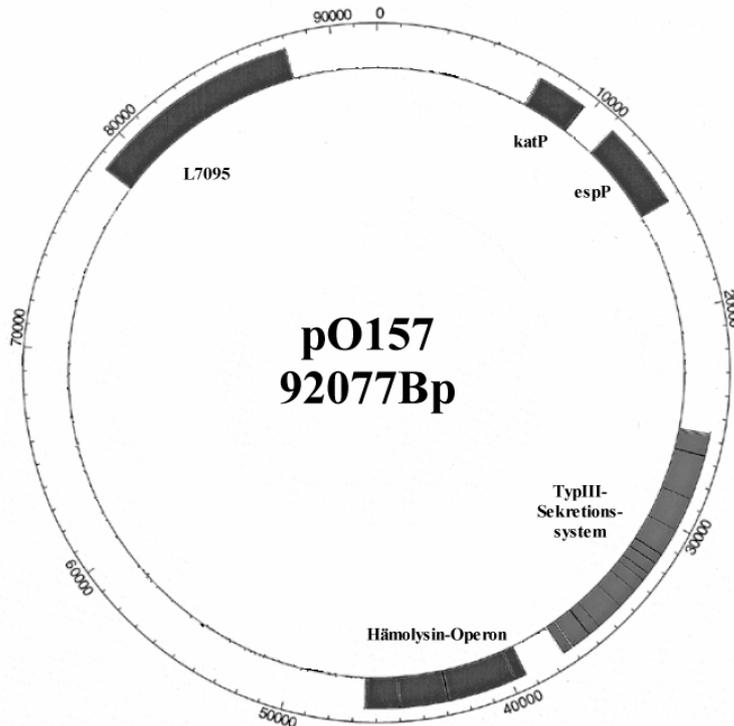
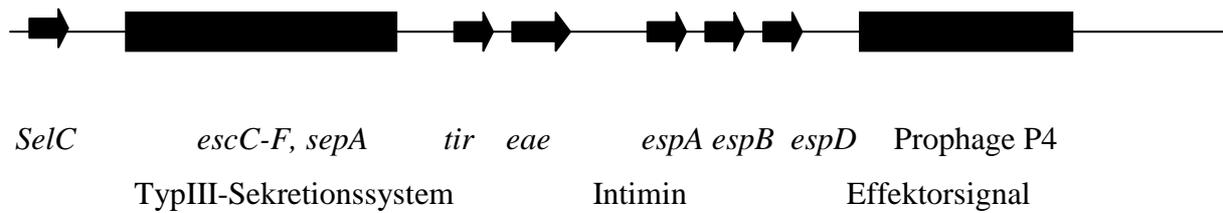


Abb. 3: Schematische Genkarte des Plasmids pO157 des STEC-Stammes EDL 933.

### 2.5.2. Die Pathogenitätsinsel LEE

Bei etwa 95 % aller Isolate von HUS-Patienten wurde ein Protein nachgewiesen, das für die Adhärenz an die Darmepithelzellen erforderlich ist. Hierbei handelt es sich um Intimin, das vom *eae*-Gen kodiert wird. Von diesem Gen wurden schon mehr als 4 Varianten identifiziert [Adu Bobie *et al.*, 1998]. Das Gen ist innerhalb einer aus EPEC (enteropathogene E. coli) stammenden Region, dem sogenannten LEE (Locus of enterocyte effacement), angesiedelt. Nach der Definition von Hacker [Hacker *et al.*, 1997] handelt es sich dabei um eine typische Pathogenitätsinsel die nur in pathogenen, nicht aber in apathogenen Stämmen nachweisbar ist. Der LEE umfaßt bei STEC 43,4 kb ( bei EPEC 35,5 kb) und der G+C-Gehalt beträgt beim LEE 38,4 %, über das gesamte *E. coli*-Chromosom 50 %. Eine Übersicht des LEE ist in Abbildung 2.4 gezeigt, auch die vollständige Sequenz ist inzwischen aufgeklärt [Perna *et al.*, 1998].



**Abb. 4: Schematische Genkarte des Locus of enterocyte effacement (LEE) in STEC**

Diese Pathogenitätsinsel LEE kodiert neben Intimin ebenfalls für ein Typ III-Sekretionssystem [Jarvis & Kaper, 1996]. Dies ist zumindest für die Sekretion von Intimin, Tir und der ebenfalls dort kodierten Proteine EspA, EspB und EspD (*E. coli* secreted proteins) [Kenny & Finlay, 1995; Kenny *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997] verantwortlich. Die gesamte Pathogenitätsinsel wurde auch bei STEC, *Hafnia alvei* und *Citrobacter freundii* nachgewiesen [McDaniel *et al.*, 1995] und ist immer hinter dem *selC*-tRNA-Gen in das jeweilige Chromosom integriert. Der LEE scheint ein wichtiger Faktor in der veränderten Gen-Ausstattung eines pathogenen gegenüber eines apathogenen STEC zu sein.

Die Proteine aller im LEE lokalisierten Gene wirken zusammen bei der Auslösung der „attaching and effacing“- (A/E-) Läsionen am Darmepithel. So kommt es zuerst zu einer lockeren Anheftung des Bakteriums an die Darmepithelzelle, danach verliert diese an der Kontaktstelle die Mikrovilli ihres Bürstensaums und es akkumulieren sich filamentöses Actin und andere Cytoskelettelemente. Daraus bildet die Zielzelle einen becherförmig eingestülpten Sockel, in dem das Bakterium in engstem Kontakt an der Zelle haftet [Louie *et al.*, 1993]. Dies alles geschieht durch Signaltransduktion in der Epithelzelle, wofür die Esp-Proteine verantwortlich sind. Die genauen Mechanismen dieser Vorgänge sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist allerdings klar, dass sie sich bei EPEC und STEC deutlich unterscheiden. So kommt es bei EPEC bei der Veränderung des Cytoskeletts der Epithelzelle auch zu Phosphorylierung von Tyrosin-Resten verschiedener Proteine und vor allem vom ebenfalls LEE-kodierten Tir (translocated intimin receptor). Dieser Rezeptor ist auch bei STEC vorhanden und wird auf nicht geklärte Weise in die Zielzelle geschleust, aber er wird nicht phosphoryliert und *in vitro* unter anderen Bedingungen synthetisiert und sezerniert [DeVinney *et al.*, 1999]. Die Bildung der A/E-Läsionen in der Colon-Mucosa ist vermutlich zumindest mitverantwortlich für die Entstehung der Diarrhöe, die sowohl bei EPEC- als auch bei STEC-Infektionen beobachtet wird.

Offensichtlich sind also STEC-Bakterien durch die Aufnahme mehrerer Virulenzdeterminanten, die auf mobilen genetischen Elementen wie Phagen, Pathogenitätsinseln und Plasmiden lokalisiert sind, zu ihrer vollen Pathogenität konvertiert. Dies erklärt auch, dass die vor kurzem veröffentlichte Genom-Sequenz von *E. coli* O157:H7 um 1000 kb größer ist als die von *E. coli* K12.

## **2.6. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit**

Bisher identifizierte Pathogenitätsfaktoren der STEC sind auf Bakteriophagen, Plasmiden und Pathogenitätsinseln kodiert. Bei der Mehrzahl der klinischen STEC-Isolate konnte die Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyte effacement) nachgewiesen werden. Der LEE ist stromabwärts des Gens für eine Selenocystein-tRNA (*selC*) in das Chromosom integriert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von 35 STEC-Stämmen, denen der LEE fehlt und die funktionelle Analyse von potentiellen Pathogenitätsfaktoren. Bei den molekularbiologischen Analysen sollte eine Fokussierung auf Gene vorgenommen werden, die im Bereich der *selC*-Region vorkommen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

Aminosäuresequenzierer:	Applied Biosystems, Weiterstadt: Modell 476A
Blotkammer:	BioRad, München: Mini Trans-Blot Zelle
Brutschränke:	Heraeus, Hanau: verschiedene Modelle
Diffusions-Entfärbeapparatur:	Desaga, Heidelberg: Modell DE 24
DNA-Sequenzierer:	Perkin Elmer, Weiterstadt: AbiPrism 377A
Elektrophoresekammern:	BioRad, München: Mini-Protean-II-Dual Slab Cell; von Keutz, Reiskirchen: Horizontale Agarosegel- Elektrophoresekammern, verschiedene Modelle
Elektrophorese-Netzteile:	BioRad, München: Modelle 3000Xi, 300 Biometra, Göttingen: Modelle P23, P24
Foto-Dokumentationsanlage:	Intas, Göttingen: Micro-Cam 3000
Hybridisierungsöfen:	Biometra Hybaid, Teddington, GB
pH-Meter:	WTW, Weilheim i. OB: Modell pH 530
Schüttel-Inkubator:	B.Braun, Melsungen: Certomat R/H
Sicherheitswerkbank:	Heraeus, Hanau: Herasafe HS12
Sequenzanalyse - Software:	BLAST algorithm ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) DNASIS 2.0 (Hitachi Software) HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, DKFZ, Heidelberg) Lasergene (DNASStar, Madison, USA) Oligo 4.0 (National Biosciences, Plymouth, USA) SeqEd (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Thermocycler:	Perkin-Elmer, Weiterstadt: GeneAmp 9600 Biometra, Göttingen: Personal Cycler
Tischinkubator:	Eppendorf, Hamburg: Thermostat 5320

Tischzentrifugen:	Heraeus, Hanau: Modelle Sepatech Biofuge 15 und Biofuge fresco
Ultraschallgerät:	Branson, Heusenstamm: Cell Disruptor B15
UV-DNA-Linker:	Stratagene, Amsterdam, NL: Stratalinker 1800
UV/VIS-Photometer:	Hitachi, Tokyo, Japan: Modell U-2000
UV-Transilluminator:	Intas, Göttingen: Modell TFX-35M
Waagen:	Sartorius, Göttingen: verschiedene Modelle
Wasserbäder:	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen:	Beckman, München: Ultrazentrifuge TL-100, Rotor TLA45; DuPont, Bad Homburg: Modell RC-5B, Rotor SS34; Sigma, Deisenhofen: Modell 3K20, Rotoren 12153 und 12156

### 3.1.2. Reagenzien

Allgemeine Chemikalien und Medienbestandteile wurden in p.A. Qualität von den Firmen Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich GmbH (Deisenhofen) bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden mitaufgeführt.

### 3.1.3. Sonstige Materialien

Standard-Kunststoffmaterialien wurden von den Firmen B. Braun (Melsungen), Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhäuser) und Sarstedt (Nürnberg) bezogen.

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Blotpapier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Centricon-50 Konzentrator	Amicon, Witten
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Hybridisierungsbeutel	Gibco BRL, Eggenstein
MicroAmp Reaktionsgefäße	Perkin Elmer, Weiterstadt
NC-Membran PROTRAN BA 85	Schleicher & Schuell, Dassel

Novex Pre-Cast Zymogram-Casein Gel	Invitrogen, Amsterdam, NL
Novex Pre-Cast Zymogram-Gelatine Gel	Invitrogen, Amsterdam, NL
Prep-A-Gene Kit	Biorad, München
Rotrand Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Zeta-Probe GT Nylonmembran	Biorad, München

### 3.1.4. Bakterienstämme

Es wurden 35 STEC-Stämme verschiedener Serogruppen für die Untersuchungen verwendet. Sie wurden zwischen Januar 1996 und Juni 2000 im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg aus Stuhlproben von Patienten mit Diarrhöe (n = 16) und asymptomatischen Trägern (n = 19) isoliert. Die Stämme enthielten das *stx<sub>2</sub> $\sigma$* -Gen, das *eae*-Gen war nicht nachweisbar. 20 dieser *stx<sub>2</sub> $\sigma$* -Stämme enthielten zusätzlich das *stx<sub>1</sub>*-Gen. Zum Vergleich wurden je 10 STEC-Stämme aus den fünf häufig vorkommenden Serogruppen O157, O111, O26, O145 und O103, die das *stx<sub>2</sub> $\sigma$* -Gen nicht besitzen, herangezogen. Die Serotypisierung wurde im Labor von Prof. Bockemühl, Hamburg, vorgenommen. Weiterhin wurden Vergleichsuntersuchungen an je fünf bis zehn EPEC-, ETEC-, EAEC-, EIEC- und UPEC-Stämmen durchgeführt. Alle diese Vergleichs-Stämme stammen aus der Instituts-Stammsammlung von klinischen Isolaten. Es gelten die allgemeinen Kriterien, wonach enteropathogene *E. coli* (EPEC) durch Vorliegen des *eaeA* Gens und des EAF-Plasmids charakterisiert werden [Franke *et al.*, 1994]. Enterotoxische *E. coli* (ETEC) exprimieren hitzestabiles, hitzelabiles oder beide Toxine (ST bzw. LT), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) zeigen die sogenannte „stacked-brick“-Adhärenz an HEp2-Zellen [Schmidt *et al.*, 1995a], enteroinvasive *E. coli* (EIEC) weisen Invasionsgene auf dem großen Invasionsplasmid auf und uropathogene *E. coli* (UPEC) produzieren Fimbrien und tragen Kapseln. Diese Stämme waren alle schon in früheren Untersuchungen charakterisiert worden. Als Kontrollstämme wurden der EHEC-O157:H7-Stamm EDL933 aus einem Ausbruch von hämorrhagischer Colitis in den USA 1982 [O'Brien *et al.*, 1983; Riley *et al.*, 1983] und der *E. coli*-Laborstamm DH5 $\alpha$  (GibcoBrl, Eggenstein) verwendet. Letzterer wurde auch als Wirt für rekombinante Plasmide verwendet. Der Laborstamm *E. coli* K12 XL1-blue MR

(Stratagene, Amsterdam, NL), der im Gigapack® III XL-11 Packaging Extrakt enthalten war, wurde als Wirtstamm für Phagen bei der Erstellung der Genbank verwendet.

Bei der Proteinisolierung wurde als Vergleichs-Stamm zu 4797/97 der STEC-Stamm 520/99 eingesetzt. Dieser ist im Phänotyp und Genotyp sehr ähnlich (Tab.1). Es war also zu erwarten, dass ein ähnliches Bandenmuster bei einer Proteinpräparation zu sehen ist.

	<i>espI</i>	<i>iha</i>	<i>btuB</i>	<i>espP</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>eae</i>	<b>Ehly</b>	S.F.	E.H.
4797/97	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
520/99	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+

**Tab.1: Geno- und Phänotypischer Vergleich der STEC-Stämme 4797/97 und 520/99.** Kursiv = Genotypischer Vergleich. (*Ehly* = EHEC-Hämolsin-Gen) S.F. = Sorbitol fermentierend, E.H.= Enterohämolyse auf Blutagar

### 3.1.5. Plasmide

Das Cosmid SuperCosI von Stratagene wurde für die Erstellung der Genbank verwendet. Der hier eingesetzte Klon pKZ6-6 enthielt ein 37,7 kB großes Fragment aus dem STEC-Stamm 4797/97. Teilweise wurde dieser Vektor direkt zur Sequenzierung eingesetzt. Für Subklonierung und anschließende Sequenzierung sowie für sämtliche Proteinexpressionsversuche wurde das Plasmid pK18 [Pridmore, 1987] als Vektor eingesetzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide entstanden durch Ligation von *EcoRI*- und *BamHI*-Restriktionsfragmenten in pK18. Es handelt sich hier um die Plasmide pKZ6-6/1 bis pKZ6-6/7 und pKZ6-6/10 sowie um pZH4, die im Ergebnisteil näher beschrieben werden.

### 3.1.6. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit für DNA-Sequenzierungen und PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) synthetisiert.

Zuerst wurden Sequenzierungen mit Universal- und Reverse-Primern für M13- bzw. pUC-Vektoren durchgeführt. Für Lücken und Überlappungsbereiche wurden aus

erhaltenen Sequenzen interne Primer mit dem Program Oligo 4.0 konstruiert. Diese entsprechen jeweils Bereichen aus der veröffentlichten Gesamtsequenz.

Universal-Primer: 5´-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG-3´

Reverse-Primer: 5´-TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3´

Die PCR-Primer sind bei der Methodenbeschreibung der jeweiligen PCR-Bedingungen notiert.

### 3.1.7. Bioreagenzien

AmpliTaq DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Apolipoprotein A1 (human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DNA-Molecular Weight Marker X	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxyribonuklease I (DNaseI) aus Rinderpankreas, Grad I	Roche Diagnostics, Mannheim
Esel anti-Schaf-IgG, AP-konjugiert	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Gigapack® III XL-11 Packaging Extrakt	Stratagene, Amsterdam, NL
Haemoglobin (human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Haptoglobin (human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
High density lipoprotein (HDL, human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Human-Normalserum	von gesunden Freiwilligen
Human-Plasma, Citrat behandelt	von gesunden Freiwilligen
Human-Plasma-IgA1 (Myeloma-Protein)	Biodesign, Kennebunk, ME, USA
IgA1-Protease von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Kaninchen anti-EspP-HIS	Dr. Brunder, Würzburg
Kaninchen anti-Ziege-IgG, POX-konjugiert	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Kollagenase Typ 3	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Kollagenase Typ VI	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Lactoferrin (human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Low density lipoprotein (LDL, human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Lysozym (Hühnereiweiß)	Serva GmbH, Heidelberg
Makroglobulin (human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Pepsin A (Schweinemagen)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Proteinase K ( <i>Tritirachium album</i> )	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Gibco Brl, Eggenstein
Ribonuklease A (RNaseA) aus Rinderpankreas	Serva GmbH, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva GmbH, Heidelberg
Schaf anti-Human-Faktor V-HIS	Biodesign, Kennebuk, ME, USA
SDS-PAGE-Standards low, vorgefärbt	BioRad, München
SDS-PAGE-Standards high, vorgefärbt	BioRad, München
SDS-PAGE-Standard, nicht vorgefärbt	Pharmacia, Erlangen
T4-DNA-Ligase	GibcoBrl, Eggenstein
Thrombin (human)	Roche Diagnostics, Mannheim
Transferrin (human)	Serva GmbH, Heidelberg
Trypsin	Serva GmbH, Heidelberg
Very low density lipoprotein (VLDL, human)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ziege anti-Human-ApolipoproteinA1-HIS	Biodesign, Kennebuk, ME, USA
Ziege anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert	Dianova, Hamburg

### 3.1.8. Medien

Spezial-Minimalmedium:	L1:	$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	1,05 %
		$KH_2PO_4$	0,45 %
		$(NH_4)_2SO_4$	0,10 %
		$Na_3C_6H_5O_7 \times 2 H_2O$	0,05 %
		in Aqua dest.; pH 7,2; autoklavieren	
	L2:	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	10 mM
		in Aqua dest.; autoklavieren	
	L3:	20% Glukose	
		in Aqua dest.; sterilfiltrieren	
	frisch mischen: 1000 ml L1 + 100 ml L2 + 10 ml L3		
LB-Medium:	1% Trypton		
	0,5% Hefeextrakt		
	1% NaCl		
	in Aqua dest.; pH 7,5		

NB-Medium: 0,8% Nutrient broth (Difco)  
in Aqua dest.; pH 7,2

T-Medium: 1% Trypton  
in Aqua dest.; pH 7,2

CDM-Medium: 0,23 %  $K_2HPO_4$   
0,07 %  $KH_2PO_4$   
0,10 %  $(NH_4)_2SO_4$   
0,01%  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
0,06 %  $Na_3C_6H_5O_7 \times 2 H_2O$   
in Aqua dest.; pH 7,3; autoklavieren

frisch zusetzen: je 1 % der sterilfiltrierten, wäßrigen Lösungen  
20 % Casaminoäuren  
20 % Glukose  
0,5 mM  $CaCl_2$

Zellkulturmedium: MEM-Earle-Medium  
fötales Kälberserum  
Vitamine

Bei Bedarf wurde den autoklavierten Medien 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin bzw. 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährböden aus LB-Medium wurde diesem vor Autoklavierung 1,5 % Bacto-Agar zugesetzt.

### 3.1.9. Puffer und allgemeine Lösungen

10 x PBS: 1,4 M NaCl  
27 mM KCl  
1,0 M  $Na_2HPO_4$   
15 mM  $KH_2PO_4$   
0,1 %  $NaN_3$   
in Aqua dest.; pH 7,2

Tris/HCl: X M Tris  
in Aqua dest.; pH mit HCl einstellen, auffüllen

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA  
in Aqua dest.

SM-Puffer: 5,8 g NaCl  
2,0 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
0,01 % Gelatine  
in Aqua dest.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Erstellen einer Genbank aus dem Chromosom von *E. coli* Stamm 4797/97

#### Präparation chromosomaler DNA

Mit einer Kolonie des Stammes 4797/97 wurden 20 ml LB-Medium bei 37°C ÜN im Schüttelinkubator bei 180 rpm wachsen lassen. Zur Isolierung der enthaltenen chromosomalen DNA waren folgende Puffer nötig:

Puffer 1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
50 mM EDTA

Lysozymbelösung: 1 % Lysozym in 250 mM Tris/HCl, pH 7,5  
(frisch angesetzt)

STEP: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
400 mM EDTA  
0,5 % SDS  
0,1 % Proteinase K

RNaseA-Lösung: 1 % in 50 mM Na-Acetat pH 5,0  
(20 min gekocht zur Zerstörung evt. DNase-Aktivität)

40 ml einer logarithmischen Kultur wurden bei 4°C und 3500 x g für 15 min zentrifugiert, die erhaltenen Zellen in 5 ml Puffer 1 resuspendiert und ÜN bei -20°C eingefroren. Unter Zugabe von 500 µl Lysozymlösung und zeitweiligem Invertieren wurden die Zellen aufgetaut und für 45 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 ml STEP zugegeben und der Ansatz nach vorsichtigem Mischen für 1 h bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Zum Abbau freigewordener RNA wurden 4µl RNaseA-Lösung zugegeben und für 10 min bei RT belassen. Nach Zugabe von 10 ml Aq. bidest. und 6 ml Phenol wurde der Ansatz kräftig gemischt und die Phasen durch 15 min Zentrifugation bei RT und 12000 x g getrennt. Dieser Schritt dient der Fällung enthaltener Proteine und wurde noch zweimal wiederholt. Die wäßrigen Phasen wurden in einem Erlenmeyerkolben vereinigt und durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 VT 96 % Ethanol wurde die DNA gefällt. Das fädige Präzipitat wurde in 96 % und anschließend 70 % Ethanol gewaschen und in 500 µl Aq. bidest. gelöst. Schließlich erfolgte noch eine weitere RNaseA Behandlung dieser Lösung mit 6 µl RNaseA-Lösung für 15 min bei 37°C.

#### Restriktion genomischer DNA mit *Sau3AI*

Hier wurde etwa eine Einheit *Sau3AI* pro 25 µg DNA in einem 100µl-Ansatz mit dem „one for all“-Puffer von Pharmacia verwendet. Im gleichen Ansatz kann in diesem Puffer die Dephosphorilierung der entstandenen Fragmente mit zwei Einheiten Shrimp-alkalischer-Phosphatase erfolgen. Die Restriktion erfolgte für etwa 25 min bei 37°C. *Sau3AI* hat statistisch gesehen die über das ganze Genom von *E. coli* am besten verteilten Restriktionsschnittstellen, ergibt bei solch kurzer Inkubationszeit keine zu kleinen Fragmente und diese passen in *BamH1*-Schnittstellen der multiplen Klonierungs-Stelle des Vektors. Die Dephosphorilierung verhindert das Religieren der Fragmente. Man erhält so verschiedenste Fragmentgrößen, jedoch werden nur 47 bis 51 kB große Fragmente in die Phagenhüllen des Gigapack® III XL-11 Packaging Extrakts verpackt. Das bedeutet, jeder Phage enthält von der chromosomalen DNA etwa 40 kB.

#### Vorbereitung des Vektor-Cosmids SuperCosI

Das 7,9 kB große Cosmid SuperCosI wurde in den Wirtstamm DH5α transformiert (s.3.2.6. Transformation ) und aus einer ÜN-LB-Kultur mit Ampicillin mit dem Qiagen-Midi-Kit (s. 3.2.2.) präpariert. Der Vektor wurde unter gleichen Bedingungen wie die chromosomale DNA mit *XbaI* restringiert und gleichzeitig dephosphoriliert. Dadurch

entstand linearisierter Vektor, der dank endständiger *cos*-Seiten in eine Phagenhülle integriert werden kann. Die enthaltene multiple Klonierungs-Stelle wurde durch Restriktion mit *Bam*HI (s. 3.2.3.) geöffnet. Dieser Vektor konnte nun zur Ligation eingesetzt werden.

#### Ligation chromosomaler DNA mit Cosmid-Vektor

In Ansätzen á 10 µl wurden 5 µg der *Sau*3AI verdauten DNA-Fragmente mit 2 µg des vorbereiteten Cosmid-Vektors und 0,4 Einheiten T4-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte wie unter 3.2.6. beschrieben in einfach konzentriertem Ligasepuffer für 16 h bei 8°C. Zur Kontrolle der Ligation wurden 5 µl des Ansatzes mittels horizontaler Gelelektrophorese überprüft.

#### Verpackung der DNA in Phagenhüllen

In jeweils ein Reaktionsgefäß mit frisch aufgetautem Verpackungsextrakt aus dem Gigapack® III XL-11 Packaging Extrakt (Aufbewahrung bei -80°C) wurden 5 µl eines kontrollierten Ligationsansatzes pipettiert und der Ansatz vorsichtig gemischt. Anzentrifugieren für 3-5 sec entfernte alle Luftblasen und vereinigte den gesamten Ansatz am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurden 500 µl SM-Puffer (s. 3.1.9.) zugegeben und es erfolgte durch Zugabe von 20 µl Chloroform und Zentrifugation die Fällung von nicht verpackter DNA. Der Überstand wurde in Portionen á 25 µl direkt zur Infektion des *E. coli* Wirts-Laborstammes verwendet.

#### Vorbereitung des Wirts-Laborstammes

Der im Gigapack® III XL-11 Packaging Extrakt enthaltene Wirts-Laborstamm *E. coli* K12 XL1-blue MR wurde sofort nach Erhalt des Kits aus der Glycerin-Stammlösung auf LB-Agar ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie von dieser Platte wurde eine Flüssigkultur in 50 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% Maltose angeimpft. In der expotentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen abzentrifugiert und in sterilem 10 mM MgSO<sub>4</sub> zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wieder aufgenommen.

#### Infektion des Wirtsstammes mit den Phagen

Von obiger Lösung wurden direkt 25 µl mit der gleichen Menge unverdünnter Phagen-Lösung in einem Mikro-Reaktionsgefäß vermennt und 30 min bei RT belassen. Die Phagen dringen so in den Bakterienzellen des Wirtsstammes ein und geben dort ihr Cosmid frei. Danach wurden 200 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C mit zeitweiliger Inversion (alle 15 min)

inkubiert. Diese Erholungsphase dient zur Expression der Antibiotikaresistenz. Der Ansatz wurde dann durch Anzentrifugation (1200 x g, RT, 10 min) und Suspension in nur 50 µl aufkonzentriert und auf geeigneten Selektionsagarplatten ausplattiert, welche dann ÜN bei 37°C inkubiert wurden.

### Fertigstellen der Genbank

Von den erhaltenen Transduktanten wurden jeweils 48 Stück (6 Reihen á 8 Kolonien) auf frische Selektionsplatten nach einem Rasterschema überimpft. Auf dies Weise wurden 18 Platten beimpft und alle Kolonien erhielten eine Bezeichnung aus Platten- und Koloniennummer (z.B.: 6-6 = Platte 6 Kolonie Nr. 6). Die Platten wurden für 36 h bei 37°C inkubiert, um möglichst große Kolonien zu erhalten. Von all diesen Klonen wurden einfache Konserven hergestellt. Dazu wurden 200 µl eines Gemisches aus 2/3 LB-Medium mit Ampicillin und 1/3 Glycerin in ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen vorgelegt. Dann wurden mittels eines Stempels (6 x 8 Metallstifte auf einer Platte angebracht) alle Kolonien von einer Platte gepickt und in die in den Vertiefungen vorgelegte Lösung eingerieben. Diese ELISA-Platten wurden für 48 h bei 37°C inkubiert und schließlich bei -80°C konserviert.

### **3.2.2. Plasmidpräparation**

Plasmid-DNA des Genbank-Cosmids pKZ6-6 und der Subklone in pK18 wurde mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen präpariert. Dieser enthält folgende

Komponenten:	Qiagen-tip 100 Säule	Bindungskapazität 100 µg DNA
	Resuspendierungspuffer P1:	50 mM Tris/HCl pH 8,0
		10 mM EDTA
		100 µg/ml Rnase A
	Lysispuffer P2:	200 mM NaOH
		1 % SDS
	Neutralisationspuffer P3:	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5
	Equilibrierungspuffer QBT:	750 mM NaCl
		50 mM MOPS, pH 7,0
		15 % Isopropanol
		0,15 % Triton X-100

---

Waschpuffer QC:	1,0 M NaCl
	50 mM MOPS, pH 7,0
	15 % Isopropanol
Elutionspuffer QF:	1,25 M NaCl
	15 % Isopropanol
	50 mM Tris/ Hcl, pH 8,5

Etwa 50 ml einer frischen ÜN-Kultur (100 ml bei Cosmidisolierung) wurden bei 4°C und 6000 x g für 15 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das trockene Sediment wurde in 4 ml P1 resuspendiert und nach sorgfältiger aber vorsichtiger Mischung mit 4 ml P2 für 5 min bei RT inkubiert. Die dadurch lysierten Zellen wurden nach Zugabe von 4 ml kaltem P3 15 min auf Eis inkubiert. Das so entstandene Präzipitat aus chromosomaler DNA, Proteinen, Zellresten und SDS wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 20000 x g für 30 min abgetrennt. In der Zwischenzeit wurde die Qiagen Midi Säule mit 4ml QBT equilibriert. Der Überstand wurde (falls er nicht völlig klar war über einen Faltenfilter) auf die vorbereitete Säule gegeben. Nach Durchlaufen der Säule wurde diese zweimal mit je 10 ml QC gewaschen. In ein frisches Auffanggefäß wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml QF eluiert. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol bei RT versetzt und sofort durch Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g in 30 min gefällt. Das erhaltene Sediment wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 bis 100 µl TE-Puffer gelöst. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Verdünnung mit Aqua dest. 1:50 durch Messung der optischen Dichte. Es gilt hier bei 260 nm für  $E = 1$ , dass die Lösung 50 µg DNA pro ml enthält.

### 3.2.3. Restriktion von DNA

Zur Subklonierung des Cosmid-Insertionsfragments wurde das Cosmid mit *EcoR*I zum Restriktionsverdau eingesetzt. Dazu wurde etwa eine Einheit pro µg DNA in einem 20 µl-Ansatz mit dem vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer verwendet. Die Restriktion erfolgte für etwa 2 h bei 37°C. Entsprechend wurde auch beim Einsatz von *Bam*H1 vorgegangen.

### 3.2.4. Horizontale Agarosegel-Elektrophorese

10x TBE-Puffer:	0,89 M Tris
	0,89 M Borsäure
	25 mM EDTA
50x TAE-Puffer:	2,0 M Tris
	1,0 M Essigsäure
	50 mM EDTA
Blaumarker:	50 % Glycerin
	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylencyanol FF
	25 mM EDTA

Ethidiumbromid- Färbegrad: 200 µg Ethidiumbromid in 1 l Aq.dest.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden etwa 5 mm dicke, horizontale Flachgele eingesetzt. Dabei wurde Agarose für analytische Zwecke (Kontrolle von PCR-Amplifikaten oder Restriktionsfragmenten) in 0,5 x TBE-Puffer als Elektrodenpuffer, für präparative Gele in 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Diese Lösung wurde nach Abkühlung auf etwa 50°C in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurde die Agarose 0,6 % bis 1,5 % verwendet. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer mit Elektrodenpuffer überschichtet. In die entstandenen Geltaschen wurden sie mit 1/10 Volumen Blaumarker versetzten DNA-Proben von max. 20 µl pipettiert. Zur Größenkontrolle diente der DNA-Molekular weight marker X. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 1,5 V/cm<sup>2</sup> Gel bis die Bromphenolblau-Bande etwa ¾ des Gels durchlaufen hatte. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Färbung in Ethidiumbromidbad mit kurzer Entfärbung in Wasser zwecks besserer Differenzierung. Unter UV-Licht von 312 nm Wellenlänge waren die DNA-Banden zur Präparation oder Dokumentation zu erkennen.

### 3.2.5. Präparation von DNA aus Agarosegelen mittels Prep-A-Gene Kit

Der verwendete Prep-A-Gene DNA Purification Kit enthält folgende Bestandteile:

Prep-A-Gene Matrix:	Bindungskapazität 0,2µg DNA/µl
Bindepuffer:	6 M Natriumperchlorat 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mM EDTA 50% Ethanol
Elutionspuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

Von zur DNA-Präparation durchgeführten Agarosegelen wurden rechts und links außen zwei Markerspuren abgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die Größe der gesuchten Bande markiert. So konnten dann die gewünschten DNA-Fragmente ohne Ethidiumbromid- bzw. UV-Behandlung aus dem Gel ausgeschnitten werden. Damit wurden Strangbrüche der DNA vermieden. Die Gelstücke wurden mit dem dreifachen Volumen Bindepuffer verستetzt und bei 55°C in etwa 5-10 min gelöst. Pro µg DNA (ca. 150 µg Gel) wurden 5 µl Prep-A-Gene Matrix zugegeben und der Ansatz nach guter Durchmischung etwa 10 min unter mehrmaliger Inversion bei RT inkubiert. Nachdem so die DNA an die Silica-Matrix gebunden war, wurde die Matrix bei etwa 20000 g 30 s bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde noch zweimal mit der 50-fachen Matrixmenge an Bindepuffer und schließlich dreimal mit derselben Menge Waschpuffer gewaschen und jeweils wieder zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde schließlich in Elutionspuffer (Matrixvolumen + 2 µl) resuspendiert, und 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation konnte der DNA haltige Überstand isoliert werden. Diese Elution wurde wiederholt und die vereinigten Eluate durch die Agarosegel-Elektrophorese eines Aliquots auf die Identität und Konzentration der erhaltenen DNA überprüft.

### 3.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

#### Dephosphorilierung

Die zu klonierende Insert-DNA und die mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisierte Vektor-DNA waren mittels Prep-A-Gene Matrix aus Agarosegelen gereinigt. Die Dephosphorilierung erfolgte mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP). Es wird hier durch eine Dephosphorilierung der 5'-Basen der linearisierten Vektor-DNA eine Religierung des Vektors weitestgehend vermieden. Dazu wurden etwa 50 ng des linearisierten Vektors mit 3 Einheiten der SAP in auf einfache Konzentration verdünntem Dephosphorilierungspuffer für etwa 45 min bei 37°C inkubiert. Die SAP kann durch Inkubation des Reaktionsansatzes bei 65°C für 20 min vollständig inaktiviert werden, wodurch die nachfolgende Ligation im gleichen Ansatz durch geführt werden konnte.

#### Ligation

Die geschnittene und aufgereinigte Insert-DNA wurde im Verhältnis 3:1 dem Dehosphorilierungsansatz mit Vektor-DNA zugesetzt. Dies entspricht bei obigen Mengen etwa 150 ng Insert-DNA, wobei die Mengen nach Abschätzung des DNA-Gehaltes der Gelpräparationen über die Bandengröße im Agarosegel eingesetzt wurden. Zur Ligation dienten 0,4 Einheiten T4-DNA-Ligase bei Inkubation in einfach konzentriertem Ligase-Puffer für 16 h bei 8°C ÜN.

#### Kompetente Zellen

Es wurde nach der Methode von Hanahan gearbeitet.

TFB 1:        30 mM K-Acetat  
              50 mM MnCl<sub>2</sub>  
              100 mM RbCl  
              10 mM CaCl<sub>2</sub>  
              15 % Glycerin

TFB 2:        10 mM MOPS pH 7,0  
              75 mM CaCl<sub>2</sub>  
              10 mM RbCl  
              15 % Glycerin

Mit 2,5 ml einer DH5 $\alpha$ -ÜN-Kultur wurden 250 ml LB-Medium beimpft und bei 37°C bis zur expotentiellen Phase (OD<sub>600</sub> ca. 0,5) kultiviert. Nach Überführung in

Zentrifugenbecher wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 2000 x g für 15 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in insgesamt 20 ml eiskaltem TFB 1 resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem TFB 2 suspendiert. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden zu je 200 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -70°C bis zur Nutzung gelagert. Zur Kontrolle der Kompetenz wurde ein Aliquot mit Plasmid-DNA versetzt und das Wachstum der DH5α-Bakterien auf die damit eingeführte Resistenz überprüft.

### Transformation

Aliquots der kompetenten DH5α-Zellen wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut. In das Reaktionsgefäß wurde ein Ligationsansatz von 20 µl Volumen bzw. 20 ng zirkuläre Plasmid-DNA unter vorsichtigem Durchmischen zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90s im Wasserbad und sofort anschließend Abkühlung auf Eis. Der gesamte Ansatz wurde zu 4 ml LB-Medium gegeben und für etwa 1 h bei 37°C in einer Erholungsphase belassen. Diese Kultur wurde durch Anzentrifugation (1200 x g, RT, 10 min) und Suspension in nur 500 µl aufkonzentriert und in verschiedenen Aliquots auf geeigneten Selektionsagarplatten ausplattiert. Durch Verwendung des Vektors pK18 konnte mit Platten aus LB mit Kanamycin, X-Gal und IPTG eine „Blau-Weiß-Selektion“ durchgeführt werden.

### **3.2.7. DNA-Sequenzierung**

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

Terminator-Prämix:	Dye-Terminatoren (A, C, G, T)
	dATP, dCTP, dTTP, dITP
	Tris/HCl pH 9,0
	MgCl <sub>2</sub>
	thermostabile Pyrophosphatase
	Ampli Taq-DNA-Polymerase

Centri-Sep Säulen	Gelfiltrationssäulen
-------------------	----------------------

Weiterhin benötigt werden:

Probenlösung:	Gemisch aus
---------------	-------------

---

	1 VT 50 mM EDTA pH 8,5
	und 5 VT Formamid
Acrylamid-Lösung:	38 % Acrylamid
	2 % N,N'-Methylenbisacrylamid
	über Amberlite-Kationenaustauscher deionisiert
APS:	10 % Ammoniumpersulfat
Polyacrylamidgel 7 %:	30 g Harnstoff
	10,5 ml Acrylamidlösung
	6 ml 10 x TBE-Puffer
	22 ml Lichrosolv ®
	180 µl APS
	24 µl TEMED

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte auf Basis der Didesoxy-Kettenterminationsmethode nach Sanger *et al.* [1981]. Jedoch wurden die Nukleotidsequenzen hier unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Terminatoren bestimmt. Dazu wurden etwa 0,6 µg doppelsträngiger DNA mit 5 pmol des Sequenzierprimers und 8 µl des Terminator-Prämixes in 20 µl hochreinem Wasser (Lichrosolv ®) gelöst. Mit diesem Ansatz wurde eine PCR von 25 Zyklen durchgeführt. Die Zyklen bestanden aus den drei Schritten Denaturierung für 15 s bei 96°C, Hybridisierung für 15 s bei 45 - 60°C, je nach der Schmelztemperatur des eingesetzten Primers, und der Polymerisation für 4 min bei 60°C. Die erhaltenen PCR Produkte wurden durch Gelfiltration über die Centri-Sep Säulen des Sequenzier Kits von Perkin Elmer von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Die gewonnene DNA-Lösung wurde in der Speed-Vac zur Trockne eingedampft und in 4 µl der Probenlösung aufgenommen. Diese Proben wurden in einem 7 % Polyacrylamidgel mit einfachem TBE-Elektrodenpuffer im Applied-Biosystems Sequenzierer aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte automatisch direkt im Sequenziergerät.

Die Sequenzierung der Subklone aus pKZ6-6 erfolgte zunächst mit Universalprimern und dann schrittweise mit Primern, die auf der Basis schon bekannter DNA-Sequenzen mit dem Program Oligo 4.0 konstruiert wurden. Die Bereiche zur Überlappung der Subklone wurden ebenfalls mit konstruierten Primern anhand der

Cosmid-DNA sequenziert. Es wurden beide Nukleotidstränge doppelt sequenziert, so dass jede Base mindestens viermal sequenziert wurde.

Die erhaltenen Elektropherogramme wurden unter Verwendung des Sequence-Editor-Programmes SeqEd überprüft und abgeglichen. Weitere Analysen der Sequenzdaten erfolgten mit den Programmen DNAsis, dem HUSAR-Programmpaket und Lasergene. Homologe Sequenzen in den EMBL / GenBank Datenbanken wurden mit BLAST gesucht.

### 3.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle hier durchgeführten PCRs fanden unter den gleichen Rahmenbedingungen statt, so dass hier zunächst eine allgemeine Beschreibung der Vorgehensweise folgt.

Es wurden frische Einzelkolonien einer ÜN bebrüteten Platte gepickt (entspricht etwa  $10^5$  Bakterien) und in 50  $\mu$ l 150 mM NaCl suspendiert. Als Reaktionsansatz wurde in ein MicroAmp Reaktionsgefäß pipettiert:

- 5  $\mu$ l Bakteriensuspension ( $\approx 10^4$  Bakterien)
- 30 pM Startprimer
- 30 pM Endprimer
- 1  $\mu$ l dNTP-Lösung
- 5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer II
- 3  $\mu$ l 25 mM  $MgCl_2$  (= 1,5 mM)
- 2 Einheiten AmpliTaq DNA-Polymerase
- Lichrosolv® ad 50  $\mu$ l

Die Reaktionen wurden in den Geräten GeneAmp PCR System 9600 und Biometra Personal Cycler durchgeführt. Die genauen Reaktionsbedingungen mit 30 Zyklen aus Denaturierungs-, Verlängerungs- und Polymerisationsschritt sind jeweils bei den einzelnen Beschreibungen aufgeführt. Die Temperatur des Verlängerungs- und die Dauer des Polymerisationsschrittes sind abhängig von der speziellen Primerschmelztemperatur bzw. der Größe des erwarteten Produktes. Allerdings erfolgte jeweils zu Beginn für 5 min Erhitzen auf 94°C, um die Bakterien zu lysieren und um die Reaktion zu vervollständigen, wurde nach 30 Zyklen für 5 min eine letzte Polymerisation bei 72°C durchgeführt. Von den Reaktionsansätzen wurden am Ende jeweils 20  $\mu$ l durch eine Gelelektrophorese auf das erwartete PCR-Produkt überprüft.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle diente jeweils 4797/97 bzw. DH5 $\alpha$ , teilweise zusätzlich jeweils andere Stämme.

*eae*-PCR:

SK1: CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC

SK2: CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 30s

Verlängerung: 52°C 60s

Polymerisation: 72°C 60s

Das hier erwartete Produkt war ein 863 Bp großes Teilstück aus dem *eae*-Gen.

*pas*-PCR:

ANK-49: ATG TTA TCC TCA TAT AAA ATA AAC

ANK-50: TTA ATA CGA CAG TGG AAT ATG

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 20s

Verlängerung: 50°C 60s

Polymerisation: 72°C 120s

Das hier erwartete Produkt war ein 1221 Bp großes Teilstück aus dem *pas*-Gen.

*escC*-PCR:

*escC*-U: AGA CAA CAC CAG GGA CGA C

*escC*-L: ACA AGC TGC CCC GTC CTC T

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 60s

Verlängerung: 56°C 60s

Polymerisation: 72°C 90s

Das hier erwartete Produkt war ein 575 Bp großes Teilstück aus dem *escC*-Gen.

escF-PCR:

escF-U: ATG GCG GAT TGA GAC ACC T

escF-L: TCA ACA TTC CAC TTT CTA CG

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 60s

Verlängerung: 52°C 60s

Polymerisation: 72°C 90s

Das hier erwartete Produkt war ein 518 Bp großes Teilstück aus dem *escF*-Gen.

se/C tRNA-probing:

K260: GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT

K295: CGC CGA TTT TTC TTA GCC CA

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 90s

Verlängerung: 60°C 60s

Polymerisation: 72°C 120s

Ein PCR-Produkt der Primer K 260 und K 295 zeigt an, dass der LEE fehlt und in das *se/C*-tRNA-Gen keine andere DNA inseriert ist. Hier wurde DH5 $\alpha$  als Positivkontrolle verwendet, das entstehende Produkt war 2173 Bp groß. EDL 933, der den LEE besitzt, dient hier als Negativkontrolle.

K295: CGC CGA TTT TTC TTA GCC CA

K296: CAT TCT GAA ACA AAC TGC TC

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 90s

Verlängerung: 60°C 60s

Polymerisation: 72°C 60s

Das hier erwartete Produkt war ein 418 Bp großes Verbindungsstück zwischen LEE-spezifischen Sequenzen aus *E. coli* O157:H7 und dem *yicL*-Gen des *E. coli*-Chromosoms. Es dienten hier wieder EDL 933 als Positiv- und DH5 $\alpha$  als Negativkontrolle.

K255: GGT TGA GTC GAT TGA TCT CTG G

K260: GAG CGA ATA TTC CGA TAT CTG GTT

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 90s

Verlängerung: 60°C 60s

Polymerisation: 72°C 60s

Das hier erwartete Produkt war ein 405 Bp großes Verbindungsstück zwischen dem *selC*-Gen des *E. coli*-Chromosoms und LEE-spezifischen Sequenzen aus *E. coli* O157:H7. Es dienten wieder EDL 933 als Positiv- und DH5 $\alpha$  als Negativkontrolle.

*espI*-PCR:

*espI* 1: ATG GAC AGA GTG GAG ACA G

*espI* 2: GCC ACC TTT ATT CTC ACC A

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 30s

Verlängerung: 52°C 60s

Polymerisation: 72°C 60s

Das hier erwartete Produkt war ein 560 Bp großes Teilstück innerhalb des *espI*-Gens.

*iha*-PCR:

*iha* 1: CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC

*iha* 2: GTA TGG CTC TGA TGC GAT G

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 30s

Verlängerung: 56°C 60s

Polymerisation: 72°C 90s

Das hier erwartete Produkt war ein 1306 Bp großes Teilstück innerhalb des *iha*-Gens. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich EDL933 verwendet, der das *iha*-Gen innerhalb der Pathogenitätsinsel TAI besitzt.

*btuB*-PCR:

btuB 1: GCC CCT TCC CAC TGT TTA CT

btuB 2: GGT ATT GAT TGA TGG AGT GCG

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 30s

Verlängerung: 55°C 60s

Polymerisation: 72°C 90s

Das hier erwartete Produkt war ein 1032 Bp großes Teilstück des *btuB*-Gens.

*espl-iha*-PCR:

espl B: GAG AAA GAC TGG AAA AAT CAA G

iha A: GGC AAG GAC AAC CCC ATC T

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 30s

Verlängerung: 54°C 60s

Polymerisation: 72°C 240s

Das hier erwartete Produkt war ein 3916 Bp großes Fragment vom Ende des *espl*-Gens bis zum Anfang des *iha*-Gens.

*iha-btuB*-PCR:

iha B: CTG GAT GGT GAT AAC AAA GG

btuB A: CGG AAA AGA GTA AAC AGT GG

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C 30s

Verlängerung: 54°C 60s

Polymerisation: 72°C 90s

Das hier erwartete Produkt war ein 1325 Bp großes Fragment vom Ende des *iha*-Gens bis zum Anfang des *btuB*-Gens.

### 3.2.9. DNA-DNA-Hybridisierung / Cosmid-Screening

Zur Identifizierung der Cosmidklone, die das fragliche Element enthielten, mußte ein Cosmid-Screening aller Cosmide aus der Genbank durchgeführt werden. Dazu wurde die Methode der DNA-DNA-Hybridisierung an Kolonieblots verwendet. Der verwendete DIG DNA Labeling and Detection Kit enthielt folgende Komponenten:

- Blocking Reagenz
- 10 x Hexanukleotid-Mix
- 10 x dNTP-Markierungsmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, DIG-dUTP)
- Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat vom Schaf (Fab-Fragmente)
- Kleniow-Enzym (2 Einheiten/µl)
- NBT (75mg/ml Nitroblue-Tetrazoliumsalz)
- X-Phosphat (50 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat, Toluidiniumsalz)

Außerdem wurden spezielle Puffer verwendet:

- 20 x SSC                      3,0 M NaCl  
   0,3 M Na-Citrat
- Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl  
   0,5 M NaOH
- Hybridisierungslösung: 5 x SSC  
   0,1 % N-Laurylsarcosin  
   0,2 % SDS  
   1 % Blocking-Reagenz
- Puffer I                        100 mM Tris HCl pH 7,5  
   150 mM NaCl
- Puffer II                        0,5 % Blocking-Reagenz in Puffer I
- Puffer III                        100 mM Tris/HCl pH 9,5  
   100 mM NaCl  
   50 mM MgCl<sub>2</sub>
- Substratlösung                10 ml Puffer III  
   45 µl NBT  
   35 µl X-Phosphat

### Transfer von DNA aus Bakterien-Kolonien auf Nylonmembranen

Von allen Platten der Genbank wurde ein Kolonieblot gefertigt, indem passend geschnittene, durchnummerierte Nylonmembranstücke luftblasenfrei auf die Platten gelegt wurden. Die Lage der Membran wurde durch Einstiche mit einer Kanüle markiert und nach 1 min Inkubationszeit wurde sie wieder von der Platte abgezogen. Zur Lyse der so transferierten Bakterien wurden die Membranstücke einer Behandlung mit Denaturierungslösung unterzogen, indem sie für dreimal 20 min auf damit getränkte Blotpapiere gelegt wurde. Ebenso wurde bei Behandlung mit einer Lösung aus 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl für 15 min vorgegangen. Die dann getrockneten Membranen wurden abschließend in 2 x SSC 5 min zur Entfernung der Zellreste gewaschen, dazu wurde die Membran gegebenenfalls auch vorsichtig mit sterilen Wattetupfern behandelt. Durch Behandlung der Membran im UV-DNA-Linker wurde die DNA schließlich fixiert.

### Herstellung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Zur Sondenherstellung wurde das Produkt der PCR-Primer K255 und K260 aus Agarosegelen aufgereinigt (s. 3.2.5.) und mit Digoxigenin markiert. Hierzu wurden etwa 10 µg DNA durch zehnminütiges Aufkochen im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis inkubiert. Je 10 µl Hexanukleotide, 10 µl dNTP-Markierungsmix und 10 Einheiten Klenow-Enzym wurden zugegeben, der Ansatz auf 100 µl mit Lichrosolv ergänzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels 10 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und die DNA mit 12,5 µl 4 M LiCl und 375 µl vorgekühltem Ethanol abs. bei - 80°C für mindestens 1 h gefällt. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation bei 20000 g und 4°C für 30 min abgetrennt, mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl TE Puffer gelöst.

### Hybridisierung und Detektion der Hybride

Die Hybridisierung erfolgte in verschweißten Hybridisierungsbeuteln im temperierten Wasserbad unter leichtem Schütteln. Zuerst wurden die Membranstücke zur Absättigung freier Bindungsstellen in Hybridisierungslösung für 1 h bei etwa 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Sonde, die durch Aufkochen im Wasserbad denaturiert und mit frischer Hybridisierungslösung 1:1000 verdünnt war, zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte dann bei 60°C über Nacht.

Es erfolgte dann ein erster Waschschrift in einer Lösung aus 2 x SSC und 0,1 % SDS. Der darauffolgende spezifische Waschschrift erfolgte für 95 %ige Homologie mit einer Lösung aus 0,03 x SSC und 0,1 % SDS für zweimal 15 min bei 60°C.

Zur Detektion der DNA-DNA-Hybride wurde die Membran zunächst 1 min in Puffer I, dann 30 min in Puffer II und nochmals 1 min in Puffer I gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit anti-Digoxigenin-AP-Konjugat, das 1:5000 in Puffer I verdünnt war, nicht gebundenes Konjugat wurde anschließend durch Waschen für zweimal 15 min in Puffer I entfernt. Alle diese Schritte erfolgten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Schließlich wurde die Membran in Puffer III 2 min equilibriert und im Dunkeln in Substratlösung bis zum Erscheinen der Positivkontrolle inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Waschen der Membran mit Leitungswasser abgestoppt.

### 3.2.10. Präparation von Kulturüberständen

Um extrazelluläre Proteine zu gewinnen, wurden die Bakterien unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Getestet wurden verschiedene Medien (s. 3.1.8.) bei verschiedenen Temperaturen (37, 25 und 42°C) und Wachstum im Schüttler oder stehend, ÜN oder bis zur exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} \approx 0,3$ ). War Wachstum zu erkennen, wurden die Zellen durch Zentrifugation (3500 x g, 4°C, 15 min) abgetrennt und die Überstände sterilfiltriert. Die Fällung konnte auf 2 Weisen geschehen:

Durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) in einer Endkonzentration von 10 % und Inkubation für mindestens 2 h auf Eis oder ÜN im Kühlschrank, konnten die Proteine durch Zentrifugation bei 4°C und 20000 x g für 30 min gefällt werden. Das erhaltene Präzipitat wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Um native Proteine zu gewinnen, wurde eine Fällung mit Ammoniumsulfat durchgeführt. Hierbei wurde dem Kulturüberstand bei 4 °C tropfenweise das gleiche Volumen gesättigte, kalte  $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung unter Rühren zugesetzt und für mindestens 1 h weitergerührt. Das entstandene Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g für 45 min abgetrennt und in PBS resuspendiert. Diese Lösung mußte mit Centricon-50-Konzentratoren entsalzt und ankonzentriert werden. Das Endvolumen der so gewonnenen Probe betrug etwa 0,2 % des ursprünglichen Kulturüberstandsvolumens. Sie wurde in Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung in Aktivitätstests gelagert.

### 3.2.11. Präparation von äußeren Membranen

Zur Isolierung der äußeren Membranen von *E.coli* wurde die Methode nach Achtman *et al.* [1983] angewendet. Hierzu wurden die Bakterien in 60 ml LB-Medium zur späten exponentiellen Phase kultiviert und bei 4°C mit 4000 x g in 15 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 4,5 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Durch Ultraschall für viermal 30 s mit je 10 s Pause auf Stufe 3 wurden die Zellen aufgebrochen. Noch intakte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 1300 x g für 20 min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde bei 4°C und 20000 x g für 60 min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in Lichrosolv aufgenommen. Diese Suspension wird mit dem achtfachen Volumen (1,2 ml) einer Detergentslösung aus 1,67 % N-Laurylsarcosin in 11,1 mM Tris/HCl pH 7,6 versetzt und 20 min bei RT belassen. Durch abschließende Ultrazentrifugation bei 20°C und 46000 x g für 90 min werden die unlöslichen äußeren Membranen sedimentiert und können in 50 µl Lichrosolv® aufgenommen werden.

### 3.2.12. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde das Gel- und Puffersystem nach Laemmli [1970] benutzt. Hierzu benötigt man folgende Lösungen:

Puffer T: 0,75 M Tris/HCl pH 8,8

Puffer S: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8

Stock 1: 44 % Acrylamid  
0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Stock 2: 33 % Acrylamid  
0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

APS: 1 % Ammoniumpersulfat

2 x Probenpuffer: 120 mM Tris/HCl pH 7,5  
20 % Glycerin  
4 % SDS  
10 % Mercaptoethanol  
0,002 % Bromphenolblau

Elektrodenpuffer: 192 mM Glycin  
 25 mM Tris  
 0,1 % SDS  
 pH 8,2

Färbelösung: 0,3 % Coomassie Brilliantblau R 250  
 45 % Methanol  
 9 % Eisessig

Entfärbelösung: 18 % Methanol  
 6 % Eisessig

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in vertikalen Flachgelen. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden Trenngele mit Acrylamid-Konzentrationen zwischen 8 % und 15 % gegossen. Dafür wurden für je zwei Gele der Größe 8 x 6 x 0,075 cm mit 5 cm hohem Trenngel folgende Lösungen zusammengegeben:

	Aq. dest.	Puffer T	10 % SDS	Stock 1
Trenngel 8 %	3,65 ml	7,0 ml	280 µl	2,6 ml
Trenngel 12 %	2,75 ml	7,0 ml	280 µl	3,5 ml
Trenngel 15 %	1,5 ml	7,0 ml	280 µl	4,7 ml

Die Polymerisation wurde gestartet durch Zugabe der Redoxkatalysatoren APS (355 µl) und TEMED (28 µl). Nach guter, aber vorsichtiger Durchmischung wurden 3,6 ml dieser Lösung luftblasenfrei zwischen 2 Glascheiben gegeben und unter Luftabschluß zur Polymerisation belassen.

Das darauf folgende Sammelgel enthielt immer eine Acrylamidkonzentration von 6 % und war etwa 1 cm hoch. Dafür wurden 5 ml Puffer S mit 3,5 ml Aqua dest., 2 ml Stock 2 und 100 µl 10 % SDS-Lösung gemischt und die Polymerisation mit 250 µl APS und 20 µl TEMED gestartet. Diese Lösung wurde über das bereits polymerisierte Trenngel geschichtet und mit einem Kamm versehen, der Probenaschen bildete und für Luftabschluß sorgte. Die Polymerisationsdauer betrug jeweils etwa 30 min.

Die Proteinproben wurden bis zu einem Endvolumen von max. 30 µl mit dem gleichen Volumen zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und durch zehnmütiges Kochen im Wasserbad denaturiert. So vorbereitet wurden sie auf das

Gel aufgetragen und bei konstantem Strom von 15 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Abschätzen der Proteinmassen wurde vorgefärbter SDS-PAGE-Größenstandard-Marker mit aufgetragen. Ein Lauf war beendet, wenn das Bromphenolblau der Probenpufferfront das Gelende erreicht hatte.

Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel etwa eine halbe Stunde unter leichtem Schütteln bei RT in der Färbelösung inkubiert. Wenn das Gel durchgefärbt war, erfolgte zur Differenzierung der Banden eine weitere Inkubation des Gels in der Entfärbelösung bis zur völligen Entfärbung des Gelhintergrundes.

### 3.2.13. Immunoblot

Nach der Methode von Towbin *et al.* [1979] wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose transferriert. Dazu waren folgende Puffer und Lösungen nötig:

Blotpuffer:	192 mM Glycin
	25 mM Tris
	20 % Methanol
PBS-Tween:	0,05 % Tween-20
	in 1 x PBS (s.3.1.9)
POX-Substratlösung:	0,08 % 3,3-Diaminobenzidin-4-hydrochlorid
	0,04 % NiCl <sub>2</sub>
	0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	ad 100ml 1 x PBS

Das SDS-PAG wird in Blotpuffer für etwa 10 min äquilibriert, auch 2 Blatt Blotpapier und die NC-Membran werden darin angefeuchtet. Zwischen den beiden Blatt Blotpapier werden das Gel und die Membran luftblasenfrei so in die Mini Trans-Blot Zelle eingelegt, dass die Membran auf der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite liegt. Die Kammer wird mit Blotpuffer gefüllt und ein konstanter Strom von 15 mA angelegt. Der dadurch erfolgende Transfer der negativ geladenen Proteinmoleküle aus dem Gel auf die Membran war nach etwa 2 h abgeschlossen. Dann wurde die Membran für 1 h in PBS-Tween unter leichtem Schütteln auf der Diffusions-Entfärbeapparatur bei RT inkubiert. Anhand des vorgefärbten Proteingrößenstandards konnte beurteilt werden, ob der Transfer abgeschlossen

oder zu weit gegangen war. Es kann vorkommen, dass große Proteine nicht geblottet werden oder die Proteine durch die Membran hindurch laufen.

Bei effektivem Transfer auf die Membran erfolgte die Färbung. Dazu wird die NC-Membran zunächst im gewünschten Antiserum für 16 h (ÜN) bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen für dreimal 10 min in PBS-Tween entfernt. Die anschließende Inkubation mit dem POX-konjugierten Antikörper, der in entsprechender Verdünnung in PBS-Tween eingesetzt wurde, dauerte 2 h. Nicht gebundenes Konjugat wurde ebenfalls durch Waschen für dreimal 10 min in PBS-Tween entfernt. Die Inkubation mit der POX-Substratlösung erfolgte bis zum Erscheinen der Banden (der Positivkontrolle). Diese Reaktion wurde durch Waschen des Blots mit Aqua dest. abgestoppt.

#### **3.2.14. N-terminale Aminosäure-Sequenzierung**

Blot-Puffer:            35 mM CAPS pH 10,0  
                             0,75 mM 3-Methylpropionsäure  
                             0,1 % SDS  
                             30 % Methanol

Die Sequenzierungen wurden im Labor von Prof. Dr. J. Hoppe am Lehrstuhl für physiologische Chemie II der Universität Würzburg durchgeführt.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.2.12.). Im Semi-Dry Verfahren wurde das Gel innerhalb von 2 h mit einem konstanten Strom von 65 mA auf SELEX-Membranen geblottet. Die Membranen wurden mit Coomassie gefärbt und die interessierenden Banden ausgeschnitten. Die so vorbereiteten Proben wurden einem automatisierten, schrittweisen Edmann-Abbau unterzogen. Dies erfolgte mit einem Applied Biosystems Aminosäure-Sequenzierer, Modell 476A. Anhand eines Standardgemisches konnten dadurch die N-terminalen Aminosäure-Sequenzen bestimmt werden.

### 3.2.15. Protease-Aktivitätstests

#### 3.2.15.1. IgA-Protease-Test

Es wurden 2 µg Kollostrum-IgA mit etwa 5 µg nativem Espl gemischt und der Ansatz mit einfach konzentrierter PBS (s. 3.1.9.) auf 10 µl ergänzt. Parallel wurden als Positivkontrolle 0,2 µg *Neisseria gonorrhoeae* IgA1-Protease statt Espl und als Negativkontrolle die der Espl-Menge entsprechende Menge Vektorpräparation bzw. nur IgA1 eingesetzt. Die Ansätze wurden für 16 bis 20 h (ÜN) bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit 10 µl zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (s. 3.2.12.).

#### 3.2.15.2. Zymogram Gele

Es handelte sich hier um käuflich zu erwerbende native Tris-Glycin-Gele, die Casein bzw. Gelatine enthielten und zur Detektion von Metalloproteinasen, Kollagenasen und verschiedenen anderen Proteasen dienten.

Zymogram-Gelatine-Gel:	10 % Tris-Glycin-Gel
Substrat:	0,1 % Gelatine
Untere Nachweisgrenze:	10 <sup>-6</sup> Einheiten Kollagenase
Zymogram-Casein-Gel:	12 % Tris-Glycin-Gel
Substrat:	β-Casein
Untere Nachweisgrenze:	7 x 10 <sup>-4</sup> Einheiten Trypsin
Tris-Glycin SDS Probenpuffer:	125 mM Tris
(2 x)	0,005 % Bromphenolblau
	16 % Glycerin
	4 % SDS
Tris-Glycin SDS Laufpuffer:	1,92 M Glycin
(10 x)	0,25 M Tris
	1 % SDS
	Aqua dest. ad 1 l, pH des 1 x Puffers: 8,3
Renaturierungspuffer:	25 % Triton X-100
(10 x)	in Aqua dest.

---

Entwicklungspuffer:	0,5 M Tris
(10 x)	0,4 M HCl
	1,5 M NaCl
	0,1 M CaCl <sub>2</sub>
	0,2 % Brij 35
	Aqua dest. ad 1 l

3 µl Espl- Präparation, entsprechend 5 µg Espl wurden mit dem gleichen Volumen Tris-Glycin SDS Probenpuffer (2 x) versetzt und für 10 min bei RT stehen lassen. In gleicher Weise wurden Negativkontrollen mit der Vektorpräparation und Positivkontrollen mit 10 ng Kollagenase Typ VI bzw. mit 50 ng Trypsin angesetzt. Die Proben wurden in die Probenslots der Gele gegeben, in leere Slots wurde reiner Probenpuffer gegeben, um eine einheitliche Lauffront zu erhalten. Nach den Angaben des Herstellers wurde das Gel in einfach konzentriertem Laufpuffer bei konstanter Spannung von 125 V gefahren, wobei die Lauffront nach etwa 1,5 h am unteren Ende des Gels angelangt ist. Jedes Gel wurde für 30 min in 100 ml einfach konzentriertem Renaturierungspuffer unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Danach wurden die Gele jeweils in 100 ml einfach konzentriertem Entwicklungspuffer für 30 min unter leichtem Schütteln equilibriert und danach in frischem Entwicklungspuffer zum Erreichen der unteren Nachweisgrenze ÜN bei 37°C inkubiert. Die Färbe- und Entfärbeschritte sind gleich denen bei gewöhnlicher SDS-PAGE. Protease-Banden sind als klare Banden vor durchgefärbtem, blauen Hintergrund zu erkennen.

### **3.2.15.3. Spaltung von Plasmaproteinen und anderen Proteinsubstraten**

5 µg natives Espl wurden mit 1 µl Citratplasma bzw. 10 µg - 30 µg der zu testenden Proteinsubstrate versetzt und mit 1 x PBS auf 10 µl ergänzt. Diese Ansätze wurden nach guter Durchmischung ÜN bei 37°C inkubiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung teilweise zusätzlich durch Immunoblot. Als Vergleich wurde jeweils ein Ansatz nur mit Substrat bzw. Citratplasma und PBS und ein Ansatz mit einer Vektorpräparation anstelle von Espl auf Proteaseaktivität untersucht. Als Substrate dienten Hämoglobin, α2-Makroglobulin, Haptoglobin, Thrombin, Lactoferrin, Transferrin, BSA, Kollagenase

Typ 3, Trypsin, HDL, LDL, VLDL, Gerinnungsfaktor V, Pepsin und Apolipoprotein A1. Es handelt sich hier um eine Auswahl von Serumproteinen, Blut-Lipoproteinen und Standardproteinen, die zur Testung geeignet erschienen.

#### **3.2.15.4. Inhibition der Protease-Aktivität**

Zur näheren Charakterisierung der Proteaseaktivität wurde analogen Ansätzen zu 3.2.14.3. vor Auffüllen mit PBS Proteaseinhibitor zugesetzt. EDTA ist ein typischer Inhibitor für Metalloproteasen und PMSF für Serinproteasen. Es wurden also 10 µg Pepsin, 5 µg Espl und 1 µl 0,5 M EDTA-Lösung bzw. 1 µl 0,1 % PMSF-Lösung gemischt, mit PBS auf 10 µl ergänzt, inkubiert und analysiert. Da PMSF in Isopropanol gelöst wurde, wurde auch ein Kontrollansatz mit Isopropanol durchgeführt.

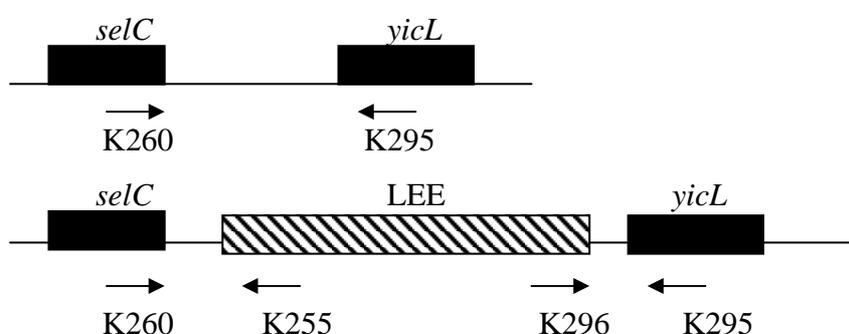
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung von *eae*-negativen STEC-Stämmen

Das für das Intimin kodierende *eae*-Gen ist Bestandteil der Pathogenitätsinsel LEE und wird bei 95 % der klinischen STEC-Isolate gefunden [Bockemühl 1997]. Im Rahmen der Routinediagnostik wurden am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg 35 STEC-Stämme isoliert, die *eae*-Gen negativ waren. Um zu überprüfen, ob bei diesen Isolaten lediglich das *eae*-Gen oder der komplette LEE in fehlte, wurden zunächst mit allen Stämmen PCR-Analysen auf das Vorkommen weiterer LEE-spezifischer Gene (*escF*, *escC*, *pas*) durchgeführt. Die Spezifität der PCR-Reaktionen wurde mit dem STEC-Stamm EDL 933 überprüft. In keinem der untersuchten *eae*-negativen STEC-Stämmen konnte mittels PCR *escF*, *escC* und *pas* nachgewiesen werden.

### 4.2. Analyse der Randbereiche von *se/C* in STEC-Stämmen

Um die Randbereiche von *se/C* zu analysieren, wurden eine von Wieler et al. (1997) pulizierte PCR-Strategie verwendet. Hierbei bestehen die Primer aus Sequenzen, die komplementär sind zu Sequenzen des LEE bzw. des K-12-Genoms. Die Position der Primer ist in Abb. 5 skizziert. Mit diesen Primern erhielten wir in dem LEE-positiven *E. coli*-Stamm EDL 933 die jeweils erwarteten Amplifikate, während die PCR-Reaktionen mit dem *E. coli* K-12 Stamm negativ ausfielen.



**Abb. 5: Amplifikationsschema zur Detektion LEE-spezifischer DNA im *selC* tRNA-Lokus.** Primer K 260 bindet direkt stromaufwärts von *selC*, Primer K 295 ist komplementär zur Sequenz des chromosomalen *yicL* Gens, was zu einem Amplifikat von 2173 bp bei unbesetztem *selC* tRNA-Lokus führt. Primer K 255 und K 296 sind spezifisch für die links- bzw. rechtsseitige Grenze des LEE und führen bei LEE-spezifischen Sequenzen mit K 260 bzw. K 295 zu 418 bp- bzw. 405 bp großen PCR-Produkten.

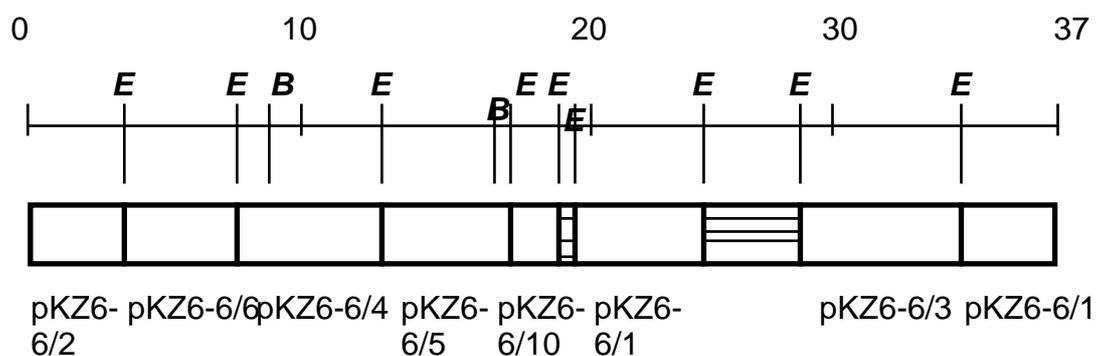
Von den 35 STEC-Stämmen lieferten 12 Stämme mit den Primern K 260 und K 295 ein PCR-Produkt. Bei weiteren 13 STEC-Stämmen waren alle PCR-Analysen negativ. Zehn Stämme zeigten mit den Primern K 260 und K 255 ein PCR-Produkt (s. Tab. 2)

Stamm	Serogruppe	Reaktionsausfall mit Primerkombination		
		K 295 - K 260	K 255 - K 260	K 296 - K 295
3115/97	O128:H2	-	+	-
3172/97	O128:H2	-	+	-
2455/99	O128:H2	-	+	-
3117/98	O128:H-	-	+	-
4736/98	O128:H-	-	+	-
0653/99	O128:HNT	-	+	-
3937/97	O62:H-	-	+	-
4789/97	O96:H-	-	+	-
4797/97	O91H-	-	+	-
4941/97	ONT:H-	-	+	-
3600/97	O128:H2	-	-	-
6481/96	ONT:H-	-	-	-
808/97	ONT:H8	-	-	-
4595/97	O62:H-	-	-	-
4789/97a	O75:H21	-	-	-
4735/98	O91H-	-	-	-
4631/97	Orah:H-	-	-	-
5300/98		-	-	-
0165/00	O146:HNT	-	-	-
0120/00	O146:HNT	-	-	-
24196/97	ONT:H-	-	-	-
6451/98	O16:H48	-	-	-
5293/98		-	-	-
6480/96	O8:H-	+	-	-
4828/97	O40:H-	+	-	-
3143/97	O22:H8	+	-	-
3171/97	O128:H2	+	-	-
1060/98	O113:H-	+	-	-
1823/98	O113:H-	+	-	-
4756/98	O70:H-	+	-	-
3199/98	O40:H6	+	-	-
5299/98		+	-	-
0519/99	Orah:HNT	+	-	-
0520/99	O16:H32	+	-	-
0521/99	Orah:H19	+	-	-

Tab. 2: Ergebnisse der PCR-Reaktionen der 35 untersuchten STEC-Stämme mit den Primerkombinationen K 260 / K 295, K 260 / K 255 und K 296 / K 295.

### 4.3. Klonierung von Restriktionsfragmenten

Aus einer aus 900 Cosmiden bestehenden Genbank des *eae*-negativen Stammes 4797/97 konnten mit Hilfe von PCR-Reaktionen unter Verwendung der Primer K 255 und K 260 zwei Cosmide identifiziert werden, die die gewünschten PCR-Produkte lieferten. Zur weiteren Subklonierung und Sequenzierung wurde der Klon pKZ6-6 verwendet. Die Subklone wurden durch einen Restriktionsverdau der Cosmid-DNA mit *EcoRI* gewonnen (Abb. 6). In den Bereichen, in denen die Subklone nicht überlappten, wurde die Cosmid-DNA des Klons pKZ6-6 direkt mit internen Primern sequenziert. Auf diese Weise wurde aus dem *E. coli* O91:H-Stamm 4797/97 eine Region von 37710 bp sequenziert.



**Abb. 6: Schema zur Sequenzierung der bei 4797/97 in *selC* inserierten Fremd-DNA.** Restriktionsschnittstellen und die entsprechenden Sequenzierungs-Subklone sind eingezeichnet, gestrichelt die Stellen, wo Cosmid-DNA mit internen Primern sequenziert wurde.

### 4.4. Bestimmung der vollständigen DNA-Sequenz einer neuen Pathogenitätsinsel

Die computergestützte Analyse der erhaltenen Sequenzen (s. 3.2.7.) ergab 30 offene Leserahmen (ORF), die jeweils eine potentielle Ribosomenbindungsstelle aufwiesen. Die Länge der Leserahmen variierte zwischen 95 und 4092 bp (Tab. 3). Die Transkriptionsrichtungen der einzelnen ORF sind entweder direkt oder komplementär. Dies unterstreicht den mosaikhaften Charakter der Region. Zu Beginn der Sequenz wurden hohe Homologien zu der publizierten Sequenz des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 gefunden [Blattner *et al.*, 1997]. So wurden für Position 1-1205 und 1205-2654 eine Identität von 99,8 % und 100 % zum 5'-Ende des *yicI*-

und dem folgenden *yicJ*-Gen gefunden. Darauf folgt ein Gen aus 95 bp, das identisch mit *selC* aus *E. coli* K-12 ist. Weitere 15 bp stromabwärts von *selC* bricht die Homologie zu *E. coli* K-12 ab und bei Basenpaar 3000 liegt der Insertionspunkt für diese Fremd-DNA. Ihr 3'-Ende liegt bei Basenpaar 36014. Zwischen den Basenpaaren 36014 und 36390 findet man einen am 5'-Ende unvollständigen ORF mit völliger Identität zum 3'-Ende des *yicK*-Gens. Diesem folgt ein 924 bp ORF, der nahezu identisch mit *yicL* ist und ein am 3'-Ende unvollständiger ORF mit fast völliger Identität zum *nlpA*-Gen, das ebenfalls wie die vorherigen von *E. coli* K-12 stammt. Der Vergleich der Sequenzen aus *E. coli* O91:H<sup>-</sup>Stamm 4797/97 und *E. coli* K-12 zeigt, dass sich, flankiert von den Basenpaaren 3000 und 36013 ein 33014 bp großes Segment fremder DNA erstreckt. Sein G+C-Gehalt liegt mit 47,4 % etwas niedriger als der von *E. coli* K-12 (50 %). Der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Bereich hat die typischen Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel:

Eine DNA-Region, meist mit tRNA Genen assoziiert, die 20 – 200 kb Länge aufweist. Sie kodiert für einen oder mehrere Pathogenitätsfaktoren und kommt nur bei pathogenen, nicht bei apathogenen Bakterien vor. Oft wird der Bereich flankiert von *direct repeats* und zeigt einen anderen G+C-Gehalt und eine andere Kodierung zwischen Basen und Aminosäuren (*codon usage*).

Wir haben diese Pathogenitätsinsel "Locus of Protease Activity and Adhesion" (LPA), genannt. Die komplette Sequenz wurde der EMBL Datenbank übermittelt. Die Sequenz wird dort unter der Zugangsnummer AJ278144 geführt.

Der erste Leserahmen am 5'-Ende dieses Fragmentes erstreckt sich von Position 3284 bis 4468 und zeigt eine Homologie von bis zu 99 % zu Integrasen der CP4-Phagenfamilie. Hierbei weist die DNA die größte Homologie zu einer Integrase von *Sigella flexneri* auf. Diese ist ein Bestandteil der von Takao *et al.* [1988] beschriebenen Pathogenitätsinsel SHI-2. Über den ersten Leserahmen hinaus bis zu Position 4764 ab dem *selC*-Gen ist eine Homologie zur entsprechenden Region von SHI-2 zu finden, die dann abrupt abbricht. Stromabwärts des *int*-Gen besteht zusätzlich eine hohe Homologie zu dem LEE des *E. coli* Stammes EDL 933 [Perna *et al.*, 1998]. Der Leserahmen L05 kodiert für ein putatives Protein von 293 Aminosäuren. Auf Nukleotidebene findet sich zwar eine recht hohe Sequenzhomologie (88 %) zu einem Plasmid mit unbekannter Funktion aus enteroaggregativen *E. coli* [Nataro *et al.*, 1993], allerdings gilt dies nicht für den gesamten Leserahmen, sondern nur für den von den Basenpaaren 5195 und 5497 flankierten Bereich. Dagegen zeigt das putative Protein von L05 eine Identität von

61 % zu einem hypothetischen 48,2 kDa Protein aus IS2 von *E.coli* (Zugangsnr. P51026), von 56 % zu einer Transposase aus einem IS2-ähnlichen Element von *Burkholderia glumae* (Zugangsnr. AB011023) und von 55 % zu *tnpA*, einer putativen Transposase von IS1087 von *Ralstonia sp.*, Stamm CH34 [Tibazarwa *et al.*, 2000] (Zugangsnr. AJ243722).

Der Leserahmen L06 kann für ein Protein von 131 Aminosäuren kodieren und zeigt auf dieser Ebene zu den gleichen Proteinen Sequenzhomologien wie L05 (76 %, 61 % und 66 %), allerdings mehr in den C-terminalen Bereichen.

Der folgende, von den Basenpaaren 6039 und 7370 flankierte Bereich ist zu 97,8 % identisch zu IS2 aus *E. coli* K-12-Stamm MG1655. Allerdings findet sich in dem Bereich nur ein offener Leserahmen L07. Dessen putatives Protein zeigt eine Sequenzidentität von 97,9 % zum hypothetischen 34,4 kDa-Protein von *E. coli* K-12 aus dem Bereich von IS2. Zwischen den Basenpaaren 8580 und 11021 erstreckt sich ein Bereich, der zu 99,8 % identisch zu einer Sequenz aus dem LEE von EDL 933 (Zugangsnr. AF071034) ist, die Teil der 933L Prophagen-Sequenz ist [Perna *et al.*, 1998]. In diesem Bereich sind 3 ORF zu finden, L09 zwischen 8616 und 10145, L10 zwischen 10204 und 10928 und L11 zwischen 10548 und 10928, die ebenfalls in der Sequenz des 933L Prophagen vorkommen. Die Homologien der abgeleiteten Proteine für L09 und L10 liegen jeweils bei 100 % und bei 89,9 % für das Protein von L11 zu den entsprechenden Proteinen des 933L Prophagen. Bisher sind keine Funktionen für diese hypothetischen Proteine beschrieben.

	Richtung	Position	Homologie zu	in %	Zugangsnr. [EMBL]
L01	K	1-1205	<i>yicI</i> , putative Permease	99,8	AE000443
L02	K	1215-2654	<i>yicJ</i> , putative Permease	100	AE000443
L03	D	2889-2983	<i>selC</i> , tRNA-Gen	100	Y00299
L04	D	3284-4468	<i>int</i> , CP4 Integrase	99	AF071034
L05	K	4802-5683	EAEC Sequenz	88	Z32523 P51026
L06	K	5641-6036	AS: 48,2 kDa Protein aus IS2	76	P51026
L07	D	6567-7358	ORF von IS2	97,9	AE000386 P19777
L08	K	7941-8315	--	--	--
L09	K	8616-10154	L0015, <i>E.coli</i> O157:H7	99	AAC31494 AF071034
L10	K	10204-10551	L0014, <i>E.coli</i> O157:H7	100	AF071034
L11	K	10548-10928	L0013, <i>E.coli</i> O157:H7	99	AAC31492.1
L12	K	11248-153339	<i>espP</i> , <i>E.coli</i> O157:H7 Protease AS: SepA, <i>S. flexneri</i> - Protease	94 51	AF074613 S57664
L13	K	15774-15589	--	--	--
L14	K	16252-16989	AS: Regulator vom <i>araC</i> -Typ	38	AAC74572
L15	K	17164-17316	TAI-Insell	94	AF215931
L16	D	17821-19908	<i>ihaA</i> , Adhesin von <i>E.coli</i> O157:H7	93,5	AF126104
L17	K	20254-22098	<i>btuB</i> , Vit. B12-Rezeptor AS: BtuB aus <i>S.typhimurium</i>	78-86 80	AE000471 P06129
L18	K	23467-24498	AS: GntR aus <i>E.coli</i>	32	AE000420
L19	D	24769-25212	AS: Mannitol-spezifische Phosphotransferase Enzym-II Komponente A	42	P32058
L20	D	25228-25515	AS: Unbekanntes Phosphotransferase-System Enzym-II KomponenteB	26	P39302
L21	D	25528-26784	AS: SgaT aus <i>E.coli</i> / PMIP aus <i>Streptomyces coelicor</i>	41	P39301
L22	D	27457-27771	<i>S.flexneri</i> Invasionsplasmid	95	SFU28354
L23	K	28273-29424	R0046/ IS30 Transposase	100	AF250878
L24	D	30274-31815	AS: ORF1, Transposase-Untereinheit von <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	50,5	AAB48471
L25	D	31827-32576	AS: ORF2, Transposase-Untereinheit von <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	42	AAC45210
L26	K	33472-34089	SauE4.E10 (Sequenz von <i>E.coli</i> - Stamm aus Neugeborenen Meningitis)	96	AF222142
L27	K	35261-35764	<i>insB</i> , IS1	99,8	U18997 P03830
L28	D	36014-36390	<i>yicK</i> , putative Permease	100	AE000443 P31436
L29	D	36390-37313	<i>yicL</i> , putative Permease	99	AE000443
L30	D	37318-37711	<i>nlpA</i>	99	AE000443

**Tab. 3: Homologien von L01-L30 zu Gensequenzen der EMBL-Datenbank.** D: direkt K: komplementär (Transkriptionsrichtung); AS: Homologien auf Aminosäure-Ebene. Diese sind angegeben, wenn auf Nukleotid-Ebene keine signifikanten Homologien gefunden wurden oder die Homologien auf AS-Ebene andere sind. Die Angabe von 2 verschiedenen Zugangsnummern bedeutet, dass die signifikanten Identitäten auch auf AS-Ebene vorkommen.

Auf dem Gegenstrang konnte, flankiert von den Basenpaaren 11248 und 15339 mit 4092 bp der größte ORF L12 von LPA gefunden werden. Er könnte ein Protein aus 1364 Aminosäuren kodieren und weist 6 bp stromaufwärts vom ATG Startcodon seine putative Ribosomenbindungsstelle mit der Sequenz 5'-CAGG-3' auf. Am 3'-Ende über die letzten 843 bp (Basenpaar 14497-15339, bzw. 3250-4092 im Gen) zeigt sich eine 94 %ige Homologie zu der entsprechenden Region aus *espP* [Burland *et al.*, 1988]. Nach der Übersetzung der Gensequenz in das abgeleitete Protein fand sich die höchste Homologie mit 50 % Identität zum IgA-spezifischen Metalloendopeptidase-Vorläufer von *sepA* von *Shigella flexneri* [Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995]. Andere Homologien sind zu finden mit 50 % Sequenzidentität zur Mucinase aus *S. flexneri* [Henderson *et al.*, 1999], 47 % zu EspP aus *E. coli* O157:H7 [Brunder *et al.*, 1997], 42 % zu Tsh eines vogelpathogenen *E. coli* [Dozois *et al.*, 2000] und 42 % zu SigA aus *S. flexneri* [Rajakumar *et al.*, 1997]. Die gefundenen Homologien zu diesen verschiedenen Serin-Proteasen legen den Schluß nahe, dass es sich bei L12 um ein Gen handelt, das ebenfalls für eine Serin-Protease kodiert. Um dies näher zu analysieren, wurden Sequenzmotive gesucht, die spezifisch für die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind. Das von Bachovchin *et al.* beschriebene Sequenzmotiv G-D-S-G-S-P-L-F [1990] kommt an Position 702-708 vor. Es ist identisch mit den entsprechenden Teilen der katalytischen Seite der anderen Serin-Proteasen und weist S-706 als aktives Serin auf. Die Methode von Hejines [1986] sagte eine potentielle Signal-Sequenz-Schnittstelle an Position 54 voraus. Mit geringerer Wahrscheinlichkeit wird eine Schnittstelle an Position 53 vorausgesagt, die zu einem Signalpeptid beginnend mit einem Serinrest führen sollte. Dies konnte durch eine N-terminale Aminosäure-Sequenzierung bestätigt werden (siehe 4.6.3.). Das resultierende Protein von 1312 Aminosäuren hätte ein kalkuliertes Molekulargewicht von 140,7 kDa. Die hohe Sequenzhomologie zum SepA-Protein und auf genetischer Ebene vor allem zum 3'-Ende von *espP* spricht dafür, dass im vorausgesagten Produkt von L12 ebenfalls eine Schnittstelle für einen Translokator in der äußeren Membran vorliegt. In SepA ist diese Stelle zwischen den Argininresten N-1089 und N-1090 lokalisiert. Die entsprechende Stelle findet sich in der auf Proteinebene übersetzten Sequenz zu L12 zwischen N-1086 und N-1087. Auch das carboxyterminale Schnittstellen-Sequenzmotiv der Helferdomäne, K-R-M-G-D-L-R, ist an Position 1090-1096 vorhanden. Dies konnte ebenfalls durch eine N-terminale Aminosäure-Sequenzierung bestätigt werden (siehe 4.6.3.). Das verbleibende aktive Protein hätte ein Molekulargewicht von 110,5 kDa. Aufgrund der

hohen Homologie auch zu EspP von *E. coli* O157:H7 wurde der Name EspI als „*E. coli* secreted protein, das auf einer Insel kodiert ist“, für diese putative Protease gewählt.

L13 zeigte weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäure-Ebene Homologien zu bekannten Sequenzen. Auch der folgende ORF, L14 zeigte keine Homologien zu bekannten Genen. Die Übersetzung dieser Sequenz in ein putatives Protein lässt allerdings eine Homologie von 38 % zu einem hypothetischen transkriptionellen Regulator aus *E. coli* K-12 (Zug.nr.: AE000247) [Blattner *et al.*, 1997] erkennen.

Die Leserahmen L15 und L16 weisen hohe Sequenzhomologie zu einer chromosomalen Insel von *E. coli* O157:H7 Stamm 86-24 auf. Für den L15 entsprechenden ORF ist bisher keine Funktion bekannt, L16 zeigt jedoch 93,5 % Homologie zum kompletten *iha*-Gen, dessen Produkt *E. coli* O157:H7 Adhäsion zu Epithelzellen verleiht [Tarr *et al.*, 2000]. Auch der Bereich zwischen diesen beiden ORF zeigt 91 % Nukleotidsequenzidentität zu der *iha*-assoziierten Insel TAI (Zugangsnr. AF126104). Diese Insel wurde in der Arbeitsgruppe um Tarr erst kürzlich beschrieben [Tarr *et al.*, 2000], wobei TAI für "tellurite resistance- and adherence-conferring island" steht.

Auf dem Gegenstrang liegt L17, der für ein mögliches Protein von 69 kDa kodiert. Die Vergleiche mit Sequenzen der Datenbanken zeigen Sequenzhomologien von 78-86 % zu den *btuB*-Genen von *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, die für einen Vitamin B12-Rezeptor kodieren. Dabei waren die identischen Bereiche interessanter Weise nicht einheitlich über das gesamte Gen verteilt, sondern eher in einer mosaikhaften Struktur angeordnet, wobei sich Bereiche mit Homologie zu *E. coli* und *S. typhimurium* abwechselten. Nach der Übersetzung des ORF zum Protein zeigten sich hohe Aminosäure-Sequenzhomologien von 80 % zum Vitamin B12-Rezeptor von *S. typhimurium*, von 78 % zu dem von *E. coli* K-12 und von 77 % zu dem aus *Citrobacter freundii*. Auch direkt stromaufwärts von L18 fanden sich 300 bp, die hoch identisch zur *E.coli btuB* Promotor-Region (Zugangsnr. X17416) sind.

Das putative Protein von L18 aus 343 Aminosäureresten zeigte 32 % Sequenzhomologie zum GntR Proteinregulator des Gluconat (*gnt*-) Operons von *E. coli* (Zugangsnr. AE000420 und P46860).

Der ORF L19 kodiert für ein Protein aus 148 Aminosäureresten, das 42 % Sequenzidentität zu der Komponente A des Mannitol-spezifischen Phosphotransferase System-Enzyms-II aus *E. coli*. (Zugangsnr P32058 und S36122) besitzt.

Leserahmen L20 kodiert für ein Protein von 95 Aminosäuren. Hier ergeben sich 26 % Identität mit Komponente B eines unbekanntes Phosphotransferase System-Enzyms-II [Reizer *et al.*, 1996]. Von hier direkt in 3'-Richtung liegt L21, den man in ein Protein mit 419 Aminosäuren übersetzen kann. Dieses zeigt 41 % Sequenzhomologie zu einem putativen Transmembran-Protein aus *Streptomyces coelicolor* und zum SgaT Protein. Hierbei handelt es sich um ein putatives Transportprotein für das unbekanntes Pentitolsubstrat des *sga* Operons, das in der Cytoplasmamembran von *E. coli* lokalisiert ist [Reizer *et al.*, 1996].

Von den Basenpaaren 28264 bis 29486 wird ein Bereich flankiert, der eine 99,9 %ige Sequenzidentität zur *E. coli* MG1655 Sektion 389 (Position 953-2175 aus AE000499) zeigt. Diese Sektion trägt eine Insertionssequenz und auch in der Sequenz des LPA fanden sich jeweils zwischen den Basenpaaren 28264-28290 und 29441-29468 *inverted repeats* von 27bp. Auch stromaufwärts davon liegt mit L23 ein Gen, das identisch zum IS30 Transposase-Gen ist. Aus diesen Daten kann man schließen, dass es sich hier um ein intaktes Insertionselement der IS30 Familie handelt.

Des Weiteren ist festzustellen, dass dieses IS30 Element von DNA umgeben ist, die spezifisch für IS600 ist. Durch eine genauere Sequenzanalyse stellt sich heraus, dass die Sequenzen, die von den Basenpaaren 27939-28264 bzw. 29486-30081 flankiert werden, identisch zu IS600 sind. Ein dem 3'-Ende von IS600 entsprechender Bereich konnte jedoch nicht identifiziert werden. Damit sind etwa 200 bp dieses IS Elementes deletiert, IS30 ist nach dem Basenpaar 327 in IS600 inseriert.

Die Leserahmen L24 und L25 zeigen nach Übersetzung zur Proteinsequenz 50,5 % bzw. 42 % Sequenzidentität zu ORF1 und ORF2 aus dem *Pseudomonas alcaligenes* Transposon IS1491 [Yeo *et al.*, 1998].

Zwischen den Basenpaaren 32663 und 33013 gibt es ein Stück DNA, das praktisch identisch ist mit ORF B aus IS600 von *S. flexneri* (Zugangsnr. AF139596) und *tnpI* aus IS600 von *E. coli* (AF141323). Da allerdings die Homologie nur über einen kurzen Bereich auftritt und stromaufwärts von Basenpaar 33013 abbricht, ist hier wohl nur ein kleiner Teil des putativen Transposase-Gens vorhanden. Bei einer Übersetzung auf die Aminosäure-Ebene findet sich fast völlige Identität mit dem C-terminalen Teil des Proteins InsB von IS600 von *S. dysenteriae* (Zugangsnr. AF153317). Beim Übersetzen der stromaufwärts liegenden Sequenz bis Basenpaar 34069 ergeben sich 47 % Aminosäure-Identität zu Y4QE, einer putativen Transposase aus *Rhizobium sp.* (Zugangsnr. P55626).

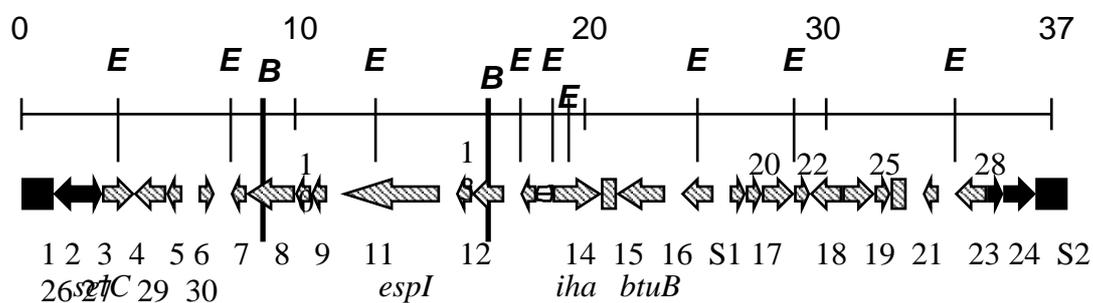
Von Basenpaar 35246 bis 36013 zeigt sich eine Homologie von 99,8 % zu IS1 aus *E.*

*coli*, was auch den Leserahmen L27 einschließt. Dessen abgeleitete Proteinsequenz zeigt ebenfalls eine 99 % Identität zu InsB aus *E. coli* [Ohtsubo & Ohtsubo, 1978]. Direkt stromaufwärts dieses Bereiches startet L28 bzw. *yick*, was wieder ein chromosomales K-12 Gen repräsentiert, das am 5'-Ende unterbrochen ist.

Außer den chromosomalen Genen (L01-L03 und L28-L30) liegen also im sequenzierten Bereich des Stammes 4797/97 überwiegend Transposasen, Integrasen (L05-L07 und L24-L27) und Prophagen (L04, L09-L11) vor. Es gibt ebenfalls ORFs, für die keine Homologien gefunden wurden (L08 und L13) und für die daher keine Bewertung erfolgen kann.

Für einige ORFs jedoch wurden signifikante Identitäten festgestellt (L12 und L14-L23) und es kann ihnen daher eine mögliche Wirkung zugesprochen werden. So kann vor allem für L12, L16 und L17 - eine Serin-Protease, ein Adhärenzvermittelndes Protein und ein Vitamin B12-Rezeptor - von putativen Virulenzgenen gesprochen werden.

Die Anordnung dieser Leserahmen zeigt Abbildung 7.



**Abb. 7: Strukturschema vom Locus of protease activity and adhesion (LPA) aus *E. coli* 4797/97.**

Die Pfeile geben die Größe, Anordnung und Richtung der entdeckten Leserahmen an, wobei zu ihrer Benennung einfach von 1 bis 30 durchnummeriert wurde und bekannte Gene unten benannt sind. Schwarze Bereiche stehen für das *E. coli* K12 Chromosom, diagonal schraffierte für signifikante Homologien mit bekannten Sequenzen, Kästen für intergenische Bereiche (S1 + S2) bzw. inkomplette Gene (1 + 30). **E** = *EcoR*1-Schnittstelle **B** = *Bam*H1-Schnittstelle zur Konstruktion des *espI*-Expressionsvektors

#### 4.5. Nachweis von LPA in klinischen STEC-Isolaten

Um die Prävalenz von LPA in klinischen STEC-Isolaten und anderen darmpathogenen *E.coli* zu untersuchen, wurden PCR-Analysen durchgeführt. Die Anordnung der verwendeten Primer ist Abbildung 8 zu entnehmen.

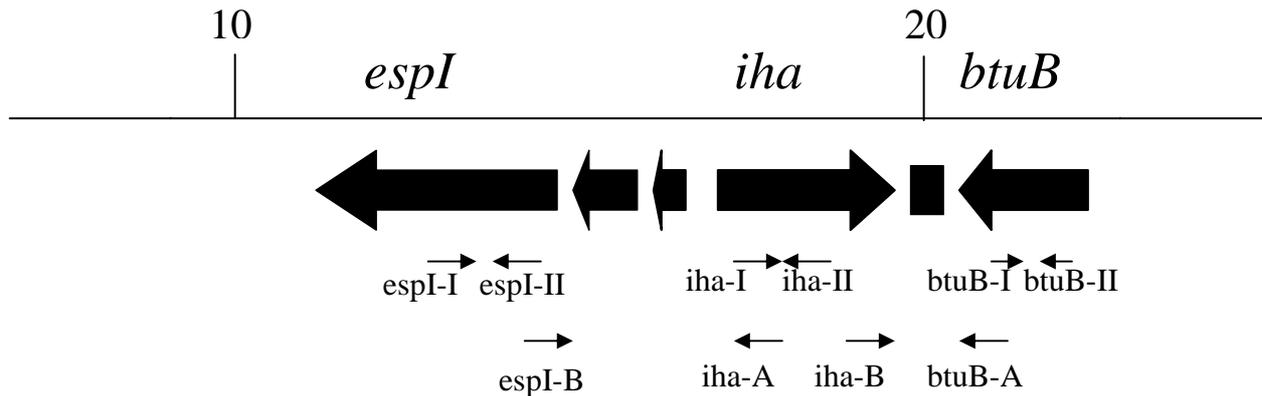


Abb. 8: Anordnungsschema der Primer zur Analyse des LPA in klinischen STEC-Isolaten

Die Spezifität der PCR-Analysen wurde mit *E. coli* 4797/97 als Positivkontrolle und dem Laborstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  als Negativkontrolle getestet. Die PCR-Untersuchungen zur Bestimmung der Anordnung der Gene wurden nur dann durchgeführt, wenn alle 3 Gene nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Verbreitung von LPA sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Stamm	Serogruppe	Reaktionsausfall mit der Primerkombination				
		espl-A espl-B	iha-A iha-B	btuB-A btuB-B	espl-B iha-A	iha-B btuB-A
4797/97	O91:H-	+	+	+	+	+
3115/97	O128:H2	+	+	+	+	+
3172/97	O128:H2	+	+	+	+	+
2455/99	O128:H2	+	+	+	+	+
3117/98	O128:H-	+	+	+	+	+
4736/98	O128:H-	+	+	+	+	+
0653/99	O128:Hnt	+	+	+	+	+
3937/97	O62:H-	+	+	+	+	+
4789/97	O96:H-	+	+	+	+	+
4941/97	NT:H-	+	+	+	+	+
DH5 $\alpha$		-	-	-	-	-

**Tab. 4: Untersuchung des LPA bei *eae*-negativen STEC**

Bei den in Tabelle 4 aufgeführten *eae*-negativen STEC-Stämmen konnten die Gene *espl*, *iha* und *btuB* nachgewiesen werden. Auch die Anordnung dieser Gene entspricht der in *E. coli* 4797/97.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen zum Vorkommen von *espl*, *iha* und *btuB* in anderen STEC und weiteren Pathogruppen von *E. coli* sind in Tabelle 5 dargestellt. Auffällig ist der häufige Nachweis von *iha* bei fehlendem Nachweis von *espl* und *btuB*.

Pathogruppe	Stamm	Serogruppe	Reaktionsausfall mit der Primerkombination			
			espl-A /espl-B	iha-A / iha-B	btuB-A /btuB-B	
STEC	EDL 933	O157:H7	-	+	-	
	3193/99	O157:H7	-	+	-	
	2696/99	O157:H-	-	+	-	
	0036/99	O157:H7	-	+	-	
	1193/89	O157:H-	-	+	-	
	866/99	O157:H7	-	+	-	
	1471/99	O157:H7	-	+	-	
	1940/99	O157:H7	-	+	-	
	1980/99	O157:H7	-	+	-	
	4309/99	O157:H-	-	+	-	
	STEC	ED142	O111:H-	-	+	-
		Hus 2/86	O111:H-	-	+	-
		1187/00	O111:H-	-	+	-
ED71		O111:H-	-	+	-	
ED31		O111:H-	-	+	-	
78/92		O111:H-	-	+	-	
1639/77		O111:H-	-	+	-	
2516/00		O111:H-	-	+	-	
3997/00		O111:H-	-	+	-	
6366/00		O111:H-	-	+	-	
STEC	2971/99	O26:H-	-	+	-	
	1531/99	O26:H11	-	+	-	
	0615/00	O26:H-	-	+	-	
	1150/00	O26:H-	-	+	-	
	3319/00	O26:H11	-	+	-	
	2971/99	O26:H-	-	+	-	
	2640/99	O26:H11	-	+	-	
	1530/00	O26:H11	-	+	-	
	1655/00	O26:H-	-	+	-	

Pathogruppe	Stamm	Serogruppe	Reaktionsausfall mit der Primerkombination		
			espl-A /espl-B	iha-A / iha-B	btuB-A /btuB-B
STEC	4210/98	O103:H-	-	-	-
	2969/99	O103:H2	-	-	-
	1557/00	O103:H2	-	-	-
	2576/97	O103:H2	-	-	-
	2636/97	O103:H-	-	-	-
	2791/97	O103:H-	-	-	-
	2491/99	O103:H2	-	-	-
	514/00	O103:H2	-	-	-
	2492/99	O103:H2	-	-	-
	3594/97	O103:H2	-	-	-
STEC	3517/99	O145:H-	-	+	-
	4557/99	O145:H-	-	+	-
	5122/99	O145:H-	-	+	-
	4557a/99	O145:H-	-	+	-
	3517/99	O145:H-	-	+	-
	3458/99	O145:H-	-	+	-
	3036/99	O145:H-	-	+	-
	2032/99	O145:H-	-	+	-
	488/99	O145:H-	-	+	-
	1695/00	O145:H-	-	+	-
EAEC	17/2	O3:H2	-	+	-
	4140/86	O44	-	-	-
	DEF40	O78	-	+	-
	DEF53	O11	+	+	-
	5464/95	O3:H2	-	+	-
	7484/94	O86:H18	-	-	-
	6324/94	O85:H-	-	-	-
	6175/94	O78:H11	-	+	-
	4185/95	O86:H11	-	-	-
	6771/95	O3:H-	-	+	-

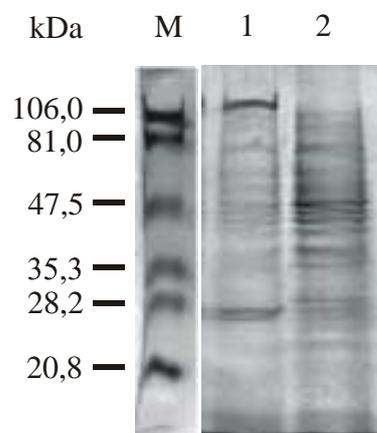
Pathogruppe	Stamm	Serogruppe	Reaktionsausfall mit der Primerkombination			
			espl-A /espl-B	iha-A / iha-B	btuB-A / btuB-B	
EIEC	12860	O124	-	+	-	
	76-5	O143	-	+	-	
	78-5	O124	-	-	-	
	107-11	O143	-	-	-	
	309-36/85	O145	-	+	-	
ETEC	117/86	O6:H-	-	-	-	
	147/1	O128:H-	-	-	-	
	297/87	O25:H42	-	-	-	
	Y1253	O147:H19:K88	-	-	-	
	H164/82	O148:H28	-	-	-	
	0149		-	+	-	
	RA0153		-	+	-	
	DN523		-	-	-	
	167/82	O9:H-	-	-	-	
	H529/89	O168:H-	-	-	-	
	EPEC	2348/69	O127:H6	-	-	-
		365/87	O111	-	-	-
		111/87	O111	-	-	-
3715/67		O127	-	-	-	
12810		O114:H2	-	-	-	
3206/87		O114	-	-	-	
3-2		O119	-	-	-	
6407/85		O119	-	-	-	
700-36/85		O55	-	-	-	
22CH		O55	-	-	-	
UPEC	20022	O6:K2	-	-	-	
	2715	O6:K13	-	-	-	
	21084	O6:K2	-	+	-	
	2698	O6:K13	-	+	-	
	21088	O1	-	+	-	
	2702	O18	-	+	-	
	20887	O18	-	+	-	
	2980	O18	-	+	-	
	20383	O18	-	+	-	
	2024	O6	-	+	-	

Tab. 5.: Vorkommen von LPA bei klinischen STEC und anderen darmpathogenen *E. coli*

## 4.6. Charakterisierung einer extrazellulären Serinprotease

### 4.6.1. Nachweis des sezernierten Proteins

Zur weiteren Untersuchung des Gens *espl* (L12) wurde ein 8023bp großes *Bam*H1-Fragment aus dem Cosmid pKZ6-6 isoliert und in den Vektor pK18 in den *E. coli*-Laborstamm DH5 $\alpha$  ligiert. Das neu entstandene Plasmid, das in Stamm DH5 $\alpha$  transformiert wurde, erhielt den Namen pZH4. Das in diesem Plasmid enthaltene *Bam*H1-Fragment ist in der Genkarte unter Abbildung 7 zu erkennen. Es enthält das gesamte zu untersuchende Gen mitsamt seiner Ribosomenbindungsstelle. Da auf Grund der gefundenen Homologien zu den sezernierten Proteasen davon ausgegangen werden konnte, dass es sich hier ebenfalls um ein extrazellulär sezerniertes Protein handelt, wurden zunächst mittels TCA gefällte Kulturüberstände (s. 3.2.9.) untersucht. Zum Vergleich wurden entsprechende Proteinprofile des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$ /pK18 verwendet.



**Abb. 9:** 12% SDS-PAGE von TCA-gefällten, sezernierten Proteinen aus LB-ÜN-Kulturen. M: Proteinengrößenmarker; 1: Proteinprofil DH5 $\alpha$ /pZH4; 2: Proteinprofil DH5 $\alpha$ /pK18

Im Kulturüberstand von *E. coli* DH5 $\alpha$ /pZH4 wurde ein Protein von etwa 110 kDa nachgewiesen, das bei dem *E. coli* Vergleichsstamm DH5 $\alpha$ /pK18 und *E. coli* DH5 $\alpha$  nicht zu sehen war (Abbildung 9). Ob es sich bei diesem Protein nun tatsächlich das Produkt des *espl*-Gens handelt, sollte durch eine N-terminale Aminosäuresequenzierung am aufgereinigten Protein untersucht werden (s. 4.6.3). Zu diesem Zweck wurden verschiedene Wachstumsversuche in Minimalmedien durchgeführt, um den Hintergrund des Proteingels zu minimieren und eine

genügende Menge Protein in hinreichend reiner Form zu erhalten (s. 3.1.8.). Allerdings erwies es sich in einigen Fällen als nicht möglich, den Stamm DH5 $\alpha$ /pZH4 in den verwendeten Minimalmedien anzuziehen. In denjenigen Versuchen, bei denen ein Wachstum stattfand, konnte keine Proteinexpression festgestellt werden. Auch Versuche, die Proteinexpression durch Induktion mit IPTG zu erhöhen (Abb. 10), gaben keinen Erfolg.



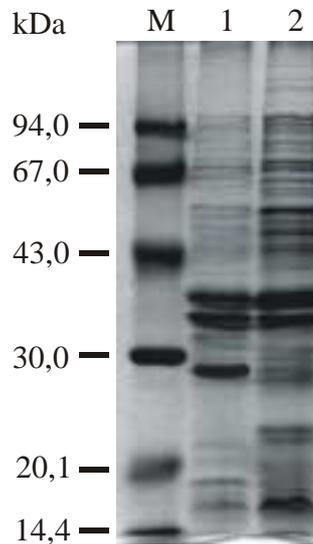
**Abb. 10: 12% SDS-PAGE zur Kontrolle der Proteinexpression IPTG-induzierter und normal wachsender DH5 $\alpha$ /pZH4-Kulturen im Vergleich.** M: Proteinleiter zum Größenvergleich. Ungerade Nummern: ohne Induktion, gerade Nummern: mit Induktion. Spur 1: Kultur nach  $t = 3,5\text{h}$ , OD 0,5. Spur 2+3: nach  $t+1\text{h}$ , Spur 4+5: nach  $t+2\text{h}$ , Spur 6+7: nach  $t+3\text{h}$ , Spur 8+9: nach  $t+4\text{h}$ .

Es konnte hierbei aber festgestellt werden, dass die Proteinexpression der natürlich produzierten Proteine mit zunehmender Wachstumszeit nicht im gleichen Maße stärker wird wie die des potentiellen Espl. Die relative Ausbeute an Espl in der Proteinpräparation scheint sich mit zunehmender Wachstumszeit zu verbessern. Also wurde zur Präparation von Espl mit Übernachtskulturen in LB gearbeitet.

#### 4.6.2. Nachweis der Abspaltung eines Translokators

Zwischen der Größe des ORF (4092bp), entsprechend einem 140,7 kDa-Protein und der Größe des gefundenen Proteins mit etwa 110 kDa plus einer 53 Aminosäuren großen Signalsequenz gibt es offensichtlich eine deutliche Diskrepanz. Um diese zu erklären, wurde nach einem Translokator gesucht. Dieser war aufgrund der Homologien zu anderen Proteasen, die in den meisten Fällen aus Signalsequenz, sezerniertem Protein und Translokator aufgebaut sind, bei Espl zu erwarten. Die für die SPATE-Familie (Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae) typische Schnittstelle zwischen sezerniertem Protein und Translokator war für die

übersetzte Proteinsequenz von *espl* vorhanden, was auf einen Translokator von 30,3 kDa Größe hinwies. Also wurden OMP-Präparationen auf ein etwa 30 kDa großes Protein hin untersucht.



**Abb. 11: 12 % SDS-PAG von OMP-Präparationen.** M: SDS-PAGE-Standard, nicht vorgefärbt; 1: DH5 $\alpha$ /pZH4; 2: DH5 $\alpha$ /pK18.

Das SDS-PAG in Abbildung 11 zeigt, dass im Vergleich zu dem Vektorkontrollstamm bei etwa 28 kDa ein zusätzliches oder verstärkt exprimiertes Protein nachgewiesen wird. Außerdem wird ein etwa 32 kDa großes protein gefunden, das bei der Kontrolle nicht zu sehen ist. Da beide Proteine nicht ganz der theoretischen Größe entsprechen, wurde für beide eine N-terminale Aminosäuresequenzierung durchgeführt (s. 4.6.3.).

#### 4.6.3. Aminosäuresequenzierung

durch eine N-terminale Aminosäuresequenzierung (s. 3.2.13.) wurde das unter 4.6.1. beschriebene 110 kDa große Protein als *Espl* identifiziert. Dabei ergab sich mit S-T-V-S-A-E-I-P-Y-Q genau die aufgrund der Gensequenz erwartete Aminosäuresequenz der ersten 10 Aminosäuren nach N-terminaler Abspaltung eines Signalpeptides an Position 53.

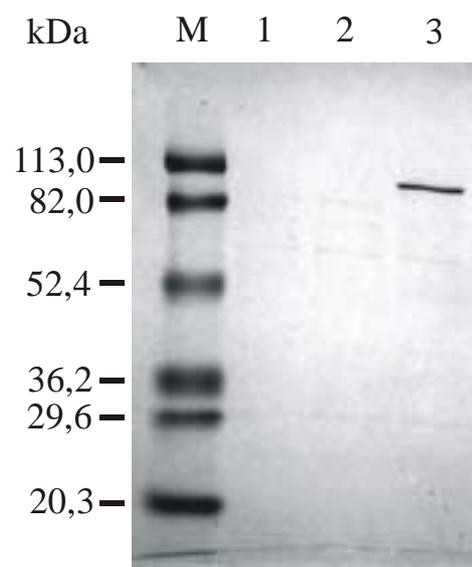
Die Ansequenzierung der stark ausgeprägten Bande bei etwa 28 kDa aus der OMP-Präparation ergab die Sequenz M-I-E-Q-D-G-L-H-A-G. Diese zeigt keine Homologien zu der aus der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz. Es stellte sich heraus,

dass es sich hier um die Kanamycin-Kinase des Vektors pK18 handelt. Die erhöhte Expression dieses Proteins in *E. coli* DH5 $\alpha$ /pZH4 gegenüber dem *E. coli* Vergleichsstamm DH5 $\alpha$ /pK18 kann durch eine Promotorwirkung des Inserts auf das nachfolgende Vektorprotein bewirkt werden.

Die N-terminale Aminosäuresequenz des scheinbar etwa 32 kDa großen Proteins (s. Abb. 11) wurde mit N-L-N-K-R-M-G-D-L bestimmt. Dies entspricht exakt der Sequenz des N-Terminus des Translokators von 30,3 kDa bei Bestätigung der vorausgesagten Schnittstelle. Die genaue Größe des sezernierten Proteins konnte somit auf 110,4 kDa determiniert werden.

#### 4.6.4. Untersuchungen zur Proteaseaktivität von EspI

Durch die Ergebnisse des Sequenzvergleiches und die so gefundenen Homologien zwischen EspI und IgA1-Proteasen lag es nahe, die Proteaseaktivität von EspI zu untersuchen (s. 3.2.14.). Dazu wurde natives EspI aus Kulturüberständen des Stammes DH5 $\alpha$ /pZH4 per Ammoniumsulfat-Fällung gewonnen und über Ultrafiltrationseinheiten angereichert (s. 3.2.9.) Dies führte zu einer sauberen Proteinpräparation von EspI (s. Abb. 12) .



**Abb. 12: 12 % SDS-PAGE einer EspI-Präparation zum Einsatz in Aktivitätstests.** M: Proteingrößenstandard, 1: DH5 $\alpha$ -Überstand, 2 = DH5 $\alpha$ /pK18-Überstand, 3 = DH5 $\alpha$ /pZH4-Überstand (EspI)

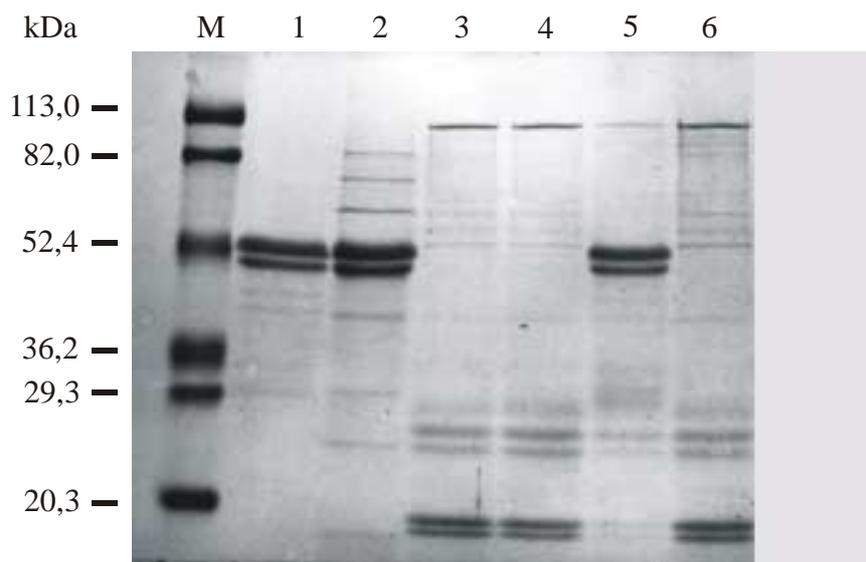
Die Inkubation von Espl mit monoklonalem IgA1 (16 h bei 37°C) zeigte keine Veränderung gegenüber dem unbehandelten IgA1, wohingegen die Inkubation des IgA1 mit IgA1-Protease aus *N. gonorrhoe*, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, einen deutlichen Abbau zeigte.

In der selben Weise wurde untersucht, ob Espl proteolytisch auf andere Substrate wirkt. Die Inkubation mit BSA, Hämoglobin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin, Transferrin, Thrombin, Lactoferrin, Aprotinin und Kollagen Typ 3, sowie HDL, LDL und VLDL (high, low + very low density lipoproteins) erbrachte keine sichtbare Veränderung der jeweiligen Banden bzw. Bandenmuster.

Ebenfalls durchgeführte Tests mit Zymogram-Gelen (s. 3.2.14.2.), um eine proteolytische Aktivität gegenüber Kollagen bzw. Casein zu identifizieren zeigten keine positiven Ergebnisse bezüglich Espl.

Schweine-Pepsin A weist im unbehandelten Zustand eine Bande von 49 und eine bei 45 kDa auf. Die tatsächliche Größe von Pepsin ist zwar mit 35 kDa beschrieben (Williams Jr. & Rajagopalan, 1966), jedoch liegt die Vermutung nahe, dass die elektrophoretische Mobilität (EM) von nativem Pepsin nicht ganz mit der des Proteinstandards zu vergleichen ist. Es kann auch eine Glykosilierung des Pepsins vorliegen und der Kohlenhydratanteil die EM verändern. Die Inkubation dieses Schweine-Pepsins A zeigte eine proteolytische Aktivität des Espl, es konnten Spaltbanden bei 28 bzw. 26 kDa und 17,5 bzw. 16,5 kDa zu beobachten werden (s. Abb. 13).

Versuche, durch Inkubation von angereicherten Kulturüberständen des Vektor-kontrollstammes mit Schweine-Pepsin A zeigten keine Veränderung des Pepsins. Dies ließ den Schluß zu, dass die Pepsinspaltung tatsächlich durch die Aktivität von Espl verursacht wird.



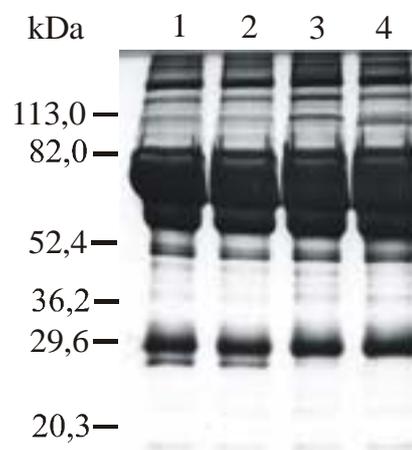
**Abb. 13: 12 % SDS-PAG mit Aktivitätstest-Proben von Espl gegen Pepsin.** M: Proteingrößenstandard, 1: nur Pepsin; 2: mit DH5 $\alpha$ /pK18; 3: mit Espl; 4: mit Espl; vorink. mit EDTA; 5: mit Espl; vorink. mit PMSF; 6: mit Espl; vorink. mit Isopropanol

Diese Pepsinspaltung wurde nun zur näheren Beschreibung der Protease-Aktivität von Espl genutzt. Dazu wurde der Einfluß von Proteaseinhibitoren untersucht (s. 3.2.14.4.). Die Espl-Präparation wurde hierzu jeweils mit Hemmstoffen vorinkubiert. (1 h bei 37°C). Verwendet wurde Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF), ein Hemmstoff speziell für Serin-Proteasen und EDTA, das Metallenzyme durch Komplexierung des Metallions hemmt. Nachfolgend wurden diese vorbehandelten Espl-Proben genau wie die unbehandelte Espl-Proben mit dem Substrat inkubiert, um eine noch vorhanden Aktivität zu untersuchen.

Dabei erwies es sich, dass eine Vorinkubierung des EspI mit PMSF zum völligen Verlust der proteolytischen Aktivität führte, wohingegen EDTA keinen Einfluß zeigte. (s. Abb. 13)

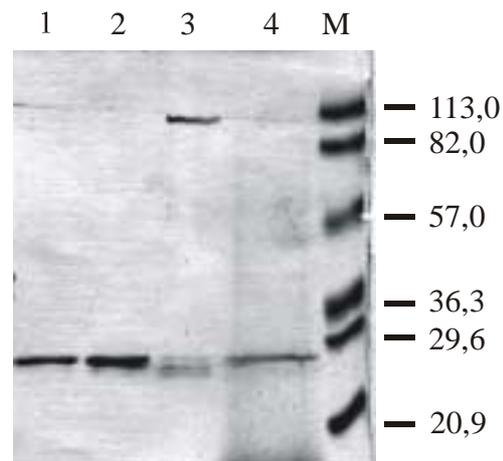
Diese Versuche, gemeinsam mit dem Nachweis des gefundenen Serin-Protease-Sequenzmotivs zeigten, dass es sich bei EspI höchstwahrscheinlich um eine Serin-Protease handelt.

Um nun weitere mögliche Substrate der Protease EspI zu identifizieren, wurde eine Probe von Humanserum mit EspI und den Kontrollpräparationen behandelt. Dabei fiel ein Protein von etwa 28 kDa auf, die nach Inkubation mit EspI verschwand (s. Abb. 14 ).

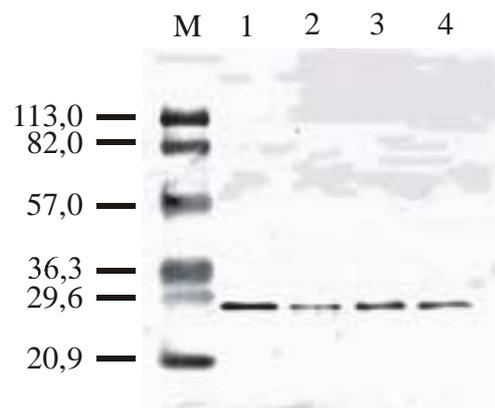


**Abb. 14: 12 % SDS-PAG mit Aktivitätstestproben von EspI gegen Humanserum.** Proteingrößenmarker links angegeben, 1: Humanserum; 2: Humanserum mit DH5 $\alpha$ /pK18; 3: Humanserum mit EspI; 4: Humanserum mit EspP

Beim Vergleich dieses Ergebnisses mit EspP zeigte sich, dass EspP ebenso wie EspI diese Bande zu spalten vermag (s. Abb. 14, Spur 4). Eine N-terminale Sequenzierung dieser Bande ergab die Sequenz D-E-P-P-Q-S-P-W-D, was dem reifem Apolipoprotein A1 entspricht. Eine Kontrolle dieser Ergebnisse erfolgte durch Versuche mit der Reinsubstanz Apolipoprotein A1, Coomassie gefärbten SDS-PAG und Immunoblots mit anti-Human-Apolipoprotein A1. Dabei stellte sich heraus, dass die proteolytische Aktivität von EspI gegen reines Apolipoprotein A1 nicht zu seinem vollständigen Abbau führte, wie dies in den Serumproben der Fall war. Es erfolgte hier lediglich ein teilweiser Abbau und das Abbauprodukt war als 1-2 kDa verkürztes Protein zu erkennen (s. Abb. 15 und 16), dies zeigt die proteolytische Aktivität von EspI gegen Apolipoprotein A1.



**Abb. 15: 12 % SDS-PAG mit Aktivitätstestproben von Espl gegen Apolipoprotein A1.** M: Proteingrößenstandard; 1: Apolipoprotein A1; 2: ApoA1 mit DH5 $\alpha$ /pK18; 3: ApoA1 mit Espl; 4: ApoA1 mit WT-Espl (s. 4.6.5.)



**Abb. 16: Immunoblot von Apolipoprotein A1 mit Apolipoprotein A1-Antikörpern.** M: Proteingrößenstandard; 1: Apolipoprotein A1; 2: ApoA1 mit Espl; 3: ApoA1 mit DH5 $\alpha$ /pK18; 4: ApoA1 mit WT-Espl (s. 4.6.5.)

#### 4.6.5. Nachweis von Espl im Wildtyp-Stamm 4797/97

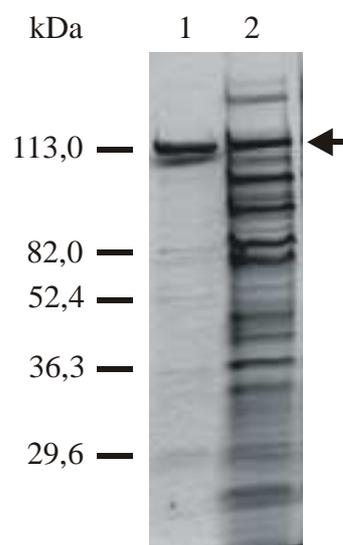
In verschiedenen Ansätzen wurde getestet, unter welchen Bedingungen der *E.coli* Wildtyp-Stamm 4797/97 das Protein Espl exprimiert, um die beste Espl-Expression zu erhalten. Nach verschiedenen Versuchen in Voll-, Minimal-, und Zellkulturmedien (s. 3.1.8.), bei 37°C und 42°C und jeweils stehend oder geschüttelt (s. Tab. 6), erwiesen sich die Standardbedingungen in LB-Medium bei 37°C und 180 rpm am erfolgreichsten. Es konnte in einem solchen Kulturüberstand eine Bande gefunden

werden, die in der SDS-PAGE auf der gleichen Höhe wie Espl lief (s. Abb. 17).

LB		NB		CDM		Spezial -M.		ZKM		ZKM o. Kälbers.		ZKM pur		Kulturbedingungen Temp.	
+	+	+	-	(+)	-	-	∅	+	*	+	-	+	-	180 rpm	37°C
+	+	+	-	(+)	-	-	∅	+	*	+	-	+	-	stehend	
+	(+)	(+)	-	-	∅	-	∅	∅		∅		∅		180 rpm	42°C
+	(+)	(+)	-	-	∅	-	∅	∅		∅		∅		stehend	

**Tab. 6: Wachstum und Espl-Expression von Stamm 4797/97 unter verschiedenen Bedingungen.** Zu jedem Versuch ist jeweils links Wachstum und rechts Expression angegeben. +: nachweisbar; -: nicht nachweisbar; (+): schwach nachweisbar; ∅: nicht getestet; \*: Proteingel durch starke Kälberserum-Banden nicht interpretierbar

Eine N-terminale Sequenzierung dieser Bande ergab auch die Sequenz S-T-V-S-A-E-I-P-Y-Q von Espl. Die Expressierung der Protease im Wildtyp-Stamm konnte somit nachgewiesen werden.

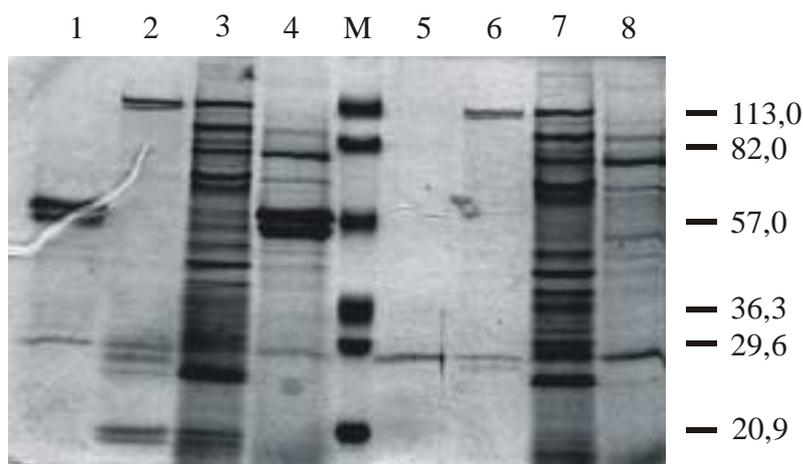


**Abb. 17: 12 % SDS-PAGE von Espl im Wildtyp-Stamm 4797/97.** 1: Espl (aus DH5a/pZH4) 2: 4797/97-Proteinpräparation (WT-Präparation). Der Pfeil deutet auf die Bande der WT-Präparation, die auf gleicher Höhe wie Espl läuft.

Die Untersuchung seiner proteolytischen Aktivität wurde bei dem *E.coli*-Stamm DH5α/pZH4 durchgeführt. Dazu wurde eine Präparation des Kulturüberstandes von dem *E.coli*-Stamm 4797/97 mit Pepsin bzw. Apolioprotein A1 inkubiert. Die Konzentration bezüglich der Espl-Bande war hierbei etwa die gleiche wie in der

Präparation aus dem *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$ /pZH4, welche als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Als eine Negativkontrolle wurde die Präparation eines *E.coli*-Wildtyp-Stammes (520/99) in gleicher Konzentration mitgeführt. Dessen Phänotyp und Genausstattung war möglichst ähnlich wie bei dem *E.coli*-Stamm 4797/97 (s. 3.1.4., Tab. 1).

Wie in Abbildung 18 zu sehen, wird Pepsin von der Protein-Präparation von dem *E.coli*-Stamm 4797/97 genau wie von reinem Espl gespalten. Dies passiert nicht bei einer Präparation des Vergleichsstammes. Auf diesem Gel ebenfalls zu sehen ist das Ergebnis des Aktivitätstests gegen Apolipoprotein A1. Die Bande, die nach Inkubation mit Espl fast völlig verschwindet, ist durch die vielen Banden der Protein-Präparation des *E.coli*-Stammes 4797/97 etwas schlecht zu erkennen. In Abbildung 16, dem Immunoblot gegen Apolipoprotein A1, ist gut zu erkennen, dass diese Bande von der Protein-Präparation von dem *E.coli*-Stamm 4797/97 nicht verändert wird.



**Abb. 18: 12 % SDS-PAG zur Proteaseaktivität von Espl im Wildtyp-Stamm 4797/97.** M: Proteingrößenmarker; 1: Pepsin; 2: Pepsin + Espl; 3: Pepsin + WT-Espl; 4: Pepsin + WT-Vergleich; 5: Apolipoprotein A1 (Apo A1); 6: Apo A1 + Espl; 7: Apo A1 + WT-Espl; 8: Apo A1 + WT-Vergleich

Diese Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Wildtyp-*E.coli*-Stamm 4797/97 aktives Espl exprimiert.

## 5. Diskussion

### 5.1. Genomflexibilität bei *E. coli*

*E. coli* ist ein wesentlicher Bestandteil der physiologischen Darmflora des Menschen. Die üblicherweise im Darm vorkommenden Colibakterien sind apathogen und für den Menschen eher nützlich. Allerdings ist bei dieser Bakterienspezies auch ein breites Spektrum von pathogenen Wirkungstypen beschrieben worden: uropathogene *E. coli*, Sepsis *E. coli* und verschiedene darmpathogene *E. coli*. [Donnenberg & Whittam 2001]. Diese pathogenen Varianten unterscheiden sich von den verwandten apathogenen Colistämmen durch die Präsenz von Pathogenitätsgenen. Sind mehrere Pathogenitätsgene auf einem DNA-Abschnitt vorhanden, spricht man von einer Pathogenitätsinsel. Unter dem Begriff Pathogenitätsinseln versteht man chromosomale DNA-Bereiche, die sich vom Restchromosom durch eine Reihe von Charakteristika unterscheiden. Hierzu zählen ihre Instabilität, die Präsenz von mehreren Pathogenitätsgenen und mobilen Elementen (Insertionselemente, Integrasen), die Lokalisation nahe an tRNA-Genen sowie ein veränderter G+C-Gehalt gegenüber dem Restgenom. Die Pathogenitätsinseln tragen zur Genomflexibilität und Virulenz dieser Erreger bei. Die genetischen Mechanismen, die zum Erwerb der Pathogenitätsinseln führen werden derzeit intensiv erforscht. Bei den meisten STEC-Stämmen kommt eine als LEE bezeichnete Pathogenitätsinsel vor, welche u.a. die genetische Information für die Produktion eines Adhäsins und eines Typ III-Sekretionssystems enthält. Dieses System ist für die Sekretion von mehreren Proteinen verantwortlich, die in die Signaltransduktion eingreifen. Den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Stämmen fehlt der LEE. An seine Stelle ist eine neue Pathogenitätsinsel getreten, die wir als LPA ( Locus of Protease activity and adhesion ) bezeichnet haben.

### 5.2. Die Heterogenität Shiga Toxin-produzierende *E. coli*

Weltweit verursachen Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) der Serogruppe O157 die meisten Fälle an hämorrhagischer Colitis und hämolytisch urämischem Syndrom [Griffin *et al.*, 1991, Verweyen *et al.*, 1999, Decludt *et al.*, 2000]. Besonders

in Europa wurde in den letzten Jahren jedoch auch zunehmend über Infektionen mit STEC anderer Serogruppen berichtet [Bitzan *et al.*, 1991; Bockemühl *et al.*, 1992; Mariani-Kurkdjian *et al.*, 1993; Caprioli *et al.*, 1994; Rüssmann *et al.*, 1995; Karch *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1996b; 1998; Bonnet *et al.*, 1998]. Deutlich wurde bereits, dass auch die Shiga Toxine ein differenzierendes Merkmal zwischen den verschiedenen STEC sind. Sie können aber auch ein Indiz für eine über verschiedene Serovare hinausgehende Gemeinsamkeit in der Genausstattung sein. Da Stx 2 produzierende Stämme offensichtlich ein höheres Virulenzpotential zeigen, als Stx 1 produzierende, muss man über die Grenzen der Serogruppen hinweg STEC bezüglich ihrer Shiga Toxin Typen zusammenfassen [Nataro & Kaper, 1998, Donohue *et al.*, 2000, Nishikawa *et al.*, 2000]. So zeigte sich bereits, dass alle bisher isolierten Stx 2e produzierenden Stämme, unabhängig von ihrer Serogruppe das Fehlen eines *eae*-Gens gemeinsam haben [Zhang *et al.*, 2000]. Diese Stämme lösen bei Schweinen, wo sie überwiegend nachgewiesen wurden, die gefährliche Ödemkrankheit aus [Weinstein *et al.*, 1988].

Das Fehlen der *eae*-, *pas*-, *escC*- und *escF*-Gene konnte für die in dieser Arbeit mittels PCR getesteten 35 STEC-Stämme gezeigt werden. Doch auch hier zeigt sich wieder die scheinbar typische Heterogenität der STEC. Mittels „tRNA-probing“ wurde festgestellt, dass nur bei 12 dieser Stämme die Insertionsstelle des LEE unbesetzt war (siehe 4.2.). Weitere 13 Stämme zeigten eine Insertion von Fremd-DNA, die dem LEE in keiner Weise ähnelte und 10 Stämme hatten eine Insertion von Fremd-DNA, die am 5'-Ende Homologie zum LEE zeigte (siehe 4.2.).

### 5.3. Der „Locus of Protease activity and adhesion“

Die Sequenzierung der 33014 bp langen Insertion in Stamm 4797/97 der Serogruppe O91:H<sup>-</sup> zeigte 24 offene Leserahmen. Deren unregelmäßige Anordnung auf dem direkten und komplementären DNA-Strang und das Vorhandensein vieler Integrase- und Phagensequenzen sowie Insertionselemente ergibt einen mosaikartigen Charakter für diese inserierte DNA. Der G+C-Gehalt dieser DNA weicht mit 47,7 % von dem des *E. coli* K12-Genoms (50 %) ab. Damit entspricht die Insertion auf Grund ihrer Größe, Struktur, verändertem G+C-Gehalt sowie den enthaltenen Sequenzen und durch die Assoziation mit einem tRNA-Gen den von Hacker postulierten Kriterien für die Identifizierung einer PAI (siehe 2.1.). Da im Rahmen

dieser Arbeit nicht gezeigt wurde, dass der LPA mit der Virulenz der *E. coli*-Stämme assoziiert ist, muss vorerst von einer „genomischen Insel“ gesprochen werden. Solche genomischen Inseln werden beispielsweise als Träger von Antibiotika-Resistenz-Genen bei *Salmonella typhimurium* beschrieben [Briggs *et al.*, 1999]. Auch die HPI (*high pathogenicity island*) bei STEC der Serogruppe O26, die neue metabolische Leistungen zur Erschließung von Eisenquellen vermitteln kann, wurde als solch eine „Fitnessinsel“ diskutiert [Karch *et al.*, 1999]. Gleichwohl ist vorstellbar, dass einige der bei LPA identifizierten Gene für potentielle Pathogenitätsfaktoren kodieren. So ist der Leserahmen L16 zu 93,5 % homolog zu *iha*, einem Gen der von Tarr [Tarr *et al.*, 2000] bei *E. coli* O157:H7 beschriebenen TAI (tellurite resistance- and adherence-conferring island), das für ein Adhesin kodiert. Tarr erwägt für *Iha* vor allem eine Bedeutung im Ersatz als Adhärenz vermittelnder Kollonisationsfaktor für Intimin bei Stämmen, die kein *eae*-Gen haben. Dabei wird auf Experimente hingewiesen, bei denen das Protein *Iha*, in trans in *E. coli*-Laborstämmen exprimiert, zu einer Adhärenz an menschlichen Zellen führte. Dies konnte für das Intimin nur in Verbindung mit zusätzlichen Proteinen gezeigt werden. Zudem konnte er in einigen *E. coli*-Stämmen, die kein *eae*-Gen besitzen, zu *Iha* homologe Proteine nachweisen. Da genau dies bei *E. coli* 4797/97 und den anderen in dieser Arbeit untersuchten 9 STEC-Stämmen der Fall ist, ist es durchaus wahrscheinlich, dass die hier inserierte Insel ihren eigenen Adhärenzfaktor mitbringt, um die Anheftung an die Epithelzellen des Darmes trotz des fehlenden Intimin zu sichern.

Für den Leserahmen L17 zeigt sich die auf Aminosäureebene sehr hohe Identität von 80 % zu dem Protein BtuB von *E. coli*. Dabei handelt es sich um einen in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* beschriebenen Vitamin B12-Rezeptor [Heller *et al.*, 1985, Lundrigan *et al.*, 1991]. Allerdings dient BtuB als Protein der äußeren Membran nicht nur zum Transport von Vitamin B12 ins Zellinnere, sondern auch als Rezeptor für die Phagen C1 und BF23 [Bradbeer *et al.*, 1976, Likhacheva *et al.*, 1996]. In zukünftigen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob das BtuB-Protein als Phagenrezeptor in diesen Stämmen fungieren kann. Die Bakteriophagen 1 und BF23 benutzen BtuB als Rezeptor. Diese Phagen sind morphologisch mit dem  $\lambda$ -Phagen verwandt, zu dessen Familie auch die Stx-kodierenden Phagen H19B und 933W zählen. Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass alle hier untersuchten 35 *eae*-negativen *E. coli*-Stämme eine als Stx2d bezeichnete Variante des Stx2 produzieren. Dies könnte bedeuten, dass auch das

*stx<sub>2a</sub>*-Gen auf einem lambdoiden Phagen liegt und durch Transduktion über den Rezeptor BtuB in diese *E. coli*-Stämme gelangt ist.

Die Verbreitung der kompletten genomischen Insel wurde durch PCR-Analysen überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass zwar einzelne Gene wie *iha* und *btuB* weit verbreitet sind, die komplette Insel aber bisher nur bei den 10 in dieser Arbeit beschriebenen *E. coli*-Stämmen, die das *stx<sub>2a</sub>*-Gen tragen, nachzuweisen ist. Diese Verbreitung einzelner Gene der Insel innerhalb *E. coli* vieler verschiedener Sero- und Pathogruppen ist durchaus typisch für den mosaikhaften Charakter und die Instabilität einer genomischen Insel. Es kann sogar vermutet werden, dass die 12 STEC-Stämme, die keinerlei Insertion an Stelle des LPA oder des LEE zeigen, den LPA besaßen, dieser aber wieder komplett deletiert wurde. Die 13 STEC-Stämme, die eine Insertion tragen, die vom LPA und LEE in großen Teilen abweicht, könnten eine völlig andere Insertion tragen. Es könnte auch eine inkomplette Deletion des LPA stattgefunden haben. Diese 13 Stämme könnten aber auch die Integration einer Vorform des LPA erfahren haben, die durch weitere Insertion der mittels PCR überprüften Gene erst zum hier vorgestellten LPA wurde.

In Verbindung mit der Theorie bezüglich der Erlangung des *stx<sub>2a</sub>*-Phagen könnte es sich bei den 12 das *stx<sub>2a</sub>*-Gen tragenden *E. coli*-Stämmen ohne LPA nur um „Nachfahren“ handeln, die die genomische Insel komplett verloren haben. Die restlichen 13 *E. coli*-Stämme, die das *stx<sub>2a</sub>*-Gen tragen, sollten demnach ursprünglich den LPA integriert gehabt haben, dann aber eine inkomplette Deletionen erfahren haben. Es bliebe hier natürlich auch die Möglichkeit, dass der komplette LPA deletiert wurde und später wieder eine neue Integration anderer Fremd-DNA erfolgte. Eine der wichtigsten Eigenschaften des LPA scheint jedenfalls, dass er mit *selC* die gleiche Insertionsstelle nutzt, wie der LEE bei vielen anderen STEC. Die Gene des LEE können statistisch als signifikantere Pathogenitätsmarker als *stx<sub>1</sub>*- oder *stx<sub>2</sub>*-Varianten-Gene gelten [Boerlin *et al.*, 1999].

Die Integration von LPA in *selC* hat möglicherweise verhindert, dass LEE in diesen Locus integrieren konnte. Das Fehlen von LEE kann zu einer abgeschwächten Virulenz der STEC führen [Boerlin *et al.*, 1999]. Die hier untersuchten Stämme wurden von Patienten mit leichten Diarrhoen und von asymptomatischen Trägern isoliert. LPA könnte wichtige Funktionen des LEE erfüllen, wie die Anheftung an die Epithelzellen der Darmwand. Die *E. coli*-Stämme könnten somit längere Zeit im Darm verweilen, auch ohne diesen zu schädigen.

## 5.4. Das Espl-Protein

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Determinante des LPA eingehend charakterisiert werden. Es handelt sich um die extrazelluläre Serinprotease Espl, die auch funktionell untersucht wurde. Expressionsversuche und die Isolierung des Proteins zur näheren Charakterisierung wurden mit dem Gen *espl*, in trans eingebracht in den Laborstamm *E. coli* DH5 $\alpha$ , durchgeführt. Die Expression des aktiven Espl war aber auch bei den späteren Versuchen mit dem Wildtyp *E. coli*-Stamm 4797/97 unter gleichen Bedingungen zu beobachten. Da weder in Minimalmedien noch bei niedrigeren oder höheren Temperaturen eine verstärkte Expression gegenüber den Standardbedingungen bei 37°C in LB-Medium festgestellt wurde, kann über die genaue Regulation von Espl keine Aussage gemacht werden. Die gewonnenen Daten aus der Sequenzierung deuten darauf hin, dass Espl als großes Vorläuferprotein synthetisiert wird. Die Ähnlichkeiten zu den sogenannten „Autotransporter-Proteinen“ [Jose *et al.*, 1995] fanden sich nicht nur auf der Sequenzebene, sondern auch in praktischen Versuchen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass Espl sowohl amino- als auch carboxyterminal prozessiert wird (siehe 4.6.2. und 4.6.3.). Es handelt sich bei diesen sezernierten beziehungsweise Oberflächen-assoziierten Proteinen um sogenannte TypIV-Sekretionssysteme, wozu neben der IgA1-Protease von *N. gonorrhoeae* [Pohler *et al.*, 1987] auch SepA von *S. flexneri* und EspP von *E. coli* O157:H7 [Brunner *et al.*, 1997] und viele andere gehören. Man fasst diese Proteine aufgrund ihrer Aktivität und ihren strukturellen Ähnlichkeiten zur SPATE-Familie (serine protease auto transporters of the *Enterobacteriaceae*) zusammen [Henderson *et al.*, 1999]. Für einige Mitglieder der SPATE-Familie konnte experimentell nachgewiesen werden, dass sie am C-Terminus eine Domäne besitzen, die eine Kanalstruktur, ein sogenanntes  $\beta$ -Barrel, in der äußeren Membran bildet. Dieses  $\beta$ -Barrel besteht aus 12 oder 14 (einer geraden Anzahl) amphipatischen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die ringförmig angeordnet sind. Diese Pore wird zum Ausschleusen der reifen Protease genutzt und dann abgespalten [Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995]. Espl zeigt Sequenzhomologien gerade im C-Terminus zu den IgA-Proteasen. In dieser Arbeit konnte für Espl gezeigt werden, dass der abgespaltene C-Terminus von Espl in der äußeren Membran und das reife Espl im Überstand lokalisiert ist (siehe 4.6.2.). Zudem zeigte eine N-terminale

Aminosäuresequenzierung des Translokators eine Schnittstelle im Sequenzmotiv E-V-N-N-L-N zwischen den beiden Aminosäureresten Asn 1086 und Asn 1087 mit Homologie zu den IgA-Proteasen (siehe 4.6.3.). Damit kann für EspI auch dieser TypIV-Sekretions-Mechanismus mit  $\beta$ -Barrel-Bildung eines Translokators angenommen werden.

Neben dem für die SPATE-Familie typischen Sequenzmotiv der C-terminalen Prozessierung ist auch das Serinprotease-Motiv G-D-S-G-S-P, das als Teil der aktiven Seite der SPATE-Proteine beschrieben wurde [Bachovchin *et al.*, 1990], bei EspI vorhanden. Daher lag es nahe, eine mögliche Proteaseaktivität von EspI zu untersuchen. Von den als Substrat getesteten Proteinen wurden nur Schweine-Pepsin A und Apolipoprotein A1 gespalten, nicht aber IgA1, Casein, der humane Gerinnungsfaktor V wie durch die IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae*, durch PssA oder durch EspP [Bachovchin *et al.*, 1990; Djafari *et al.*, 1997; Brunder *et al.*, 1997]. Auch keines der anderen verwendeten Substrate wurde prozessiert (siehe 4.6.4.). Dagegen war für EspP gezeigt worden, dass es ebenfalls Pepsin spaltet und bei vergleichenden Versuchen mit EspI und EspP wurde festgestellt, dass die entstehenden Spaltprodukte dieselben sind. So konnte auch gezeigt werden, dass EspP ebenfalls Apolipoprotein A1 spaltet (s. 4.6.4. mit Abb. 4.10). Der Gerinnungsfaktor V wird jedoch nur von EspP, nicht von EspI gespalten. Eigentlich verwundert das nicht weiter, da die Sequenzhomologien über das gesamte Protein betrachtet mit 47% nicht allzu hoch sind und EspI nicht mit einem Antiserum gegen EspP kreuzreagierte. Wenn man davon ausgeht, dass die dreidimensionale Struktur des Substrats einen wichtigen Einfluss hat, ist dieser bei kleinen Proteinen sicher geringer, so dass sowohl EspI als auch EspP mehrere kleine Substrate wie Pepsin und Apolipoprotein A1 spalten können. Daher könnte es für EspI noch weitere, spezifischere Substrate geben.

Apolipoprotein A1 ist die überwiegende Protein-Komponente des HDL (high density lipoprotein). Zu einem geringeren Anteil ist es auch in den Fraktionen VLDL und der Chylomikronen enthalten, die quasi nur Fetttröpfchen sind, die von einem lockeren Netz aus Proteinen umspannt werden. Apolipoprotein A1 zählt zu den Strukturproteinen der Lipoproteine und bildet somit die Hülle um nicht im Blut lösliche Fettanteile wie Triglyceride und Cholesterin. Die Spaltung von Apolipoprotein A1 durch EspI konnte sowohl im Serum als auch als Reinsubstanz eindeutig nachgewiesen werden (siehe 4.6.4. mit Abb. 4.10 und Abb. 4.11). Der völlige Abbau von Apolipoprotein A1 im Serum und die einfache Spaltung der Reinsubstanz ist

nicht verwunderlich, da im Serum viele Proteasen zugegen sind, die das Substrat weiter abgebaut haben können. Es zeigt sich aber ein scheinbarer Widerspruch zu diesen Ergebnissen, da auch Versuche mit VLDL und HDL als Substrat durchgeführt wurden, wo keine Veränderung des Protein-Bandenmusters zu beobachten war. Es kann nun einerseits sein, dass die Konzentration des Apolipoprotein in der Mischung nicht hoch genug war, um eine Veränderung zu bemerken. Andererseits ist es natürlich möglich, dass das Apolipoprotein A1 in seiner Bindung an die Lipide nicht so frei zugänglich war, dass eine proteolytische Reaktion stattfinden konnte. Dies würde allerdings bedeuten, dass der Einfluss von EspI tatsächlich nur eine Nebenrolle spielt. Die Bildung des Apolipoproteins A1 in der Darmmucosa macht es jedoch auch in freier Form für EspI zugänglich [Green *et al.*, 1982]. Über die Bedeutung der Spaltung kann aber nur spekuliert werden. Es scheint unwahrscheinlich, dass das Bakterium sich einen Vorteil durch Senkung des HDL-Spiegels im Blut des Wirtes verschafft. Allerdings kann damit der „Abtransport“ des Fettes aus dem Darm gehemmt und so zumindest geringfügig andere Bedingungen geschaffen werden. Bakterien, die nicht über Mechanismen zur Anheftung an die Epithelzellen der Darmwand verfügen, könnten in einem solchen Milieu eventuell leichter weggespült werden, was einen deutlichen Standortvorteil für die den LPA tragenden Stämme brächte.

## 5.5. Ausblick

Da bisher der Blick auf die mittlere Region des LPA mit den ORF für EspI, Iha und BtuB fokussiert wurde, wäre es nötig, Untersuchungen zu anderen Leserahmen zu starten, sowohl was deren Funktion als auch Verbreitung betrifft. Mit der sogenannten Proteomics-Methode, mit der die Expression einzelner Proteine über den Verlauf des Wachstums eines Bakteriums beobachtet werden können, könnte eventuell ein Regulationsmechanismus für die Expression von EspI gefunden werden. Gelänge es, Versuche mit EspI *in vivo* durchzuführen, ist es wahrscheinlich, dass ein spezifisches Substrat gefunden werden könnte. Sicherlich ist es auch sehr wichtig zu ermitteln, in wie fern BtuB tatsächlich als Phagenrezeptor dienen kann. Dazu sollten auch weitere Forschungen bezüglich der Herkunft von *stx<sub>2d</sub>* gemacht werden, ob es sich auf einem Phagen befindet und wenn ja, zu welcher Familie

dieser Phage gehört und ob BtuB ihm als Rezeptor dient. Es muss aber auch die Möglichkeit untersucht werden, ob ein völlig anderer Phage BtuB als Rezeptor nutzt. Diesbezüglich ist es auch wichtig, mehr über die Lokalisation der *stx*-Gene im Chromosom von *E. coli*-Stämmen zu wissen. Da von den 35 untersuchten STEC-Stämmen alle das *stx*<sub>2d</sub>-Gen und viele zusätzlich das *stx*<sub>1</sub>-Gen tragen, liegt die Frage nahe, welches *stx*-Gen beziehungsweise welcher Phage zuerst in das Genom integriert haben könnte. Mit den Methoden der evolutionären Infektionsbiologie könnte hier eine Antwort gefunden werden, die die Erlangung des LPA und damit die Differenzierung der *stx*<sub>2d</sub>-Gen tragenden *E. coli*-Stämme zeitlich einordnen könnte. Da die Verbreitung des LPA auch eng mit seiner Bedeutung zusammenhängt, sind weitere Untersuchungen diesbezüglich sicherlich nötig. Aufgrund des hohen Arbeits- und Kostenaufwandes der vielen einzelnen dazu nötigen PCR-Untersuchungen, ist hier sicherlich die sich rasch entwickelnde DNA-Chip-Technologie eine gute Alternative. Man könnte einzelsträngige DNA der Gene, der Leserahmen und auch intergenischer Bereiche des LPA auf einen solchen Chip aufbringen und dann in einem groß angelegten Screeningverfahren feststellen, ob und wenn ja wieviele andere *E. coli*-Stämme oder auch andere Spezies diese genomische Insel tragen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass sich in den letzten Jahren das Virulenzprofil der STEC stark erweitert hat. Aus phylogenetischen Analysen schließen wir, dass sich der Prototyp der STEC (Stämme des Serovars O157:H7) aus einem LEE-positiven enteropathogenen *E. coli* (Dyspepsiecoli) O55:H7 durch sukzessiven Erwerb genetischer Elemente (inter- und intraspezifischer Genaustausch) entwickelt hat [Donnenberg & Whittam, 2001. Anstelle des LEE integrieren die hier beschriebenen Stämme in *se/C* den LPA. Wir können daher spekulieren, dass sich diese *E. coli*-Stämme schon vor den klassischen EPEC und STEC O157 entwickelt haben. Die Untersuchung solcher evolutionärer Prozesse, die zur Entstehung der darmpathogenen *E. coli* und ihrer sprunghaft steigenden Virulenz geführt haben, können dazu beitragen, dass wir zukünftig flexibler auf neu entstandene Krankheitserreger reagieren können.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adu Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A.G., Trabulsi, L.R., Douce, G., Knutton, S. & Dougan, G. (1998)** Detection of intimins alpha, beta, gamma and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol*, **36**, 662-668
- Bachovchin, W.W., Plaut, A.G., Flentke, G.R., Lynch, M. & Kettner, C.A. (1990)** Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids. *J Biol Chem*, **265**, 3738 - 3743
- Beutin, L., Aleksic, S., Bockemühl, J., Schwarzkopf, A. & Karch, H. (1994)** Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993. *Bundesgesundheitsb*, **37**, 410-414
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S. & Karch, H. (1995)** Virulence markers of Sahiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J Clin Microbiol*, **33**, 631-635
- Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P.J. & Parsot, C. (1995)** SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri* autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol*, **17**, 123-135
- Bitzan, M., Karch, H., Maas, M.G., Meyer, T., Rüssmann, H., Aleksic, S. & Bockemühl, J. (1991)** Clinical and genetic aspects of Shiga-like toxin production in traditional enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, **274**, 496-506
- Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. (1997)** The complete sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1474
- Blattner, F.R., Plunkett III, G., Perna, N.T., Shao, Y, Gregor, J., ., Mayhew, G.F., Mau, B., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Rose, D.J., & Goeden, M. (1997)** Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* O157:H7 versus *Escherichia coli* K-12. *Microb Comp Genomics*, **2**, 174 (Abstract)
- Bockemühl, J., Aleksic, S. & Karch, H. (1992)** Serological and biochemical properties of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli*, other than O-group 157, from patients in Germany. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis*, **276**, 189-195

- Bockemühl, J., Karch H. & Tschäpe, H. (1997)** Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1996. *Bundesgesundheitsbl*, **40**, 194-197
- Boerlin, P., McEwen, S.A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J.B., Johnson, R.P. & Gyles, C.L. (1999)** Associations between virulence factors of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*, **37**, 497-503
- Bonnet, R., Souweine, B., Gauthier, G., Rich, C., Livrelli, J., Sirot, J., Joly, B. & Forestier, C. (1998)** Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J Clin Microbiol*, **36**, 1777-1780
- Boyce, T.G., Swerdlow, D.L. & Griffin, P.M. (1995)** *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndromes. *N Engl J Med*, **333**, 364-368
- Bradbeer, C., Woodrow, M.L. & Khulifah, I.I. (1976)** Transport of vitamin B<sub>12</sub> in *Escherichia coli* common receptor system for vitamin B<sub>12</sub> and bacteriophage BF23 in the outer membrane of the cell envelope. *J Bacteriol*, **125**, 1032-1039
- Briggs, C.E., Fratamico, P.M. (1999)** Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob agents chemother*, **43**, 846-849
- Brunder, W., Schmitt, H. & Karch, H. (1996)** KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, **142**, 3305-3315
- Brunder, W., Schmitt, H. & Karch, H. (1997)** EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol*, **24**, 767-778
- Buchrieser, C., Prentice, M. & Carniel, E. (1998)** The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangements. *J Bacteriol*, **180**, 2321-2329
- Burland, V., Shao, Y., Perna, N.T., Plunkett, G., Sofia, H.J. & Blattner, F.R. (1998)** The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucl Acids Res*, **26**, 4196-4204
- Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., Resti, C., Edefonti, A., Perfumo, F., Farina, C., Goglio, A., Gianviti, A. & Rizzoni, G. (1994)** Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, **169**, 208-211

- Carniel, E., Guilvout, I. & Prentice, M. (1996)** Characterization of a large chromosomal „high-pathogenicity island“ in biotype 1 B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, **178**, 6743- 6751
- Carter, A.O., Borczyk, A.A., Carlson, J.A., Harvey, B., Hockin, J.C., Karmali, M.A., Krishnan, C., Korn, D.A. & Lior, H. (1987)** A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med*, **317**, 1469-1500
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappouli, R. & Coracci, A. (1996)** cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 14648-14653
- Decludt B., Bouvet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Grimont, P.A., Hubert, B. & Loirat, C. (2000)** Haemolytic uraemic syndrome and Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection in children in France. The Societe de Nephrologie Pediatrique. *Epedemiol Infect*, **124**, 215-220
- De Vinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S. & Finlay, B.B. (1999)** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the Host Cell Membrane but is not phosphorylated. *Infect Immun*, **67**, 2389-2398
- Donohue, R.A., Kodonova, I., Oswald, S., Hutto, D. & Tzipori, S. (2000)** *Escherichia coli* O157:H7 strains that express Shiga toxin (STX)2 alone are more neurotropic for gnotobiotic piglets than are isotypes producing only Stx1 und Stx2. *J Infect Dis*, **181**, 1825-1829
- Donnenberg, M.S. & Whittam T.S. (2001)** Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, **107**, 539-548
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C. & Curtiss III, R. (2000)** Relationship between the Tsh Autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and Localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect Immun*, **68**, 4145-4154
- Fraser, M., Chernaia, M., Kozlov, Y.V. & James, M.N.G. (1994)** Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2,5 Å resolution. *Nat struct Biol*, **1**, 59-64
- Green, P.H.R., Lefkowitz, J.H., Glickman R.M., Riley, J.W., Quinet, E. & Blum, C.B. (1982)** Apolipoprotein localization and Quantification in the human intestine. *Gastroenterology*, **83**, 1223-1230

- Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. (1991)** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, **13**, 60-98
- Griffin, P.M. (1998)** Epidemiology of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States. *Kaper, J.B., O'Brien, A.D. (eds): Escherichia coli O157:H7 and other Shiga-toxin-producing E. coli strains. Washington, D.C. American Society for Microbiology*, 15-22
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. & Goebel, W. (1990)** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vivo* and *in vitro* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog*, **8**, 213-335
- 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**, 1089-1097
- Hacker, J. & Kaper, J.B. (1999)** The concept of pathogenicity islands. *Kaper, J.B. & Hacker, J. (eds.): Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. Washington, D.C. American Society for Microbiology*, 1-11
- Hacker, J. (2000)** Evolutionäre Infektionsbiologie. *Hacker, J. & Heesemann, J. (eds.): Molekulare Infektionsbiologie. Heidelberg - Berlin Spektrum Akademischer Verlag*, 139-150
- Heller, K. & Kadner, R.J. (1985)** Nucleotide sequence of the gene for Vitamin B12 receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **161**, 904-908
- Heuvelink, A.E., Van der Kar, N.C.A.J., Meis, J.F.G.M., Monnens, L.A.H. & Melchers, W.J.G. (1995)** Characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with hemolytic uraemic syndrome in Western Europe. *Epidemiol Infect*, **115**, 1-14
- Johnson, W.M., Lior, H. & Bezanson, G.S. (1983)** Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*, **1**, 76
- Jose, J., Jähnig, F. & Meyer, T.F. (1995)** Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol*, **18**, 378-380
- Karch, H., Rüssmann, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. & Heesemann, J. (1995)** Longterm shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol*, **33**, 1602-1605

- Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S. & Datz, M. (1996)** Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture. *J Clin Microbiol*, **34**, 516-519
- Karch, H., Geitz, C. & Schmidt, H. (1997a)** Increased incidence of infections with EHEC O103:H2. *Notiziario dell' Istituto Superiore Di Santa*, **10**, 2
- Karch, H., Huppertz, H.I., Bockemühl, J., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. & Lissner, R. (1997b)** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *J Food Prot*, **11**, 1454-1457
- Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Ölschläger, T. & Hacker, J. (1999)** A genomic island, termed high-pathogenicity island is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun*, **67**
- Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.C., Arbus, G.S. & Lior H. (1985)** The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, **151**, 775-782
- Kenny, B. & Finlay, B.B. (1995)** Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 7991-7995
- Kenny, B., Lai, L., Finlay, B.B. & Donnenberg, M.S. (1996)** EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol*, **20**, 313-323
- Köhler, B., Karch, H. & Schmidt, H. (2000)** Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiol*, **146**, 1085-1090
- Konowalchuk, J., Speirs J.I. & Starvic, S. (1977)** Veroreponse to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **18**, 775-779
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.-A., Ng, E. & Goebel, W. (1999)** Virulence Gene Clusters and putative pathogenicity islands in Listeriae. *Kaper, J.B. & Hacker, J. (eds.): Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. Washington, D.C. American Society for Microbiology*, 219-232
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685

- Likhacheva, N.A., Samsonov, Victor V., Samsonov, Valeri V. & Sineoky, S.P. (1996)** Genetic control of the resistance to phage C1 of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **178**, 5309-5315
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina N. & Novick, R. (1998)** The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **29**, 527-543
- Louie, M., de Azavedo, J.C., Handelsman, M.Y., Clark, C.G., Ally, B., Dytoc, M., Sherman, P. & Brunton, J. (1993)** Expression and characterization of the *eeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect Immun*, **61**, 4085-4092
- Lundrigan, M.D., Koster, W. & Kadner, R.J. (1991)** Transcribed sequences of the *Escherichia coli* *btuB* gene control its expression and regulation by vitamin B12. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 1479-1483
- Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., Loirat, C., Goulet, P., Sansonetti, P.J. & Elion, J. (1993)** Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J Clin Microbiol*, **31**, 296-301
- McDaniel, M.A., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. (1995)** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 1664-1668
- Muniesa, M., Recktenwald, J., Bielaszewska, M., Karch, H. & Schmidt, H. (2000)** Characterization of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun*, **68**, 4850-4855
- Nataro, J.P., YiKang, D., Giron, J.A., Savarino, S.J., Kothary, M.H. & Hall, R. (1993)** Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect Immun*, **61**, 1126-1131
- Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, **11**, 164-177
- Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Cheasty, T. & Haruki, K. (2000)** Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol*, **38**, 2440-2442
- O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W. & Formal, S.B. (1983)** *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet*, **1**, 702

- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R., Smith, H.W. & Formal, S.B. (1984)** Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause haemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*, **226**, 694-696
- O'Brien, A.D., Tesh, V.L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M.P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A.A. & Keusch, G.T. (1992)** Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, **180**, 65-94
- Ohtsubo, H. & Ohtsubo, E. (1978)** Nucleotide sequence of an insertion element IS1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**, 615-619
- Ölschläger, T. & Hacker, J. (2000)** Proteinsekretionssysteme. *Hacker, J. & Heesemann, J. (eds.): Molekulare Infektionsbiologie. Heidelberg - Berlin Spektrum Akademischer Verlag*, 91-96
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Pósfai, G., Elliott, S., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B. & Blattner, F.B. (1998)** Molecular evolution of a Pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, **66**, 3810-3817
- Plunkett III, G., Rose, D.J., Durfee, T.J. & Blattner, F.R. (1999)** Sequence of Shiga toxin 2 Phage 933 W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a Phage Late-Gene Product. *J Bacteriol*, **181**, 1767-1778
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T.F. (1987)** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, **325**, 458-462
- Pridmore, R.D. (1987)** New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*, **56**, 309-312
- Rajakumar, K., Sasakama, C. & Adler, B. (1997)** Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* *she* pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A proteaselike family of proteins. *Infect Immun*, **65**, 4606-4614
- Reida, P., Wolff, M., Pohls, H.W., Kühlmann, W., Lehmacher, A., Aleksic, S., Karch, H. & Bockemühl, J. (1994)** An outbreak due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children daycare centre characterized by person to person transmission and environmental contamination. *Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis*, **281**, 534-543

- Reizer, J., Charbit, A., Reizer, A. & Saier, M.H.J.J.R. (1996)** Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis: operons encoding homologues of sugar-specific permease domains of the phosphotransferase system and pentose catabolic enzymes. *Genome Sci Technol*, **1**, 53-75
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. & Cohen, M.L. (1983)** Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, **308**, 681-685
- Rüssmann, H., Kothe, E., Schmidt, H., Franke, S., Harmsen, D., Caprioli, A. & Karch, H. (1995)** Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J Med Microbiol*, **42**, 404-410
- Russel, M. (1998)** Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: Type II protein secretion systems (Review). *J Mol Biol*, **279**, 485-499
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sanger, F. (1981)** Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*, **214**, 1205-1210
- Schmidt, H., Karch, H. & Beutin, L. (1994)** The large sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett*, **117**, 189-196
- Schmidt, H., Beutin, L. & Karch, H. (1995)** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*, **63**, 1055-1061
- Schmidt, H., Kernbach, C. & Karch, H. (1996a)** Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol*, **142**, 907-914
- Schmidt, H. & Karch, H. (1996b)** Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*, **34**, 2364-2367
- Schmidt, H., Maier, E., Karch, H. & Benz, R. (1996c)** Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur J Biochem*, **241**, 594-601

- Schmidt, H., Henkel, B. & Karch, H. (1997)** A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett*, **148**, 265-272
- Schmidt, H., Geitz, C., Frosch, M., Tarr, P.I. & Karch, H. (1998)** Unique virulence profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 and evidence for clonality. *J Infect Dis*, 175
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. & Karch, H. (2000)** A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1205-1208
- Scotland, S.M., Smith, H.R., Wilshaw, G.A. & Rowe, B. (1983)** Vero cytotoxin production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophages. *Lancet*, **1**, 216
- Smith, H.W., Green, P. & Parsell, Z. (1983)** Verocell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, children and pigs. *J Gen Microbiol*, **129**, 3121-3137
- Takao, T., Tanabe, T., Hong, Y.M., Shimonishi, Y., Kurazono, H., Yutsudo, T., Sasakawa, C., Yoshikawa, M. & Takeda, Y. (1988)** Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. *Microb Pathog*, **5**, 57-69
- Tarr, P.I., Bilge, S.S., Vary Jr., J.C., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Ward, T.R., Baylor, M.R. & Besser, T.E. (2000)** Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal Island of conserved structure. *Infect Immun*, **68**, 1400-1407
- Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L. & van Der Lelie, D. (2000)** Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bact*, **182**, 1399-1409
- Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Atl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354
- Venkatesan, M.M., Alexander, W.A. & Fernandez-Prada, C. (1996)** A *Shigella flexneri* invasion plasmid gene, *ipgH*, with homology to IS629 and sequences encoding bacterial sugar phosphate transport proteins. *Gene*, **175**, 23-27

- Verweyen, H.M., Karch, H., Allerberger, F. & Zimmerhackl, L.B. (1999)** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in pediatric hemolytic-uremic syndrome: a prospective study in Germany and Austria. *Infection*, **27**, 341-347
- von Heijne, G. (1986)** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl Acids Res*, **14**, 4683-4690
- Weinstein, D.L., Jackson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K. & O'Brien, A.D. (1988)** Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*, **170**, 4223-4230
- Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S. & Kaper, J.B. (1997)** Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett*, **156**, 49-53
- Williams Jr., R.C. & Rajagopalan, T.G. (1966)** Ultracentrifugal characterization of pepsin and pepsinogen. *J Biol Chem*, **241**, 4951-4954
- Yeo, C.C., Wong, D.T. & Poh, C.L. (1998)** IS1491 from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867: characterization and distribution among *Pseudomonas* species. *Plasmid*, **39**, 187-195
- Zhang, W., Hemmrich, U., Schlereth, H., Bielaszewska, M. & Karch, H. (2000)** Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains harbouring *stx*<sub>2</sub> gene variants from human stools (Poster). *VTEC 2000*, 29.10.-2.11.2000, Kyoto, Japan

## 7. Anhang

### Abkürzungen

AS	Aminosäurerest
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
E	Extinktion
EAEC	enterohaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EM	elektrophoretische Mobilität
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
g	Fallbeschleunigung
HDL	Lipoproteine mit hoher Dichte (high density lipoproteins)
HUS	hämolytisch urämisches Syndrom
IS	Insertionssequenz
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
LDL	Lipoproteine mit geringer Dichte (low density lipoproteins)
LEE	locus of enterocyte effacement
LPA	locus of protease activity and adhesion
M	molar
min	Minute(n)
NC	Nitrocellulose
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OM	äußere Membran (outer membrane)
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

---

PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SPATE	Serine protease autotransporters of the <i>Enterobacteriaceae</i>
STEC	Shiga Toxin produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
ÜN	über Nacht
VLDL	Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins)

---

## Verwendete Symbole für Aminosäuren

A	Alanin
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## Liste der Veröffentlichungen

### Poster:

**Zhang, W., Hemmrich, U., Schlereth, H., Bielaszewska, M. & Karch, H. (2000)** Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains harbouring *stx*<sub>2</sub> gene variants from human stools. *VTEC 2000, 29.10.-2.11.2000, Kyoto, Japan*

### Artikel:

**Schmidt, H., Zhang, W., Hemmrich, U., Jelacic, S., Brunder, W., Tarr, P.I., Dobrindt, U., Hacker, J. & Karch, H. (2001)** Identification and Characterization of a novel Genomic island integrated at *sefC* in Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **69**, 6863-6873

## Lebenslauf

Name: Ulrike Dorothee Hemmrich

geboren: am 18.06.1971 in Heilbronn-Sontheim

Schulbildung: 1977-1981 Grund- und Hauptschule Lauda  
1981-1990 Martin-Schleyer-Gymnasium, Lauda  
11.05.1990 Allgemeine Hochschulreife

Praktikum: 1990-1991 Freiwilliges Soziales Jahr in der  
Sozialstation Südl. Breisgau, Bad Krozingen

Universitätsausbildung: 1991-1996 Studium der Lebensmittelchemie an der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
1994 Vordiplom  
18.04.1996 Abschluß Teil A der Hauptprüfung für  
Lebensmittelchemiker  
1996-1997 Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker im  
Untersuchungsamt Gießen  
15.05.1997 Abschluß Teil B der Hauptprüfung für  
Lebensmittelchemiker  
1997-1998 wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für  
Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-  
Universität Frankfurt am Main  
seit 1.10.1998 Anfertigung der Dissertation am Institut für  
Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg  
seit 1.01.2001 Leiterin Abteilung Mikrobiologie im  
Lebensmittelchemischen Labor Hemmrich, Lauda

## Danksagung

Zuallererst schulde ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. H. Karch, der mir dieses interessante Thema mit großen Freiräumen zur Bearbeitung überlassen hat und mir so erst die Anfertigung einer Doktorarbeit ermöglichte.

Ebenso großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Schreier für die Betreuung dieser Arbeit innerhalb der Fakultät für Chemie, Lebensmittelchemie und Pharmazie.

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmidt möchte ich danken für all die Erklärungen, Diskussionen, Hinweise und Hilfestellungen, die das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst haben.

Herrn Dr. Werner Brunder danke ich ganz herzlich für seine geduldigen Hinweise, sein stets offenes Ohr, seine praktischen Hilfen und die netten Mittagspausen.

Bei allen Angehörigen der Arbeitsgruppe möchte ich mich bedanken für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung in den kleinen und großen Problemen des Laboralltags. Hier gilt mein besonderer Dank für die fruchtbare Zusammenarbeit Frau Dr. WenLan Zhang, für die Einarbeitung in allgemeine Methoden der Molekularbiologie Beatrix Henkel und Barbara Plaschke und in Proteinanalytik Olga Böhler, für die stete Hilfsbereitschaft meiner Nachbarin an der Laborbank Steffi Ammersbach und für organisatorische Hilfe Dr. Martina Bielaszewska. Ganz herzlicher Dank für die wertvollen Gespräche über das Leben im Labor und im allgemeinen geht an meine lieben Kollegen Bernd Köhler und Andreas Janka sowie Dr. Jürgen Recktenwald.

Ohne das Verständnis und den Rückhalt meiner Eltern und die finanzielle Unterstützung meiner Mutter wäre es überhaupt nicht möglich gewesen, diese Arbeit anzufertigen. Dafür gebührt ihnen einfach besonders herzlicher Dank.