

**Phylogenetische und funktionelle Analysen zur  
Kapsel O-Acetyltransferase NeuO von  
*Escherichia coli* K1**

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

vorgelegt von  
**Ines Louise Mordhorst**  
aus Osterholz-Scharmbeck

Würzburg, 2009

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Vogel

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Morschhäuser

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

**Erklärungen gemäß §4 Abs. 3, S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere zudem, dass diese Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Bis auf den Titel der Diplom-Biologin habe ich bislang keinen anderen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Ines Louise Mordhorst

Würzburg, den 18.12.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
3.1. Das Bakterium <i>Escherichia coli</i> .....	4
3.2. Extrazelluläre Polysaccharide von <i>E. coli</i> .....	7
3.2.1. <i>E. coli</i> K1-Kapsel.....	8
3.2.1.1. <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung.....	12
3.3. <i>E. coli</i> -Typisierungsmethoden.....	15
3.3.1. <i>E. coli</i> -Serotypisierung.....	15
3.3.2. <i>E. coli</i> -Referenzstammsammlung und Multilokus-Enzymelektrophorese.....	16
3.3.3. Multilokus-Sequenztypisierung.....	16
3.3.3.1. <i>E. coli</i> -Multilokus-Sequenztypisierung.....	18
3.4. ExPEC-Zoonose-Potential und ExPEC-Reservoirire.....	19
3.5. Zielsetzung.....	21
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
4.1. Geräte und Hilfsmittel.....	23
4.2. Verbrauchsmaterialien.....	24
4.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.....	25
4.4. Puffer und Lösungen.....	27
4.5. Bakterienkultur.....	27
4.5.1. Wachstumsbedingungen, Bakterienstämme und Plasmide.....	27
4.5.2. Isolierung von <i>E. coli</i> .....	31
4.5.3. Kryokonservierung von <i>E. coli</i> .....	31
4.5.4. Nährmedien.....	31
4.5.5. Mediumszusätze.....	32
4.6. Zellkultur.....	32
4.6.1. Eukaryotische Zellen.....	32
4.6.2. Zellkulturmedien.....	32
4.6.3. Beschichtung von Zellkulturmaterialien.....	33
4.6.4. Passagierung von HBMEC.....	33
4.6.5. Kryokonservierung von HBMEC.....	33
4.6.6. Zählen von HBMEC.....	34
4.7. Oligonukleotide.....	34
4.8. Antikörper.....	37
4.9. Agarosegelelektrophorese.....	37
4.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	37
4.11. Photometrische Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur.....	38
4.12. DNA-Präparationen.....	38
4.12.1. DNA-Präparationen mit Qiagen-Kits.....	38

4.12.2.	Präparation chromosomaler DNA.....	38
4.12.3.	Fällung von PCR-Produkten mit PEG8000/NaCl.....	38
4.13.	PCR und DNA-Sequenzierung.....	39
4.13.1.	PCR.....	39
4.13.2.	DNA-Sequenzierung.....	40
4.13.3.	Multilokus-Sequenztypisierung.....	40
4.13.4.	CUS-3-Genotypisierung.....	41
4.14.	Klonierungsmethoden.....	42
4.14.1.	Restriktionsverdau von DNA.....	42
4.14.2.	Alkalische Dephosphorylierung.....	42
4.14.3.	Auffüllreaktion mit der T4-DNA-Polymerase.....	43
4.14.4.	Ligationsreaktion.....	43
4.15.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	43
4.15.1.	Herstellung kompetenter Zellen.....	43
4.15.2.	Aufreinigung von Ligationsansätzen.....	44
4.15.3.	Elektroporation.....	45
4.16.	DNA-Hybridisierung.....	45
4.16.1.	Herstellung DIG-markierter Sonden.....	45
4.16.2.	Southern Blot.....	46
4.16.3.	Kolonie-Blot und Dot-Blot.....	46
4.16.4.	Hybridisierung von DNA mit DIG-markierten Sonden.....	47
4.16.5.	Nachweis DIG-markierter DNA-Sonden mit dem CSPD-System.....	47
4.16.6.	Strippen von Nylonmembranen.....	48
4.17.	Plasmid- und Stammkonstruktionen.....	49
4.17.1.	Klonierung des <i>argW</i> -Lokus aus <i>E. coli</i> K1-Stamm RS176.....	49
4.17.2.	<i>NeuO-knock out</i> .....	49
4.17.2.1.	Erzeugung des Donorstammes für den <i>neuO-knock out</i> .....	49
4.17.2.2.	Erzeugung von Transkonjuganden durch Konjugation.....	50
4.17.2.3.	Erzeugung von Mutanten aus Transkonjuganden.....	50
4.17.3.	Komplementation von <i>neuO</i> -negativen <i>E. coli</i> K1-Isolaten <i>in trans</i> .....	51
4.18.	Methoden zum Antigennachweis.....	51
4.18.1.	Objektträgeragglutination.....	51
4.18.2.	Kolonie-Immunoblot mit mAb735.....	52
4.18.3.	ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	52
4.19.	Funktionelle Analysen.....	53
4.19.1.	Infektionsversuche mit HBMEC.....	53
4.19.2.	<i>In vivo</i> -Experimente mit <i>White Leghorn</i> -Hühnern.....	54
4.19.2.1.	<i>In vivo</i> -Infektionsexperimente.....	54
4.19.2.2.	<i>In vivo</i> -Kolonisierungsexperimente.....	55
4.19.3.	Statische <i>in vitro</i> -Biofilmexperimente.....	55
4.19.4.	Austrocknungsexperimente mit Hühnertrockenkot.....	56
4.19.5.	Wachstumskurven.....	56
4.20.	Datenauswertung.....	57
4.20.1.	Statistik.....	57
4.20.2.	Simpson's Diversitätsindex und Speziesreichtum.....	57
4.20.3.	DNA-Sequenzanalyse.....	57
4.20.4.	Konkat-Meister.....	57

4.20.5.	<i>SplitsTree</i> und <i>NeighborNet</i> .....	57
4.20.6.	Hauptkomponentenanalyse .....	58
4.20.7.	UPGMA-Analyse .....	58
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>59</b>
5.1.	Phylogenetische Analysen der <i>E. coli</i> K1 O-Acetyltransferase <i>neuO</i> .....	59
5.1.1.	<i>E. coli</i> K1-Populationsbiologie .....	59
5.1.1.1.	<i>E. coli</i> K1-Stammsammlung .....	59
5.1.1.2.	Multilokus-Sequenztypisierung der <i>E. coli</i> K1-Stammsammlung .....	62
5.1.2.	<i>NeuO</i> -Populationsbiologie .....	66
5.1.2.1.	Verteilung von <i>neuO</i> in der <i>E. coli</i> K1-Population .....	66
5.1.2.2.	Charakterisierung von <i>neuO</i> .....	68
5.1.2.2.1.	Allelvarianten von <i>neuO</i> .....	68
5.1.2.2.2.	5'- <i>Heptanucleotide-Repeats</i> von <i>neuO</i> .....	69
5.1.3.	Evolutionäre Beziehung zwischen <i>E. coli</i> K1 und CUS-3 .....	71
5.1.3.1.	Genotypisierung von CUS-3 .....	71
5.1.3.2.	Assoziation von MLST- mit CUS-3-Gruppen .....	72
5.1.4.	Chromosomale Lokalisation von <i>neuO</i> /CUS-3 .....	73
5.1.5.	Analyse der potenziellen CUS-3 <i>Attachment-Site</i> .....	74
5.2.	Humane und aviäre <i>E. coli</i> K1-Stämme des ST95-Komplexes .....	75
5.3.	Funktionelle Analysen zur NeuO-vermittelten <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung .....	76
5.3.1.	Rolle der <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung in Infektionsversuchen mit humanen Gehirndothelzellen .....	77
5.3.2.	Rolle der <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung im Tiermodell .....	77
5.3.2.1.	<i>In vivo</i> -Infektionsexperimente mit <i>White Leghorn</i> -Hühnern .....	78
5.3.2.2.	<i>In vivo</i> -Kolonisierungsexperimente mit <i>White Leghorn</i> -Hühnern .....	79
5.3.3.	Rolle der <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung bei der <i>in vitro</i> -Biofilmbildung .....	80
5.3.3.1.	Screening der <i>E. coli</i> K1-Stammsammlung auf Biofilm-bildende Isolate .....	80
5.3.3.2.	<i>In vitro</i> -Biofilmbildung isogener <i>E. coli</i> K1-Stammpaare .....	82
5.3.4.	Rolle der <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung in Austrocknungsversuchen mit Hühnertrockenkot .....	82
5.3.5.	Wachstumskurven für verschiedene nicht-O-acetylierte und O-acetylierte <i>E. coli</i> K1-Varianten aus Stammpaaren .....	85
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>87</b>
6.1.	Verteilung und Charakterisierung von <i>neuO</i> und CUS-3 in einer phylogenetisch charakterisierten <i>E. coli</i> K1-Stammsammlung .....	87
6.1.1.	Häufigkeit der <i>E. coli</i> K1-Kapsel .....	87
6.1.2.	Phylogenie der untersuchten <i>E. coli</i> K1-Stämme .....	88
6.1.3.	Assoziation von <i>neuO</i> /CUS-3 mit dem <i>E. coli</i> K1-STC95 .....	89
6.1.4.	Koevolution von <i>E. coli</i> K1 und CUS-3 .....	92
6.1.5.	Erhalt von <i>neuO</i> mit großen Anzahlen an 5'- <i>Heptanucleotide-Repeats</i> .....	92
6.2.	Molekulare Analysen von humanen und aviären <i>E. coli</i> K1-Stämmen mit ST95 und CUS-3_GT2 .....	93
6.3.	Relevanz der NeuO-vermittelten <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung unter unterschiedlichen Umweltbedingungen .....	94
6.3.1.	Die K1-Kapsel O-Acetylierung hat auf die pathogenetischen Eigenschaften von <i>E. coli</i> keinen Einfluss .....	95

6.3.2.	Die <i>E. coli</i> K1-Kapsel O-Acetylierung hemmt die <i>in vivo</i> -Kolonisierung und die <i>in vitro</i> -Biofilmbildung, erhöht aber die Austrocknungsresistenz des Bakteriums ...	97
6.4.	Fazit.....	100
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>116</b>
8.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	116
8.2.	Publikationsliste.....	119
8.3.	Lebenslauf.....	120
8.4.	Danksagung.....	121
8.5.	Tabellen.....	123

## 1. Zusammenfassung

*Escherichia coli* ist ein Kommensale des menschlichen und tierischen Gastrointestinaltraktes. Einige *E. coli*-Stämme sind in der Lage, extraintestinale Erkrankungen beim Menschen wie Harnwegsinfekte, Neugeborenen-Meningitis und Sepsis, sowie beim Tier aviäre Coliseptikämien, hervorzurufen. Ein wichtiger Virulenzfaktor des Bakteriums ist dabei die aus  $\alpha$ -2,8-verknüpften Sialinsäuremonomeren aufgebaute K1-Kapsel, die phasenvariabel mit einer hohen Frequenz O-acetyliert werden kann. Im Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem für die O-Acetylierung verantwortlichen Enzym um die O-Acetyltransferase NeuO handelt, die von dem K1-spezifischen Prophagen CUS-3 codiert wird. Die Verteilung von *neuO* in der *E. coli* K1-Population sowie die funktionelle Relevanz der K1-Kapsel O-Acetylierung für das Bakterium waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit weitestgehend unklar.

Eine *E. coli* K1-Stammsammlung mit 183 Isolaten wurde aufgebaut. Die *E. coli* K1-Isolate stammten sowohl aus Stuhlproben gesunder Freiwilliger, humanen Harnwegsinfekten, humanen invasiven Erkrankungen (Neugeborenen-Meningitis und Bakteriämie) und aus an Coliseptikämie erkrankten Vögeln. Die Isolate der *E. coli* K1-Stammsammlung wurden mit der Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) typisiert. Es konnten 39 Sequenztypen (ST) sowie fünf Sequenztyp-Komplexe (STC) identifiziert werden. Bei dem mit Abstand häufigsten STC handelte es sich um den STC95, dem 80 Stämme (44%) angehörten. Insgesamt 103 der 183 *E. coli* K1-Stämme waren *neuO*-positiv (56%). Das Gen wurde in 78 (98%) der STC95-Isolate, aber nur in 25 (24%) der 103 nicht-STC95-Stämme gefunden. *NeuO* war also mit dem STC95 assoziiert. Über Sequenzanalysen des CUS-3-Prophagen konnten CUS-3-Genotypen bestimmt werden. Die Gruppierung der CUS-3-Genotypen und der *E. coli* K1-ST sowie der anschließende Vergleich beider Gruppierungen miteinander offenbarte eine Segregation der Prophagen-Genotypen entsprechend der ST. Daher legen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse eine Koevolution des Phagen mit seinem Wirt nahe. Einige humane und aviäre *E. coli* K1-Isolate waren weder auf Basis der MLST bzw. der CUS-3-Genotypisierung noch anhand des Vorhandenseins verschiedener, mit extraintestinalpathogenen *E. coli*-assoziiierter Gene voneinander unterscheidbar, was die Hypothese einer zoonotischen Transmission dieser Stämme unterstützt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen konnte weder ein Effekt der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Fähigkeit der Bakterien an humane mikrovaskuläre Gehirndothelzellen zu adhären oder in diese zu invadieren, noch



auf die *in vivo*-Virulenz der Bakterien im Hühnermodell beobachtet werden. Die K1-Kapsel O-Acetylierung verringerte die *in vivo*-Kolonisierung des Hühner-Gastrointestinaltraktes und die *in vitro*-Biofilmbildung durch das Bakterium, wohingegen sie die Austrocknungsresistenz von *E. coli* K1 erhöhte. Möglicherweise dient die phasenvariable *neuO*-Expression und damit die *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung der Anpassung des Bakteriums an wechselnde Umweltbedingungen.

## 2. Summary

*Escherichia coli* is a commensal of the human and animal intestinal tract. Some strains have the ability to cause extraintestinal disease in humans such as urinary tract infections, neonatal meningitis and septicemia, but also animal infection such as avian colisepticemia. A major virulence factor of the bacterium is the K1 capsule composed of  $\alpha$ -2,8-linked sialic acid monomers, which can be phase variably O-acetylated at a high frequency. In 2005, it was shown that the enzyme responsible for O-acetylation is the O-acetyltransferase NeuO, which is encoded by the K1-specific prophage CUS-3. The distribution of *neuO* as well as the functional relevance of the K1 capsule O-acetylation for the bacterium were largely unknown at the start of the thesis.

A strain collection comprising 183 *E. coli* K1 strains was established. The *E. coli* K1 isolates derived from stool samples of healthy donors, human urinary tract infections, human invasive diseases like newborn meningitis and bacteremia, and from avian colisepticemia. All isolates were typed by multilocus sequence typing (MLST). Thirty-nine sequence types (ST) and five sequence type complexes (STC) were identified. The major share of the strains belonged to the STC95 (80 strains, 44%). 103 of 183 *E. coli* K1 strains were *neuO*-positive (56%). The gene was found in 78 (98%) STC95 isolates, but only in 25 (24%) of 103 non-STC95 isolates. Therefore, there was an association of *neuO* with the STC95. With the help of DNA sequencing of internal fragments of CUS-3, distinct CUS-3 genotypes were assigned. There was a segregation of CUS-3 genotypes according to STs, suggesting coevolution of the prophage CUS-3 and its host. Some human and avian isolates were indistinguishable with respect to MLST, CUS-3 genotyping and the presence of genetic markers associated with extraintestinal pathogenic *E. coli*, which was compatible with the hypothesis of zoonotic transmission of these strains. Functional analyses performed in this study neither revealed an impact of NeuO-mediated K1 capsule O-acetylation on the ability of the bacteria to adhere to or invade into human brain microvascular endothelial cells, nor on the *in vivo* virulence of the bacteria in a chicken infection model. K1 capsule O-acetylation decreased *in vivo* chicken gut colonization and *in vitro* biofilm formation, while increasing *E. coli* K1 desiccation resistance. This study provides evidence that phase variable *neuO* expression and the subsequent O-acetylation of the *E. coli* K1 capsule serves as an efficient tool for the adaptation to changing environments.

## 3. Einleitung

### 3.1. Das Bakterium *Escherichia coli*

Das „*Bakterium coli commune*“ wurde 1885 erstmals von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich beschrieben (Escherich, 1885), der seine medizinische Ausbildung in Würzburg begann und in München Studien über den Einfluss intestinaler Bakterien auf den menschlichen Gastrointestinal-Trakt (GI-Trakt) durchführte [Übersicht in: (Hacker & Blum-Oehler, 2007)]. Ihm zu Ehren wurde das Bakterium 1919 von A. Castellani und A. J. Chalmers in *Escherichia coli* umbenannt. Bei dem Keim handelt es sich um ein aerob bzw. fakultativ anaerob wachsendes, gram-negatives Stäbchenbakterium des Darms. Taxonomisch wird *E. coli* in die Klasse der Gammaproteobakterien und die Familie der *Enterobacteriaceae* eingeordnet. Das Bakterium ist mittlerweile als einer der am intensivsten untersuchten Modellorganismen im Bereich der molekularen Biologie zu betrachten und war zudem eine der ersten Spezies, deren komplette Genomsequenz entschlüsselt werden konnte (Blattner *et al.*, 1997).

*E. coli*-Stämme sind genotypisch sowie phänotypisch außerordentlich divers. Sie heben sich auf klinisch-mikrobiologischer Ebene teilweise enorm voneinander ab und lassen sich auf dieser Basis in drei große Gruppen einteilen: (I.) kommensale Stämme, (II.) intestinal-pathogene *E. coli* (Erkrankung mit Darmbeteiligung) und (III.) extraintestinal-pathogene *E. coli* [(ExPEC) (Erkrankung außerhalb des Darms) (Übersicht in: (Russo & Johnson, 2003)].

Kommensale *E. coli*-Stämme besiedeln sehr effektiv die Mukosa des Säugetier- bzw. Vogeldarms und sind Bestandteil der physiologischen Bakterienflora des GI-Traktes von Säugetieren und Vögeln. Sie gehören zu den ersten Bakterien, die humane Neugeborene nach der Geburt kolonisieren (Long & Swenson, 1977). Kommensale *E. coli* schützen den GI-Trakt ihres Wirtes vor der Besiedelung durch Pathogene und lösen nur in seltenen Fällen und unter bestimmten Bedingungen Erkrankungen aus [Übersicht in: (Russo & Johnson, 2003)].

Zur Gruppe der intestinal-pathogenen *E. coli* gehören sechs gut charakterisierte Kategorien, die aufgrund spezifischer Merkmale untereinander sowie von den kommensalen und extraintestinal-pathogenen *E. coli* abgrenzbar sind: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli*, enteroaggregative *E. coli*, enteroinvasive *E. coli* sowie diffus-adhärierende *E. coli*. Zu den von den intestinal-pathogenen *E. coli* verursachten Krankheitsbildern zählen vor allem schwere Durchfallerkrankungen [Übersicht in: (Nataro & Kaper, 1998, Stenutz *et al.*, 2006)].

Die Gruppe der ExPEC, zu der die uropathogenen *E. coli* (UPEC), die neonatale Meningitis-assoziierten *E. coli* (NMEC), die Sepsis-assoziierten *E. coli* (SEPEC) und die aviär pathogenen *E. coli* (APEC) gehören, ist aufgrund der Häufigkeit und der hohen Morbidität und Mortalität der hervorgerufenen Erkrankungen sowie den resultierenden Kosten ein großes Problem für das öffentliche Gesundheitssystem bzw. für die Tierzucht [Übersicht in: (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999, Russo & Johnson, 2003)]. Die Mitglieder der ExPEC-Gruppe sind in der Lage, in extraintestinalen Nischen Erkrankungen auslösen. Dabei können genetische Faktoren wie Plasmide, Pathogenitätsinseln oder Bakteriophagen Vorteile bei der Besiedlung dieser Nischen bieten und dadurch zu der Virulenz der Stämme beitragen [Übersicht in: (Kaper *et al.*, 2004)]. In den folgenden Abschnitten werden die o. g. Mitglieder detaillierter beschrieben, da sie für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung sind.

Harnwegsinfekte (HWI) gehören zu den am weitverbreitetsten bakteriellen Infektionen des Menschen, und bei *E. coli* handelt es sich um den am häufigsten aus dieser Erkrankung isolierten Erreger. HWI-auslösende *E. coli*-Stämme werden unter dem Begriff der UPEC zusammengefasst. Die jährlichen Fallzahlen und Kosten der HWI allein in den USA sind enorm [Übersicht in: (Russo & Johnson, 2003, Kaper *et al.*, 2004)]. UPEC verursachen die zu den HWI gerechneten Zystitiden (Blasenentzündungen) und bei Aufsteigen in Nierenbecken und Nierenparenchym Pyelonephritiden (Nierenbeckenentzündungen). In deren Folge kann es, möglicherweise über die Invasion von Blasen- oder Nierenepithelzellen (Meier *et al.*, 1996), zu einem Übertritt der Bakterien in das Blut mit anschließender Urosepsis kommen [Übersicht in: (Johnson, 1991, Kaper *et al.*, 2004)]. Vor allem für rezidivierend auftretende HWI-Erkrankungen wird angenommen, dass UPEC aus der Darmflora des erkrankten Individuums selbst stammen (Russo *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1998) und/oder dass die UPEC in Blasenepithelzellen überdauern (Anderson *et al.*, 2003, Rosen *et al.*, 2007). Aus diesen Reservoiren könnten die Bakterien immer wieder in die Harnwege gelangen und Rezidive verursachen. Auch die Möglichkeit einer Übertragbarkeit von UPEC über Sexualpartner wird diskutiert (Foxman *et al.*, 2002, Johnson & Delavari, 2002).

NMEC-Stämme verursachen das Krankheitsbild der Neugeborenen-Meningitis. *E. coli* ist der häufigste gram-negative Erreger dieser Erkrankung (Unhanand *et al.*, 1993). Die meisten Fälle der durch *E. coli* verursachten Meningitiden wurden in einer Studie von de Louvois *et al.* in den ersten Lebenswochen beobachtet, nach den ersten Lebenswochen wird *E. coli* als Meningitis-Erreger von anderen Bakterien wie *Neisseria meningitidis* („Meningokokken“), *Haemophilus influenzae* oder *Streptococcus pneumoniae* („Pneumokokken“) abgelöst (de Louvois *et al.*, 1991). Die Inzidenz der neonatalen *E. coli*-Meningitis liegt in Industrieländern

bei etwa 0,1 Fällen pro 1000 Neugeborenen [Übersicht in: (Bonacorsi & Bingen, 2005)]. Die Mortalitätsrate beträgt etwa 20-25% (Unhanand *et al.*, 1993, Mulder *et al.*, 1984, de Louvois *et al.*, 1991). Im Erwachsenenalter ist eine durch *E. coli* ausgelöste Meningitis praktisch nicht zu beobachten. Für die Pathogenese der NMEC-Infektion im Säugling wird folgendes Modell angenommen [Übersicht in: (Bonacorsi & Bingen, 2005)]: Die Bakterien werden wahrscheinlich perinatal von der Mutter oder durch Schmierinfektionen über enge Kontaktpersonen wie Krankenschwestern erworben (Sarff *et al.*, 1975, Goldmann, 1981). Die NMEC kolonisieren zunächst den Darm und gelangen dann möglicherweise über die Transcytose von GI-Epithelzellen in den Blutstrom, wie *in vitro*-Befunde nahelegen (Burns *et al.*, 2001). Im Blut kommt es zu einer Bakteriämie, also einer massiven Multiplikation der Bakterien (s. u.). Die NMEC können über die Passage der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins Gehirn gelangen und eine Meningitis auslösen [(Kim *et al.*, 1992, Kim *et al.*, 2003) Übersicht in: (Kim, 2001)]. Die NMEC-Keimzahlen im Blut scheinen bei der Pathogenese der neonatalen Meningitis eine wichtige Rolle zu spielen: Die Frequenz einer *E. coli*-Meningitis war in Neugeborenen, die über  $10^3$  koloniebildende Einheiten (*colony forming units*, CFU) pro ml Blut aufwiesen höher (6 von 11 bzw. 60% entwickelten eine Meningitis) als in Neugeborenen mit einer Bakteriämie von unter  $10^3$  CFU/ml [(1 von 19 bzw. 5% entwickelten eine Meningitis) (Dietzman *et al.*, 1974)]. Auch im Rattenmodell nimmt der Anteil *E. coli*-positiver Liquor-Proben mit der Anzahl an Bakterien im Blut zu (Kim *et al.*, 1992, Houdouin *et al.*, 2002).

Bei Erwachsenen ist *E. coli* als bedeutender Bakteriämie-Erreger bekannt (Gransden *et al.*, 1990, Eykyn *et al.*, 1990, McBean & Rajamani, 2001, Sader *et al.*, 2002). In der Studie von Elhanan *et al.* war das Bakterium der häufigste gram-negative Erreger dieser Erkrankung in Patienten aus zwei israelischen Krankenhäusern (Elhanan *et al.*, 1995). Eine *E. coli*-Bakteriämie kann sich u. a. aus einem HWI entwickeln (s. o.) und ist meistens von klinischer Bedeutung, da sie typischerweise mit einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock einhergeht. Die verantwortlichen *E. coli*-Stämme werden als SEPEC bezeichnet [Übersicht in: (Russo & Johnson, 2003)].

Unter dem Begriff APEC werden *E. coli*-Isolate zusammengefasst, die eine der bedeutendsten ExPEC-Infektionen bei Tieren auslösen, die aviäre Coliseptikämie. Sie ist sowohl bei wildlebenden Vögeln als auch bei domestiziertem, zur Ei- oder Fleischproduktion verwendetem Geflügel bekannt, und verursacht jährlich einen enormen wirtschaftlichen Schaden in der Ei- und Fleischproduzierenden Industrie [Übersicht in: (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999)]. Bei der aviären Coliseptikämie handelt es sich um eine systemische

Erkrankung der Vögel, die als Infektion der Atemwege beginnt. Man geht davon aus, dass sich die Tiere vor allem aerogen durch das Einatmen von mit Fäkalien kontaminiertem, APEC-haltigen Staub infizieren. Über Lunge und Luftsack können die Bakterien in das Blut der Tiere gelangen. Durch die hämatogene Verbreitung kommt es zu einer generalisierten Infektion der Tiere, die durch entzündliche Veränderungen innerer Organe (vor allem von Herz, Leber, Milz und Nieren) sowie durch die Entwicklung einer Sepsis charakterisiert ist. In der Regel tritt innerhalb weniger Tage der Tod ein [(Pourbakhsh *et al.*, 1997a, Antao *et al.*, 2008) Übersicht in: (Ewers *et al.*, 2003)]. Experimentell lässt sich eine Coliseptikämie durch die intratracheale Applikation von *E. coli* auslösen (Antao *et al.*, 2008). Auch der Infektionsweg über *E. coli*-haltige Aerosole wurde zur Induktion der Erkrankung beschrieben, wenn die Tiere zuvor mit respiratorischen Viren infiziert wurden (Parreira & Gyles, 2003). Sowohl der Darm der Tiere als auch ihre Umwelt stellen wahrscheinlich das APEC-Reservoir dar (Ewers *et al.*, 2009). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass das Risiko für die Tiere, an aviärer Coliseptikämie zu erkranken, mit der bakteriellen Kontamination ihrer Umgebung zunimmt [Übersicht in: (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999)]. Vor allem in Legebetrieben, Masthöfen und ähnlichen Einrichtungen, in denen viele Hühner oder andere Geflügelarten zusammen auf engstem Raum untergebracht sind, stellen APEC-Infektionen ein bedeutendes Problem dar.

### **3.2. Extrazelluläre Polysaccharide von *E. coli***

Die Spezies *E. coli* produziert eine große Anzahl verschiedener extrazellulärer Polysaccharide, deren Bedeutung von der Resistenzvermittlung gegenüber verschiedenen Umweltstressbedingungen bis hin zu der Erhöhung ihrer Pathogenität reicht. Die von *E. coli* gebildeten extrazellulären Lipopolysaccharid (LPS, „O-Antigen“- und Kapselpolysaccharid („K-Antigen“-) Strukturen können aufgrund ihrer Variabilität, die auf unterschiedlichen Zuckerresten, deren Verknüpfungen sowie Substitutionen mit nicht-Zucker-Molekülen beruht, für die Serotypisierung von *E. coli* genutzt werden [(s. 3.3.1.) Übersicht in: (Orskov *et al.*, 1977, Whitfield, 2006)]. Manche *E. coli*-Stämme bilden noch weitere, nicht Serotypspezifische extrazelluläre Polysaccharide wie bspw. die unter bestimmten Umweltbedingungen produzierte Colaninsäure [(„M-Antigen“) (Goebel, 1963, Grant *et al.*, 1969, Yeh & Chen, 2004) Übersicht in: (Gottesman & Stout, 1991)].

Die von *E. coli* hervorgebrachten K-Antigene sind strukturell sehr vielfältig, was durch das Vorkommen von über 80 verschiedenen Kapseltypen veranschaulicht wird. Ein auf biosynthetischen und genetischen Charakteristika beruhendes Klassifizierungsschema für die

verschiedenen *E. coli*-Kapseltypen wurde 1999 vorgeschlagen und ermöglichte die Einteilung der *E. coli* K-Antigene in vier verschiedene Kapselgruppen (Whitfield & Roberts, 1999). In den folgenden Abschnitten werden die Charakteristika und Funktionen der für die vorliegende Arbeit wichtigen *E. coli* K1-Kapsel sowie deren Modifizierung mit O-Acetylgruppen detaillierter beschrieben.

### 3.2.1. *E. coli* K1-Kapsel

Bei dem *E. coli* K1-Kapselpolysaccharid handelt es sich um ein aus  $\alpha$ -2,8-verknüpften Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure)-Monomeren aufgebautes Homopolymer, das unter dem Namen Colominsäure als erstes bakterielles Sialinsäurepolymer beschrieben wurde (Barry & Goebel, 1957, Barry, 1958, Dewitt & Rowe, 1961, Kundig *et al.*, 1971). Das K1-Antigen ist ein hydrophiles, negativ geladenes, saures Molekül (Barry, 1958), das zu den Gruppe 2-Kapseln gezählt wird. Der Aufbau des nicht modifizierten K1-Kapselpolysaccharids ist u. a. mit der Zusammensetzung der Serogruppe B-Meningokokken- [(MenB) (Liu *et al.*, 1971, Kasper *et al.*, 1973)] oder der *Moraxella nonliquefaciens*-Kapsel (Devi *et al.*, 1991) identisch. 1981 wurde das *E. coli* K1-Kapselgencluster als erstes bakterielles Kapselgencluster überhaupt kloniert und in *E. coli* K12 exprimiert, von dem daraufhin ein chemisch und immunologisch nicht von einer Wildtyp *E. coli* K1-Kapsel zu unterscheidendes Polysaccharid synthetisiert wurde (Silver *et al.*, 1981). Die für die *E. coli* K1-Kapselsynthese verantwortlichen Gene sind in dem sog. „*kps* (Kapselpolysaccharid-Synthese)/*neu* (N-Acetylneuraminsäure)“-Gencluster organisiert, dessen schematischer Aufbau ebenso wie die Funktionen der Genprodukte, soweit bekannt, in Abbildung 3-1 dargestellt sind. Das *kps/neu*-Gencluster umfasst drei Regionen: In Region 1 und 3 befinden sich für den Kapselexport spezifische Gene („*kps*“), die bei *E. coli*-Isolaten mit Gruppe 2-Kapseln konserviert sind. In Region 2 befinden sich die für die spezifische Kapselsynthese erforderlichen Gene („*neu*“) [Übersicht in: (Bliss & Silver, 1996, Whitfield, 2006, Vimr & Steenbergen, 2009)]. In *E. coli* K1 ist die Poly- $\alpha$ -2,8-Sialyltransferase NeuS für die Verknüpfung der Sialinsäuremonomere und damit für die chemische Komposition der *E. coli* K1-Kapsel verantwortlich (Steenbergen & Vimr, 1990, Steenbergen *et al.*, 1992). Die Synthese der *E. coli* K1-Kapsel findet vermutlich in einem als „Sialosom“ bezeichneten Kompartiment der Bakterienzelle statt (Steenbergen & Vimr, 2008). Als Ort der Ausschleusung von Gruppe 2-Polysacchariden werden die bakteriellen Zellpole angenommen (McNulty *et al.*, 2006). Ein bekannter Umweltfaktor, der die Expression der K1-Kapsel wie auch die Expression anderer Gruppe 2-Kapseln dramatisch beeinflussen kann, ist die Umgebungstemperatur: Die Kapselsynthese ist

bei 37° C am stärksten, wohingegen sie bei etwa 20° C praktisch nicht mehr nachgewiesen werden kann (Bortolussi *et al.*, 1983, Orskov *et al.*, 1984, Merker & Troy, 1990, Kroncke *et al.*, 1990, Simpson *et al.*, 1996, Rowe *et al.*, 2000). Auch ein pH-Wert von 4 oder 5 führte zu einem Abfall der K1-Antigensynthese, mit steigendem pH-Wert nahm die K1-Kapselproduktion aber wieder zu (Vermeulen *et al.*, 1988).

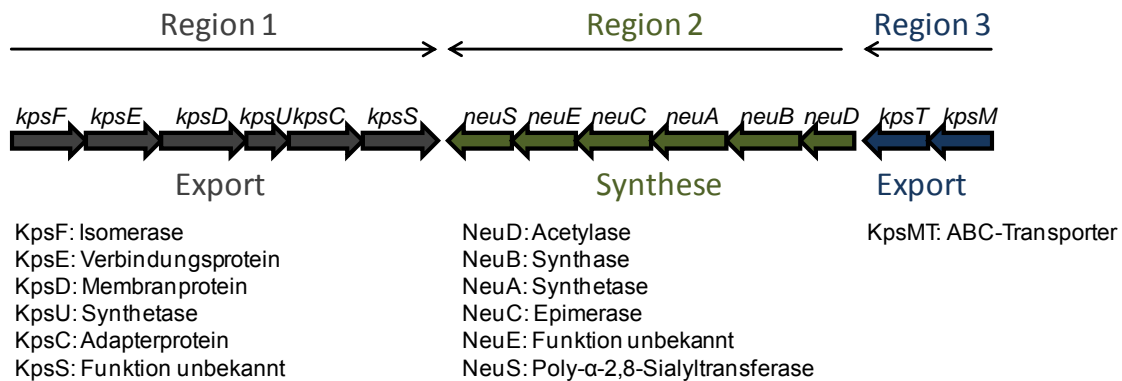


Abbildung 3-1: Organisation des *E. coli* K1 *kps/neu*-Genclusters [Abbildung nach: (Whitfield, 2006, Vimr & Steenbergen, 2009)]. ABC [ATP (Adenosintriphosphat)-binding-cassette]-Transporter, ATP-abhängiger Transporter.

Die K1-Kapsel stellt einen gut beschriebenen, wichtigen Pathogenitätsfaktor von *E. coli* dar, der häufig in ExPEC-Isolaten nachgewiesen werden kann. In Tabelle 3-1 ist der Anteil des *E. coli* K1-Antigens bei Isolaten aus verschiedenen ExPEC-Erkrankungen sowie bei Isolaten aus asymptomatischem Trägertum aufgeführt, um einen Überblick über die Verteilung der K1-Kapsel in den unterschiedlichen Bedingungen zu bieten. Für die Erstellung der Tabelle wurden 17 Studien von 1974 bis 2009 aus unterschiedlichen Ländern berücksichtigt. Aus Tabelle 3-1 wird ersichtlich, dass die große Mehrheit der *E. coli*-Isolate aus Neugeborenen-Meningitiden (ca. 80%) bzw. etwa 40% der *E. coli*-Isolate aus Neugeborenen-Bakteriämien das K1-Kapselantigen exprimieren. *E. coli* K1 ist damit bei diesen Erkrankungen vorherrschend. Der Anteil K1-positiver *E. coli*-Isolate ist bei adulter Bakteriämie und bei HWI mit je ca. einem Fünftel wesentlich geringer (Tab. 3-1). Bei aus aviärer Coliseptikämie isolierten *E. coli* findet sich die K1-Kapsel ebenfalls in etwa einem Fünftel der Stämme, wobei die Daten je nach Studie teilweise stark variieren (2% bis 41%). Neben dem Vorkommen bei Erkrankungen gehören K1-positive Stämme aber auch zur Normalflora des humanen und, in geringerem Ausmaß des aviären GI-Traktes: Ungefähr ein Fünftel der aus humanen Stuhlproben und etwa ein Zwanzigstel der aus dem Darm von Vögeln isolierten *E. coli*-Stämme tragen das Antigen (Tab. 3-1).



**Tabelle 3-1:** Übersicht über die Prävalenz der K1-Kapsel bei *E. coli*-Isolaten aus unterschiedlichen ExPEC-Infektionen sowie aus Stuhlproben auf Basis ausgewählter Studien.

<b><i>E. coli</i> isoliert aus...</b>	<b>Anteil <i>E. coli</i> K1 in % (<i>E. coli</i> K1/ Gesamt <i>E. coli</i>)</b>	<b>Mittelwert <i>E. coli</i> K1/ Gesamt <i>E. coli</i></b>	<b>Referenz</b>
Neugeborenen- Meningitis	88 (116/132)	371/448	(Mulder <i>et al.</i> , 1984)
	77 (126/163)		(Sarff <i>et al.</i> , 1975)
	84 (48/57)		(McCracken <i>et al.</i> , 1974)
	81 (57/70)		(Johnson <i>et al.</i> , 2002)
	92 (24/26)		(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
Neugeborenen- Bakteriämie	36 (37/103)	58/138	(Sarff <i>et al.</i> , 1975)
	60 (21/35)		(Korhonen <i>et al.</i> , 1985)
adulter Bakteriämie	12 (16/137)	77/467	(Pitt, 1979)
	20 (20/100)		(Devine <i>et al.</i> , 1989)
	18 (41/230)		(Pitt, 1978)
Harnwegsinfekt (Blasenentzündung und/oder Pyelonephritis)	9 (6/65)	194/1090	(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	13 (37/284)		(Sarff <i>et al.</i> , 1975)
	11 (44/400)		(Devine <i>et al.</i> , 1989)
	31 (61/200)		(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005a)
	34 (25/74)		(Johnson <i>et al.</i> , 2001)
	31 (21/67)	(Korhonen <i>et al.</i> , 1985)	
humanen Stuhlproben	19 (225/1169)	356/1878	(Sarff <i>et al.</i> , 1975)
	17 (76/450)		(Bettelheim <i>et al.</i> , 2003)
	22 (11/50)		(Korhonen <i>et al.</i> , 1985)
	21 (44/209)		(Wullenweber <i>et al.</i> , 1993)
aviärer Coliseptikämie	16 (72/451)	377/1786	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
	2 (2/114)		(McPeake <i>et al.</i> , 2005)
	16 (83/524)		(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005a)
	31 (163/526)		(Ewers <i>et al.</i> , 2007)
	14 (7/50)		(Parreira <i>et al.</i> , 1998)
	41 (50/121)		(Ewers <i>et al.</i> , 2009)
aviären Stuhlproben	4 (9/211)	18/315	(Ewers <i>et al.</i> , 2009)
	9 (9/104)		(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)

\*Nachweis der K1-Kapsel erfolgte in den Studien mittels phänotypischer Charakterisierung durch Antiserum bzw. durch K1-spezifische Bakteriophagen oder über K1-Kapselgen-spezifische PCR.

Die Bedeutung der *E. coli* K1-Kapsel in der Entwicklung einer Neugeborenen-Meningitis wird außer durch epidemiologische Hinweise auch durch einen Vergleich klinischer Daten deutlich, nach denen die Mortalität der Meningitis signifikant höher in mit K1-positiven als in mit K1-negativen *E. coli* infizierten Neugeborenen war (McCracken *et al.*, 1974). Im Erwachsenenalter scheint der K1-Kapsel während einer Bakteriämie allerdings nicht mehr eine so große Bedeutung wie im neonatalen Alter zuzukommen (Tab. 3-1). So zeigten Patienten mit *E. coli* K1- bzw. nicht-K1-Bakteriämie keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Mortalität, auch wenn die Inzidenz für einen septischen Schock bei Patienten mit K1-Bakteriämie (74%) signifikant größer als für Patienten mit einer nicht-K1-Bakteriämie (33%) war (Weinstein & Young, 1978). In einer Studie von 1979 war der Ausgang einer *E. coli* K1-Infektion im Erwachsenenalter im Vergleich mit anderen *E. coli*-Kapselvarianten sogar vorteilhafter (Pitt, 1979).

Das *E. coli* K1-Polysaccharid verleiht Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes und trägt so zur Pathogenität des Bakteriums bei. Die K1-Kapsel entspricht chemisch den posttranslationalen Modifikationen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*) eukaryotischer Zellen [Übersicht in: (Mühlenhoff *et al.*, 1998)]. Es ist anzunehmen, dass diese strukturelle Mimikry die Bildung K1-spezifischer Antikörper begrenzt. So konnte in gesunden Freiwilligen keine Antikörperbildung nach Gabe des K1-Polysaccharids detektiert werden (Kasper *et al.*, 1973). Auch die strukturell identische Polysialinsäurekapsel der ebenfalls Meningitis auslösenden MenB rief sowohl im Mensch (Wyle *et al.*, 1972) als auch in der Maus nur eine geringe bzw. keine detektierbare Antikörperantwort hervor (Moreno *et al.*, 1985). Die Expression der K1-Kapsel ist mit einer verringerten Opsonisierung und Bindung der Bakterien an Makrophagen sowie einer geringeren *in vitro*-Opsonophagozytose assoziiert (Mellata *et al.*, 2003b, Van Dijk *et al.*, 1979b, Weinstein & Young, 1978, Stevens *et al.*, 1980, Mellata *et al.*, 2003a, Pourbakhsh *et al.*, 1997b, Leying *et al.*, 1990). Dass die Verringerung bakterizider Serumeffekte allerdings nicht in allen K1-positiven Isolaten gleich stark ausfällt, hängt u.a. damit zusammen, dass nicht nur das Vorhandensein der K1-Kapsel selbst, sondern auch die Menge an gebildetem Polysaccharid einen Einfluss auf die *in vitro*-Opsonophagozytose besitzt: Je mehr K1-Kapsel von den Bakterien produziert wird, umso größer ist die Resistenz gegenüber der Opsonophagozytose und umso höher ist die Beeinträchtigung des alternativen Komplementweges (Bortolussi *et al.*, 1979, Bortolussi *et al.*, 1983, Van Dijk *et al.*, 1979a, Stevens *et al.*, 1980, Vermeulen *et al.*, 1988). Es gibt Hinweise, dass die effiziente Opsonisierung von *E. coli* K1 vor allem über den klassischen Komplementweg vermittelt wird (Wolberg & DeWitt, 1969, Aguero & Cabello, 1983, Bortolussi *et al.*, 1979, Bortolussi *et al.*, 1983). Komplement-inhibierende und anti-opsonophagozytische Eigenschaften anderer bakterieller Polysaccharidkapseln wurden bereits beschrieben (Cortes & Wessels, 2009, Pier *et al.*, 2001, Melin *et al.*, 2009). So schützt bspw. die zur K1- identische MenB-Kapsel vor der Komplement-vermittelten Lyse (Jarvis & Vedros, 1987, Vogel *et al.*, 1997).

Der Einfluss der K1-Kapsel auf die Pathogenese von *E. coli* wurde in verschiedenen Systemen untersucht. Im *in vivo*-Modell mit neugeborenen bzw. adulten Ratten sind *E. coli* K1-Stämme virulenter als nicht-K1-Stämme (Glode *et al.*, 1977, Bortolussi *et al.*, 1979), und das K1-Antigen ist nach Daten von Kim *et al.* der bestimmende Faktor für die Kolonisierung des Gehirns und damit für die Entwicklung einer Meningitis (Kim *et al.*, 1992). Auch in Zellkulturexperimenten mit humanen mikrovaskulären Gehirndothelzellen (*human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC) konnte gezeigt werden, dass K1-positive *E. coli*

zwar schlechter als Kapsel-negative Mutanten an HBMEC adhären, allerdings scheint die K1-Kapsel die Fusion *E. coli*-enthaltender Vakuolen (ECV, *E. coli* K1 containing vacuole) mit Lysosomen zu verhindern und damit das intrazelluläre Überleben der Bakterien zu erhöhen (Kim *et al.*, 2003), was auf eine Rolle der K1-Kapsel bei der Überquerung der BHS hindeutet. Die Besiedlung innerer Organe spezifisch pathogenfreier Hühner mit dem K1-Stamm MT78 war im Vergleich zu dessen K1-*knock out*-Mutante deutlich erhöht (Mellata *et al.*, 2003a), und auch *kpsMT*-Mutanten des APEC-Stammes IMT5155 waren im Vergleich mit dem die K1-Kapsel exprimierenden Wildtyp signifikant attenuiert (Li *et al.*, 2005). Alle fünf in 1-Tag alten Hühnern getestete *E. coli* K1-Isolate waren hochvirulent und führten zu einer Mortalitätsrate von 100% (Ngeleka *et al.*, 1996).

Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass neben dem K1-Antigen auch das O-Antigen eines *E. coli*-Isolats eine Rolle bei der Serumresistenz oder *in vivo*-Virulenz spielen kann (Hughes *et al.*, 1982, Vermeulen *et al.*, 1988, Mellata *et al.*, 2003b, Pluschke *et al.*, 1983, Pluschke & Achtman, 1984), was möglicherweise durch die Prävalenz einiger O:K-Typen in ExPEC-Infektionen widerspiegelt wird (s. 3.3.1.).

Je nach Studie trägt durchschnittlich ca. ein Fünftel der aus humanen Stuhlproben isolierten *E. coli*-Stämme das K1-Antigen (Tab. 3-1). Eine erhöhte Kolonisierung des GI-Traktes von neugeborenen Ratten wurde für K1-Stämme im Vergleich mit Stämmen des *E. coli*-Kapseltyps K100 gefunden, jedoch besiedelte ein K92-Isolat den GI-Trakt ebenso effektiv wie die K1-Stämme (Glode *et al.*, 1977). Mit Hilfe einer Mutantenbibliothek gewonnene Ergebnisse deuten nicht auf eine essentielle Funktion der K1-Kapsel bei der Besiedelung des Ratten GI-Traktes durch *E. coli* K1 hin (Martindale *et al.*, 2000).

Dem K1-Antigen kommen noch weitere Funktionen bei den Interaktionen von *E. coli* mit seinen spezifischen Umweltbedingungen zu. Im Vergleich zu K1-negativen Mutanten bzw. *E. coli* K12 bewirkt die K1-Kapsel eine Erhöhung der Adhärenz an sowie Invasion und Überleben in dem Einzeller *Acanthamoeba castellanii* (Jung *et al.*, 2007, Alsam *et al.*, 2006). Die *E. coli* K1-Kapsel stellt eine Barriere für den *E. coli*-spezifischen Bakteriophagen T7 dar und schützt das Bakterium vor einer Infektion durch diesen Phagen (Scholl *et al.*, 2005). Die Polysaccharide von Gruppe 2-Kapseln im Allgemeinen sind als für die *in vitro*-Biofilmbildung von verschiedenen gram-positiven und gram-negativen Bakterien inhibierend beschrieben worden (Valle *et al.*, 2006).

### 3.2.1.1. *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung

Die O-Acetylierung extrazellulärer Polysaccharide ist u. a. für einige *Neisseria meningitidis*-Serogruppen (Bhattacharjee *et al.*, 1975, Jennings *et al.*, 1977, Lemercinier & Jones, 1996),

*Staphylococcus aureus* (Fattom *et al.*, 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (Franklin & Ohman, 1993), Gruppe B-Streptokokken (Lewis *et al.*, 2004) sowie für den humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* (Cherniak *et al.*, 1980) beschrieben worden. Auch für *E. coli* konnte bereits 1979 gezeigt werden, dass das K1-Kapselpolysaccharid im Gegensatz zur strukturell identischen Kapsel von MenB (Liu *et al.*, 1971) phasenvariabel mit einer außerordentlich hohen Frequenz von 1:50 bis 1:20 O-acetyliert vorliegen kann (Orskov *et al.*, 1979). Die Modifizierung der Sialinsäuremonomere des K1-Kapselpolysaccharids mit O-Acetylgruppen erfolgt an den Hydroxygruppen der Kohlenstoffatome C7 und C9 (Orskov *et al.*, 1979). Trotz dieser Kenntnisse sowie der partiellen Aufreinigung des für die O-Acetylierung verantwortlichen Enzyms (Higa & Varki, 1988) war der molekulare Mechanismus der phasenvariablen K1-Kapsel O-Acetylierung lange unverstanden und konnte erst 2005 aufgeklärt werden (Deszo *et al.*, 2005). Bei dem für die O-Acetylierung der K1-Kapsel verantwortlichen Enzym handelt es sich um die O-Acetyltransferase NeuO (Deszo *et al.*, 2005), die zur Familie der NodL-LacA-CysE Hexapeptid-Acyltransferasen gehört (Downie, 1989, Vaara, 1992, Jenkins & Pickersgill, 2001). Am 5'-Ende von *neuO* befindet sich zwei Basen hinter dem Startcodon eine variable Anzahl von *Heptanucleotide-Tandem Repeats* (auch: „poly ( $\psi$ )-Motiv“) mit der Sequenz 5'-AAGACTC-3' (Deszo *et al.*, 2005). Solche *variable number of tandem repeats* (VNTR)-Loci sind sehr variable und instabile Bereiche in bakteriellen Genomen und besonders anfällig für das sog. „DNA-Slippage und Mismatching“, bei dem durch die DNA-Polymerase randomisiert *Repeats* eingefügt oder entfernt werden können. Durch diesen Prozess kann der Expressionsstatus des betreffenden Gens beeinflusst werden [Übersicht in: (van Belkum *et al.*, 1998)]. Auch die *Heptanucleotide-Repeats* in *neuO* bestimmen die Expression des Gens. Ist ihre Anzahl durch drei teilbar, kommt es zur vollständigen Translation, und funktionell aktives Protein wird gebildet (*on*-Phase). Ist die Anzahl der *Repeats* dagegen nicht durch drei teilbar, verhindert ein vorzeitiges Stoppcodon die Synthese des vollständigen (funktionellen) Proteins [(*off*-Phase) (Deszo *et al.*, 2005)]. Die Zunahme an *Heptanucleotide-Repeats* in *neuO* bewirkt dabei eine lineare Erhöhung der katalytischen Effizienz von NeuO (Bergfeld *et al.*, 2007). Als Akzeptoren des Enzyms sind Polysialinsäuremoleküle mit  $\geq 14$  Sialinsäureresten beschrieben (Higa & Varki, 1988, Bergfeld *et al.*, 2007). Für die NeuO-Enzymfunktion sind die Aminosäuren (AS) Histidin (an AS-Pos. 119) und Tryptophan (an AS-Pos. 143) essentiell (Bergfeld *et al.*, 2007). Neben der NeuO-abhängigen scheint es für *E. coli* K1 noch eine NeuO-unabhängige Möglichkeit der K1-Kapsel O-Acetylierung zu geben, die aber nur für

etwa 2% der O-acetylierten Sialinsäurereste verantwortlich sein soll (Steenbergen *et al.*, 2006) und daher für die vorliegende Arbeit zu vernachlässigen ist.

*NeuO* ist im Gegensatz zu den O-Acetyltransferasen der Meningokokken-Serogruppen A, C, W-135 und Y (Gudlavalleti *et al.*, 2004, Claus *et al.*, 2004) nicht in einem Kapselsynthesecluster lokalisiert, sondern befindet sich im Genom des lambdoiden Prophagen CUS-3 (Deszo *et al.*, 2005, Stummeyer *et al.*, 2006). Bei dem Phagen handelt es sich um ein etwa 40 kb großes genetisches Element, das in den *dsdC/argW*-Lokus von *E. coli* K1 integriert und 63 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) umfasst. *NeuO* ist in CUS-3 zwischen der Phagenendosialidase *siaK1* und der Phagenintegrase lokalisiert; *siaK1* befindet sich dabei am 5'-Ende, die Integrase am 3'-Ende von *neuO*. An die CUS-3 Integrase schließt sich der *E. coli* K1 *argW*-Lokus an (Deszo *et al.*, 2005, Stummeyer *et al.*, 2006, King *et al.*, 2007b). Mittels Mitomycinbehandlung von verschiedenen CUS-3-lysogenen *E. coli* K1 konnte die Freisetzung Podoviridae-ähnlicher Phagenpartikel aus den Bakterien induziert werden, die *in vitro* infektiös waren. Die Menge der freigesetzten Viruspartikel variierte zwischen den einzelnen Isolaten teilweise stark (King *et al.*, 2007b). Als CUS-3-Rezeptor gilt das K1-Kapselpolysaccharid, dessen  $\alpha$ -2,8-verknüpfte Polysialinsäure durch die an den Phagenschwanzenden („Tailspikes“) lokalisierte Endosialidase depolymerisiert werden kann (Stummeyer *et al.*, 2006, King *et al.*, 2007b). Das Vorhandensein einer Endosialidase ist eine gemeinsame Eigenschaft von K1-spezifischen Phagen, die ihre Wirtsspezifität bedingt (Hallenbeck *et al.*, 1987, Pelkonen *et al.*, 1989, Stummeyer *et al.*, 2006). Trotz der gleichen Wirtsspezifität lassen sich die lytischen *E. coli* K1-Phagen K1E und K1F mit CUS-3 aber nicht auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen. CUS-3 ist der erste beschriebene lysogene Phage, der ein Endosialidasegen codiert (Stummeyer *et al.*, 2006). Homologe für die meisten der 63 CUS-3-ORF finden sich in insgesamt sieben verschiedenen lambdoiden Phagen bzw. Phagenderivaten; eine große Nukleotidähnlichkeit besteht dabei zu dem lysogenen Coliphagen HK620 (Stummeyer *et al.*, 2006, King *et al.*, 2007b, Clark *et al.*, 2001). Mit HK620 sowie den ebenfalls lysogenen Phagen P22 sowie Sf6 verbindet CUS-3 das Vorhandensein von Rezeptor-modifizierenden Enzymen (s. u.). Im Gegensatz zu CUS-3 kodieren HK620, P22 und Sf6 aber keine Sialidasen, sondern Endorhamnosidasen, die spezifisch für das jeweilige Wirts-LPS (O-Antigen) sind (Stummeyer *et al.*, 2006).

Die Funktion der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung für den CUS-3 Prophagen oder das *E. coli* K1-Wirtsbakterium ist bislang nur unvollständig verstanden. Die Eigenschaft eines lysogenen Phagen, die Wirtsoberfläche durch Rezeptor-modifizierende Enzyme zu verändern („lysogene Konversion“), stellt eine Strategie zur Verminderung bzw.

Erschwerung von Superinfektionen mit homologen Phagen dar und konnte am Beispiel des *Shigella flexneri* Phagen Sf6 [(Gemski *et al.*, 1975) Übersicht in: (Allison & Verma, 2000)] sowie der *Salmonella typhimurium* Phagen A3 und A4 gezeigt werden (Wollin *et al.*, 1987). Die Verhinderung einer Superinfektion von *E. coli* K1 durch weitere Phagen als alleinige Bedeutung der NeuO-vermittelten K1-Kapsel O-Acetylierung ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die O-Acetylierung der K1-Kapsel nicht vor einem Abbau des Kapselpolysaccharids durch die mit dem Coliphagen E assoziierte Neuraminidase schützt (Tomlinson & Taylor, 1985), und auch CUS-3-lysogene Bakterien suszeptibel gegenüber dem lytischen, K1-spezifischen Phagen K1F sein sollen (King *et al.*, 2007b). Die hohe Phasenvariabilität der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung deutet vielmehr auf einen Mechanismus hin, der einen Einfluss auf die schnelle Anpassung von *E. coli* K1 an sich verändernde Umweltbedingungen besitzt [Übersicht in: (King *et al.*, 2007a)]. Auf Basis einer Studie mit Patienten, die an einer *E. coli* K1-Bakteriämie erkrankt waren wird vermutet, dass O-acetylierte *E. coli* K1-Stämme virulenter als nicht-O-acetylierte *E. coli* K1-Stämme sind, da schwerere Verläufe der Erkrankung sowie eine erhöhte Mortalität in mit O-acetylierten *E. coli* K1 infizierten Patienten beobachtet wurden (Frasa *et al.*, 1993). Im neonatalen Mausmodell konnte *E. coli* K1 der Erkennung durch exogen zugegebene, gegen nicht-O-acetyliertes Polysaccharid gerichtete Antikörper über die O-Acetylierung seiner Kapsel entgehen. Auf die Virulenz der Bakterien an sich hatte die O-Acetylierung im Vergleich mit nicht-O-acetylierten *E. coli* K1 in diesem Modell allerdings keinen Effekt (Colino & Outschoorn, 1999). Aus dem Blut von mit *neuO*-positiven *E. coli* K1 infizierten 2-Tage alten Ratten wurden fast ausschließlich nicht-O-acetylierte *E. coli* K1-Varianten (*neuO*-off-Phase) isoliert (Zelmer *et al.*, 2008).

### **3.3. *E. coli*-Typisierungsmethoden**

Im Folgenden werden phänotypische sowie genotypische Methoden zur *E. coli*-Typisierung vorgestellt, wobei besonders auf die in dieser Arbeit genutzte Multilokus-Sequenztypisierung (s. 3.3.3.) eingegangen werden soll.

#### **3.3.1. *E. coli*-Serotypisierung**

Eine weitverbreitete Methode zur Typisierung von *E. coli*-Stämmen ist die Serotypisierung, die auf Arbeiten von F. Kauffmann aus der Mitte des 19. Jahrhunderts zurückgeht, und die u. a. Anwendung in der serologischen Diagnostik findet. *E. coli*-Isolate werden dabei auf Basis ihrer O-, K- und H (Flagellen)-Oberflächenantigene phänotypisch klassifiziert [Übersicht in: (Orskov *et al.*, 1977, Hartl & Dykhuizen, 1984)]. Über 180 O-, 80 K- und 60

H-Antigene werden für *E. coli* angegeben (Whitfield & Roberts, 1999, Robins-Browne & Hartland, 2002, Stenutz *et al.*, 2006). Trotz der großen Diversität innerhalb der Antigene können einige spezifische Kombinationen mit bestimmten klinischen Erkrankungsbildern assoziiert werden. So weisen etwa 50% aller K1-positiven *E. coli* Isolate aus Neugeborenen-Meningitis die O-Antigene O18 oder O7 auf [(Klone O7:K1 bzw. O18:K1) (Sarff *et al.*, 1975)]. Auch weitere O-Antigene wie bspw. O1 oder O2 konnten als mit dem K1-Antigen assoziiert beschrieben werden (Korhonen *et al.*, 1985, Devine *et al.*, 1989). Die Klone O1:K1, O2:K1 sowie O18:K1 kommen auch bei APEC-Isolaten vor (Achtman *et al.*, 1986, Moulin-Schouleur *et al.*, 2007, Ewers *et al.*, 2007).

### 3.3.2. *E. coli*-Referenzstammsammlung und Multilokus-Enzymelektrophorese

Bei der *E. coli*-Referenzstammsammlung (*E. coli reference collection*, EcoR) handelt es sich um eine Zusammenstellung von 72 *E. coli*-Isolaten, die aus insgesamt 2600 *E. coli*-Isolaten ausgewählt wurden und die genetische Diversität der Spezies repräsentieren sollen (Ochman & Selander, 1984). Mittels Multilokus-Enzymelektrophorese (*multilocus enzyme electrophoresis*, MLEE) konnte gezeigt werden, dass die EcoR-Isolate in vier phylogenetische Hauptgruppen (A, B1, B2 und D) eingeteilt werden können (Herzer *et al.*, 1990). Neben der MLEE kann auch ein PCR-Schema (Clermont *et al.*, 2000) zur Einteilung von *E. coli*-Isolaten in die phylogenetischen Gruppen verwendet werden. Humane ExPEC-Isolate sind vor allem mit Gruppe B2 und in geringerem Ausmaß mit Gruppe D assoziiert (Johnson *et al.*, 2002, Bingen *et al.*, 1998, Picard *et al.*, 1999, Ewers *et al.*, 2007, Moulin-Schouleur *et al.*, 2007, Rodriguez-Siek *et al.*, 2005a). Die Gruppen A und B1 werden dagegen eher selten bei humanpathogenen *E. coli*-Isolaten gefunden, allerdings werden kommensale Stämme vornehmlich in diese Gruppen eingeordnet (Duriez *et al.*, 2001). APEC-Isolate fallen vor allem in die Gruppen A und B2 (Ewers *et al.*, 2007, Ewers *et al.*, 2009). *E. coli* K1-Isolate machen einen großen Anteil der phylogenetischen Gruppe B2 aus (Bingen *et al.*, 1998, Wirth *et al.*, 2006).

### 3.3.3. Multilokus-Sequenztypisierung

Die Multilokus-Sequenztypisierung („*multilocus sequence typing*“, MLST) ist eine auf DNA-Sequenzen basierende Typisierungsmethode zur Charakterisierung verschiedener Bakterien- und Pilzspezies, die erstmals 1998 für *Neisseria meningitidis* vorgestellt wurde (Maiden *et al.*, 1998). Die MLST kann mittlerweile als eine der am häufigsten genutzten Methoden zur Typisierung und phylogenetischen Analyse verschiedener Spezies angesehen werden, was

u. a. durch über 1450 Einträge zum Thema „*multilocus sequence typing*“ in Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) unterstrichen wird (Stand: 14.12.2009).

Bei der MLST werden Sequenzdaten von DNA-Fragmenten (ca. 400-600 bp) aus sechs bis neun konservierten Haushaltsgenen („*housekeeping genes*“) ermittelt. Die Sequenzen der Haushaltsgenfragmente sind phylogenetisch informativ und erlauben die eindeutige Zuordnung von Isolaten zu sog. Sequenztypen (ST). Genetische Ähnlichkeiten zwischen Isolaten können festgestellt und verwandte Isolate zu Sequenztyp-Komplexen (STC) zusammengefasst werden [(s. Abb. 3-2 und Erklärungen) Übersicht in: (Maiden, 2006)].

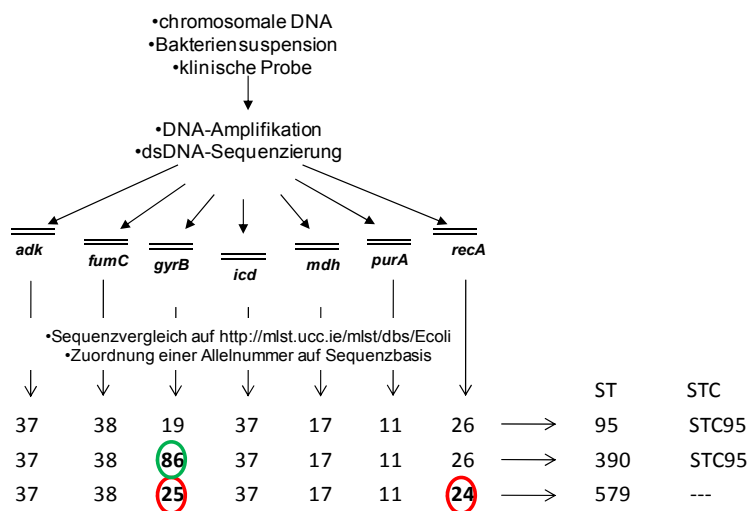


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der MLST am Beispiel von *E. coli* nach Wirth *et al.*, 2006.

Für die *E. coli*-MLST werden sieben interne Haushaltsgenfragmente des zu untersuchenden Isolats mittels PCR aus der vorliegenden Probe amplifiziert. Die mittels Doppelstrang (ds)-Sequenzierung erhaltenen Nukleotidabfolgen werden mit den Sequenzen in der frei zugänglichen Datenbank <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli> verglichen. Die Kombination der erhaltenen Allelnummern ergibt einen Sequenztyp (ST). In Sequenztyp-Komplexen (STC) werden nahe verwandte *E. coli*-Isolate zusammengefasst, die nur in einem Locus von dem „Gründer-ST“ („*founder-ST*“, hier der ST95) abweichen (grüner Kreis, ST390); ST mit zwei oder mehr ungleichen Loci werden diesem STC nicht zugeordnet (rote Kreise, ST579).

Für die MLST sind weder Isolation noch Kultur des zu typisierenden Organismus zwingende Voraussetzungen, und die mittels MLST erhaltenen Daten sind reproduzierbar und zwischen verschiedenen Labors über das Internet leicht auszutauschen [(Maiden *et al.*, 1998) Übersicht in: (Urwin & Maiden, 2003, Maiden, 2006)]. Die MLST bietet zudem die Möglichkeit, umfangreiche Internet-Datenbanken und virtuelle Stammsammlungen zu erstellen. Insgesamt sind mittlerweile rund 55 MLST-Sequenzierschemen entwickelt worden, und die zugehörigen Datenbanken sind auf <http://pubmlst.org/databases.shtml> verfügbar. Die größte virtuelle



Stammsammlung, die Meningokokken-Datenbank (Jolley *et al.*, 2004), umfasst etwa 14000 Isolate und mehr als 7900 ST [(Stand: 14.12.2009) (<http://pubmlst.org/neisseria/>)].

Die MLST ermöglicht eine hohe Diskriminierung zwischen Isolaten. Zudem ist das Allelprofil eines Isolates über die Zeit relativ stabil, da die Akkumulation von Nukleotidaustauschen in den MLST-Loci ein eher langsamer Prozess ist. Daher ist die MLST für globale Analysen gut geeignet (Enright & Spratt, 1999). Die MLST wurde bisher für verschiedenste Anwendungen herangezogen, wie zur Aufklärung bakterieller Populationsstrukturen, für die molekulare Epidemiologie u. a. von Krankheitsausbrüchen, für Verteilungsstudien von Virulenzfaktoren sowie für Studien über die Evolution von Bakterien [Übersicht in: (Maiden, 2006)], für die im Folgenden einige Beispiele gegeben werden sollen. Die mittels DNA-Sequenztypisierung erhaltenen Informationen konnten zur Aufklärung der phylogenetischen Geschichte von *Salmonella enterica* (Boyd *et al.*, 1996) genutzt werden. Mit Hilfe der Sequenztypisierung von Isolaten des strikt mit dem Menschen assoziierten Magenpathogens *Helicobacter pylori* aus fast allen Teilen der Welt konnten Migrationsbewegungen des Menschen zuverlässig nachvollzogen werden (Falush *et al.*, 2003, Linz *et al.*, 2007). Über die Sequenztypisierung von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, zwei eng verwandten Arten, konnte sogar ein aktuell voranschreitender Despeziationsprozess identifiziert werden, der unter Annahme gleichbleibender Umweltbedingungen zur Verschmelzung beider Spezies zu einer Art führen könnte (Sheppard *et al.*, 2008). Für *Mycobacterium tuberculosis* (Baker *et al.*, 2004) und die *Bacillus cereus*-Gruppe (Priest *et al.*, 2004) konnten mittels Sequenztypisierung klonale, homogene Populationsstrukturen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind Pneumokokken und Meningokokken aufgrund von hohen Rekombinationsraten (Smith *et al.*, 1993, Jolley *et al.*, 2000) nur schwach klonale Spezies, in denen jedoch trotzdem mittels MLST klonale, eng verwandte Gruppen (oft hypervirulenter Isolate) detektiert werden konnten (Maiden *et al.*, 1998, Enright & Spratt, 1998, Yazdankhah *et al.*, 2004).

#### 3.3.3.1. *E. coli*-Multilokus-Sequenztypisierung

Für *E. coli* wurden verschiedene MLST-Schemen veröffentlicht (Adiri *et al.*, 2003, Noller *et al.*, 2003, Beutin *et al.*, 2005, Nemoy *et al.*, 2005, Wirth *et al.*, 2006). Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte *E. coli* MLST-Schema (vgl. Abb. 3-2) wurde von Mark Achtman und Mitarbeitern entwickelt (Wirth *et al.*, 2006), und ist, ebenso wie die virtuelle *E. coli*-Datenbank mit über 2800 Isolaten und 1550 ST (Stand: 14.12.2009), auf <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli> verfügbar.

Mit Hilfe der MLST lässt sich die *E. coli*-Population entsprechend den phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D auflösen (Johnson *et al.*, 2006a). Neben den vier phylogenetischen *E. coli*-Hauptgruppen wurde durch die Ergebnisse der MLST auch die Existenz der sog. „Hybrid-Gruppen“ A×B1 und ABD postuliert, in denen *E. coli*-Isolate zusammengefasst werden, die auf die verschiedenen phylogenetischen Hauptgruppen zurückführbare Polymorphismen in ihren MLST-Haushaltsgenen besitzen (Wirth *et al.*, 2006).

Dem auf Basis der MLST von M. Achtman und Mitarbeitern definierten ST95-Komplex (STC95) kann ein Großteil der ExPEC-Isolate der *E. coli*-MLST-Datenbank zugeordnet werden, darunter Isolate aus humanen HWI, humaner Neugeborenen-Meningitis und Bakteriämie sowie aus aviärer Coliseptikämie. Der STC95 umfasst aber auch *E. coli*-Isolate aus asymptomatischem Trägertum (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). Stämme aus dem STC95 lassen sich vor allem der phylogenetischen Hauptgruppe B2 zuordnen. Der STC95 beinhaltet u. a. die *E. coli*-Isolate mit den O:K-Kombinationen O1:K1, O2:K1 und O18:K1 (Wirth *et al.*, 2006). *E. coli* K1-positive Isolate lassen sich mit dem STC95 assoziieren, auch wenn die Präsenz der K1-Kapsel nicht ausschließlich auf diesen Komplex beschränkt ist (Weissman *et al.*, 2006, Wirth *et al.*, 2006).

Verteilungsstudien in sequenztypisierten *E. coli*-Populationen wurden unter unterschiedlichen Gesichtspunkten durchgeführt. Das Auftreten und die Verbreitung eines neuen, multiresistenten *E. coli*-Klons (O25:H4/ST131) in verschiedenen Ländern, der den CTX-M-15 Typ der erweiterten Spektrum  $\beta$ -Laktamasen (*extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*) bildet, wurde in den letzten Jahren mittels MLST verfolgt (Coque *et al.*, 2008, Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008, Yumuk *et al.*, 2008, Blanco *et al.*, 2009). Der Erwerb verschiedener Virulenzfaktoren wie des EHEC-Plasmids und Shigatoxin-kodierender Phagen (Reid *et al.*, 2000) oder des *locus of enterocyte effacement* [(LEE) (Lacher *et al.*, 2007)] durch *E. coli* unterschiedlicher ST und STC konnte gezeigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass keine der untersuchten pathogenen *E. coli*-Linien ausschließlich auf einen ST festgelegt ist und in verschiedenen, nicht verwandten STC gefunden werden kann (Wirth *et al.*, 2006). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Virulenzfaktoren in der *E. coli*-Population zu verschiedenen Zeitpunkten und unabhängig von einem speziellen ST erworben werden konnten.

#### **3.4. ExPEC-Zoonose-Potential und ExPEC-Reservoir**

Bereits 1986 wurde die Ähnlichkeit zwischen manchen humanen und aviären ExPEC-Isolaten auf Basis ihrer äußeren Membranproteine und weiterer phänotypischer Merkmale gezeigt, und

einige der untersuchten Stämme ließen sich nur anhand ihres Plasmidgehalts unterscheiden (Achtman *et al.*, 1986). Auch einige genotypische Merkmale von aviären und humanen O45:K1 ExPEC-Isolaten unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Ott *et al.*, 1991). Ewers *et al.* konnten zwar bestimmte Kombinationen Virulenz-assoziiierter Gene vermehrt in APEC-, UPEC- oder NMEC-Stämmen beobachten, eine Zuordnung von ExPEC-Stämmen zu einer der ExPEC-Gruppen auf Basis ihres Virulenzgenmusters war aber nicht möglich (Ewers *et al.*, 2007). Die Genome von zwei APEC-Stämmen (STC95) und zwei UPEC-Stämmen (STC73) wurden kreuzhybridisiert und mit der Methode der *Supression Subtractive Hybridization* gegeneinander analysiert (Kariyawasam *et al.*, 2007). Es konnten 85 bzw. 51 Genomfragmente (*subtractive fragment*, SF) identifiziert werden, die nur in den zwei APEC- bzw. den zwei UPEC-Stämmen vorkamen. Mittels SF-spezifischer PCR 95 weiterer APEC- und UPEC-Stämmen konnte dann jedoch gezeigt werden, dass keines der Fragmente ausschließlich in APEC- oder UPEC-Isolaten vorkam (Kariyawasam *et al.*, 2007). Auch von 524 bzw. 500 APEC- und 200 bzw. 500 UPEC-Stämmen wurden Merkmale wie Serogruppe, phylogenetische Gruppe und Präsenz Virulenz-assoziiierter Gene verglichen (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005a, Johnson *et al.*, 2007). Dadurch konnte ein Großteil an APEC-Isolaten von den UPEC-Isolaten abgegrenzt werden. Dennoch konnten in beiden Studien einige APEC- und UPEC-Stämmen identifiziert werden, die bezüglich der untersuchten Virulenzmerkmale kaum oder gar nicht voneinander zu unterscheiden waren (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005a, Johnson *et al.*, 2007). Eine Untergruppe nicht zu diskriminierender APEC-, NMEC- und UPEC-Stämme wurde auch in einer Studie von Moulin-Schouleur *et al.* beschrieben. In ihrer Auswahl von 39 APEC- und 51 humanen ExPEC-Isolaten fand sich eine homogene Gruppierung K1-positiver, humaner und aviärer Stämme aus der phylogenetischen Gruppe B2, die in den gleichen STC eingeordnet wurden. Auch durch ihren Gehalt an Virulenz-assoziierten Genen grenzten sich die Isolate nicht signifikant voneinander ab (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). Solch eine Untergruppe sehr ähnlicher aviärer und humaner ExPEC-Isolate wurde zudem in der Studie von Johnson *et al.*, identifiziert, deren Isolate zu einem Großteil dem STC95 angehörten (Johnson *et al.*, 2008). Eine hohe Ähnlichkeit auf Nukleotid- und Proteinebene konnte anhand der Genomsequenzierung des APEC-Isolats APEC O1 mit den Genomen der sequenzierten humanen ExPEC-Stämme CFT073 (Welch *et al.*, 2002), 536 (Hochhut *et al.*, 2006), UTI89 (Chen *et al.*, 2006) und RS218 (Xie *et al.*, 2006) festgestellt werden (Johnson *et al.*, 2007). Einige K1-positive humane ExPEC-Isolate aus der phylogenetischen Gruppe B2 waren für 3,5-Wochen alte, spezifisch pathogenfreie Hühner hochvirulent und lösten wie die getesteten APEC-Isolate eine aviäre Coliseptikämie aus (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). Es lässt sich

festhalten, dass zumindest einige humane und aviäre ExPEC-Stämme einander sehr ähnlich sind und über ein hohes zoonotisches Potential zu verfügen scheinen. Ein Hinweis auf eine Wirtsspezifität dieser *E. coli* (K1)-Stämme ist nicht gegeben.

1983 konnten M. Achtman und seine Mitarbeiter das Vorkommen der „archetypischen, hochvirulenten“ Klone O7:K1 und O18:K1 bei gesunden Personen als auch bei erkrankten Patienten beschreiben (Achtman *et al.*, 1983). Auch in einer weiteren Studie konnte das Vorhandensein u. a. von Klon O18:K1 im Stuhl gesunder Neugeborener, Kinder und Frauen detektiert werden (Sarff *et al.*, 1975, Bettelheim *et al.*, 2003). Für einen Vergleich von aus Coliseptikämie und aus dem Stuhl gesunder Vögel isolierten *E. coli* wurde das Vorhandensein von insgesamt zwölf Virulenz-assoziierten Genen untersucht. Keines der untersuchten Gene war ausschließlich mit Isolaten aus Coliseptikämien assoziiert, sondern konnte auch in Fäkalisolaten identifiziert werden (McPeake *et al.*, 2005). Aus dem Darm gesunder Kinder isolierte *E. coli* K1-Stämme waren weder bezüglich ihrer Virulenz im Mausmodell noch aufgrund weiterer phänotypischer Merkmale von einigen aus adulter Bakteriämie isolierten *E. coli* K1-Isolaten unterscheidbar (Wullenweber *et al.*, 1993). Sowohl fäkale aviäre *E. coli*-Isolate als auch APEC-Stämme konnten den gleichen ST bzw. STC zugeordnet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass einige aus den Stuhlproben gesunder Vögel isolierte *E. coli*-Stämme eine systemische Erkrankung in 5-Wochen alten Hühnern auslösten (Ewers *et al.*, 2009). Da einige *E. coli* (K1)-Isolate aus dem GI-Trakt von gesunden Menschen und Tieren weder serotypisch noch genotypisch von ExPEC-Isolaten zu unterscheiden sind und zudem im Tiermodell Erkrankungen auslösen können, muss der GI-Trakt von gesunden Menschen und Vögeln als Reservoir für ExPEC-Stämme angenommen werden.

### **3.5. Zielsetzung**

Der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *Escherichia coli* K1 ist das K1-Kapselpolysaccharid, das phasenvariabel mit O-Acetylgruppen modifiziert werden kann. Die Verteilung des für die O-Acetylierung verantwortlichen Gens *neuO* innerhalb einer genotypisch charakterisierten *E. coli* K1-Population, sowie die evolutionäre Beziehung zwischen dem *neuO*-kodierenden Prophagen CUS-3 und seinem Wirt *E. coli* K1 waren zu Beginn dieser Arbeit kaum bekannt. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit eine Stammsammlung aus humanen und aviären *E. coli* K1 aufgebaut und mit der MLST typisiert werden. Die Verteilung von *neuO* innerhalb dieser Stammsammlung sollte mit Hilfe von PCR und DNA-Hybridisierung untersucht und das Gen im Hinblick auf 5'-*Heptanucleotide-Repeats*, Allelvariante und chromosomale Lokalisation charakterisiert werden. Die Sequenzdaten sollten verwendet

werden, um die evolutionäre Beziehung zwischen dem Wirtsbakterium *E. coli* K1 und dem Prophagen CUS-3 zu studieren. Des Weiteren sollten diese Informationen für einen Vergleich aviärer und humaner Isolate herangezogen werden. Auch die funktionelle Relevanz der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung war zu Beginn der vorliegenden Arbeit größtenteils unverstanden. Die pathogenetische Rolle der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung sollte in Zellkulturversuchen sowie im Hühnerinfektionsmodell untersucht werden. Aufschluss über die Bedeutung der K1-Kapsel O-Acetylierung für die Besiedelung des GI-Traktes sollten Hühnerkolonisierungsexperimente geben. Zudem sollte die biologische Relevanz der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung in *in vitro*-Biofilm- und Austrocknungsexperimenten analysiert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Geräte und Hilfsmittel

Analysewaage	Mettler Toledo, Gießen
Brutschrank Heraeus B5060 EK-CO <sub>2</sub>	Thermo Scientific, Karlsruhe
Brutschrank Heraeus B6200	Thermo Scientific, Karlsruhe
DNA-Sequenzierer ABI3100 und ABI3130	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Elektrophoresekammer für Agarosegel H6-Set	Herolab, Wiesloch
Elektrophoresekammer für Agarosegel Sub-Cell GT	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät (Pulse Controller & Gene-Pulser)	Bio-Rad, München
ELISA-Reader/Platten-Photometer MultiScan EX	ThermoLabsystems, Vantaa, Finnland
ELISA-Waschgerät Nunc-Immunowash 12	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Entwicklungsmaschine AGFA Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Feinwaage R 160 P	Sartorius, Göttingen
Filmkassette X-omatic	Kodak, Rochester, NY, USA
Geldokumentationsanlage UVT-28 MP	Herolab, Wiesloch
Homogenisierer Ultra-Turrax T25	IKA-Labortechnik, Staufen
Hybridisierungsöfen OV5	Biometra, Göttingen
Koloniezähler ProtoCOL	Synbiosis, Cambridge, UK
Kühlzentrifugen: Megafuge1.0 & 1.0R, Biofuge15R, RCB5 und RC5Bplus, mit Rotoren bzw. Einsätzen	Thermo Scientific, Karlsruhe
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer RCT basic IKAMAG	IKA, Staufen
mikrobiologische Sicherheitswerkbänke Gelaire, Klassik	Flow Laboratories, Meckenheim
Mikrowelle MWS1820 Duo	Bauknecht, Bielefeld
Nanodrop 1000	peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Maschine GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR-Maschinen Personal Cycler & TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
pH-Meter 530	WTW, Weilheim

Photometer CO8000	Biochrom WPA, Cambridge, UK
Schüttler PheroShaker	Klein, Würzburg
Schüttelinkubator Certomat H/R/U	B. Braun Biotech, Melsungen
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Spannungsgerät 3000Xi	Bio-Rad, München
Spannungsgerät PowerPack P25	Biometra, Göttingen
Temperatur-Feuchtlogger TA120	Dostmann, Wertheim
Thermoblock Grant	Grant Instruments, Cambridge, UK
Thermocycler Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg
Tischzentrifuge Biofuge15	Heraeus, Hanau
Ultraschalleinheit: Becher-Resonator aus Titan	Branson, Urdorf, Schweiz
Ultraschalleinheit: Kühleinheit	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Ultraschalleinheit: Schallschutzkammer	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Ultraschallgerät Branson Sonifier 450	Branson, Urdorf, Schweiz
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuumpumpe	Ilmvac, Ilmenau
Vakuumverdampfer SpeedVac plus SC110A	Savant, Holbrook, NY, USA
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad SW20	Julabo, Seelbach

#### **4.2. Verbrauchsmaterialien**

96-Well Mikrotiterplatte (für Sequenzierreaktionen)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
96-Well Mikrotiterplatte (für PCR-Reaktionen)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Sarstedt, Nümbrecht und Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Elektroporationsküvetten	Eurogentec, Seraing, Belgien
Röntgenfilm Super RX	Fuji Film, Düsseldorf
Plastikröhrchen, steril (12 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
PP-Röhrchen, steril (15 ml & 50 ml)	

96-Well Mikrotiterplatte (high-binding für ELISA)	
Glasplättchen (Deckgläschen) Ø 15 mm	Hartenstein, Würzburg
Dispensertips (0,5 ml; 2,5 ml; 5 ml)	
Objektträger, 75 × 25 × 1 mm	
Whatman-Filterpapier -dünn-	
Hühnertrockenkot	A. Knoll GmbH, Geeste-Bramhaar
Nylonmembran <i>parablot NY plus</i> , positiv geladen	Macherey & Nagel, Düren
Nylonmembran <i>parablot NY plus</i> , rund, Ø 82 mm	
Einfrierröhrchen (1 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
24-Well Mikrotiterplatte	
96-Well Mikrotiterplatte (Flachboden)	
75 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	
Nitrocellulosemembran, rund, Ø 82 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilter (0,2 µm)	
Whatman-Filterpapier -dick-	
<b>4.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme</b>	
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
HiDi	
Sequenzierpuffer (5×)	
Bakto-Agar	Becton & Dickinson, Heidelberg
Bakto-Trypton	
Hefeextrakt	
Nu-Serum	
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin



Heparin	
L-Glutamin	
MEM-Vitamine	
Natriumpyruvat	
Kristallviolett	Difco Laboratories, Augsburg
DNA-Marker Smart-Ladder	Eurogentech, Seraing, Belgien
Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGS)	Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Standard I Nährbouillon	
Sodiumdodecylsulfat (SDS), UltraPure	MP Biomedicals, Eschwege
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm („CIP“; 10 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsenzyme mit 10× Reaktionspuffer	
T4-DNA-Ligase (400 U/μl) mit 10× Reaktionspuffer	
T4-DNA-Polymerase I (3 U/μl)	
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl) mit 10× Reaktionspuffer	
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Set	Peqlab, Erlangen
QIAGEN <i>Genomic-tip</i> 100/G	Qiagen, Hilden
QIAprep <i>Spin Miniprep Kit</i>	
QIAquick PCR <i>Purification Kit</i>	
QIAquick <i>Gelextraction Kit</i>	
ABTS-Substrattabletten und ABTS-Substratpuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Blockierungsreagenz	
DNA-Polymerase Klenow-Fragment (2 U/μl)	
DIG (Digoxigenin) Luminescent Detection Kit (CSPD-System)	
DIG-markierte Kontroll-DNA	
DIG-markierte Molecular Weight Marker III & VII	
dNTP-Markierungsgemisch	
Hexanukleotid-Gemisch	
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0	
Proteinase K	
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	
Lysozym	Serva, Heidelberg

Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenglykol (PEG) 8000	
RNase A	
Sarcosyl (N-Lauroyl-Sarcosinat)	
PfuUltra DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l) mit 10 $\times$ Reaktionspuffer	Stratagene, La Jolla, CA, USA

Weitere verwendete Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

#### 4.4. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht explizit anders aufgeführt, mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) angesetzt.

Natriumphosphatpuffer für high SDS	$\frac{1}{4}$ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\frac{3}{4}$ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0
PBS [( <i>Phosphate buffered saline</i> ) (ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )]	Biochrom, Berlin
Stammlösung SSC (20 $\times$ )	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
Stammlösung SSPE (20 $\times$ )	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM EDTA 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3,6 M NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA

#### 4.5. Bakterienkultur

##### 4.5.1. Wachstumsbedingungen, Bakterienstämme und Plasmide

*E. coli*-Stämme wurden über Nacht bei 37° C entweder auf LB-Agarplatten im Brutschrank (B6200) oder in LB-Medium schüttelnd bei 200 rpm im Inkubator (Certomat H/R/U oder G25) angezogen. Zur Anzucht rekombinanter Bakterienstämme wurden dem Medium stets entsprechende Konzentrationen an Antibiotika (s. 4.5.5.) zugegeben. Informationen zu den im Verlauf dieser Arbeit gesammelten und untersuchten *E. coli*-Stämmen sind 5.1.1.1. sowie

Tabellen 8-1 und 8-2 zu entnehmen. Gentechnisch veränderte Bakterienstämme sind in Tab. 4-1 aufgelistet. Über die verwendeten Plasmide gibt Tabelle 4-2 Auskunft. Der NMEC-Prototyp-Stamm *E. coli* K1 RS218 (O18:K1:H7, ST95), 1974 isoliert von einem an Meningitis erkrankten humanen Neugeborenen (Silver *et al.*, 1980, Achtman *et al.*, 1983), ist *neuO*-positiv (Deszo *et al.*, 2005) und wurde von Ulrich Dobrindt, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg, bereitgestellt. Für Klonierungen wurden die *E. coli* K12-Laborstämme DH5 $\alpha$  und SM10 $\lambda$ pir verwendet.

Tabelle 4-1: Gentechnisch veränderte *E. coli*-Stämme und die jeweiligen Wildtypen.

WUE-ID/ δ-Nr.*	Organismus	Sequenztyp** (Elternstamm)	Verwendung/ Genotyp	Plasmid	Kapsel***	Referenz/ Quelle
3890	SM10λpir	n.b.	Klonierungen	pMHH1	K12	(Gunzer <i>et al.</i> , 1998)
3993	SM10λpir	n.b.	DNA-Transfer	pIM1	K12	diese Arbeit
4168	DH5α	n.b.	DNA-Sequenzierung	pIM4	K12	diese Arbeit
3227	A160	141	Wildtyp (WT)	---	K1/oac <sup>-</sup>	M. Achtman
3404		(3227)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A	K1/oac <sup>+</sup>	H. Claus
3504		(3227)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A	K1/oac <sup>-</sup>	H. Claus
3827	IMT9579	95	WT	---	K1/pv	C. Ewers/L. Wieler
3864		(3827)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A-Kan <sup>R</sup>	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
3865		(3827)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A-Kan <sup>R</sup>	K1/oac <sup>+</sup>	diese Arbeit
3834	IMT5155	140	WT	---	K1/pv	C. Ewers/L. Wieler
3990		(3834)	Δ <i>neuO</i>	---	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
3991		(3990)	Δ <i>neuO</i> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A	K1/oac <sup>+</sup>	diese Arbeit
3992		(3990)	Δ <i>neuO</i> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
3384	RS218	95	WT	---	K1/pv	U. Dobrindt
4038		(3384)	Δ <i>neuO</i>	---	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4039		(4038)	Δ <i>neuO</i> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A	K1/oac <sup>+</sup>	diese Arbeit
4040		(4038)	Δ <i>neuO</i> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
δ36	δ36	141	WT	---	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4244		(δ36)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A-Kan <sup>R</sup>	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4245		(δ36)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A-Kan <sup>R</sup>	K1/oac <sup>+</sup>	diese Arbeit
δ2	δ2	59	WT	---	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4367		(δ2)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A-Kan <sup>R</sup>	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4368		(δ2)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A-Kan <sup>R</sup>	K1/oac <sup>+</sup>	diese Arbeit
δ41	δ41	59	WT	---	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4494		(δ41)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218/H119A</sub>	p4A:H119A	K1/oac <sup>-</sup>	diese Arbeit
4495		(δ41)	<i>neuO</i> <sup>-</sup> , <i>neuO</i> <sub>RS218</sub>	p4A	K1/oac <sup>+</sup>	diese Arbeit

\*Nummern entsprechend der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) Würzburg. \*\*n.b.: nicht bestimmt. \*\*\*oac<sup>-</sup>: K1-Kapsel nicht-O-acetyliert; oac<sup>+</sup>: K1-Kapsel O-acetyliert; pv: O-Acetylierung der K1-Kapsel aufgrund endogen in den Stämmen enthaltenem *neuO* phasenvariabel.

Tabelle 4-2: Verwendete Plasmide.

Plasmid (WUE-ID*)	Verwendung/klonierte DNA	Resistenz	Referenz/Quelle
pBluescript <sup>®</sup> II SK(+) (pBS)	Klonierungsvektor	Amp	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pUC19	Klonierungsvektor	Amp	Fermentas, St. Leon-Rot
pQE32	Klonierungsvektor	Amp	QIAGEN, Hilden
pUC4K	Klonierungsvektor mit Kanamycin-Resistenz-Kassette	Amp, Kan	GE Healthcare, München
pBS/CAT	CAT-Kassette aus pTnMax5 in pBS	CM	(Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pMHH1 (3890)	Suizidvektor	Amp	(Gunzer <i>et al.</i> , 1998)
pIM1 (3993)	CAT-Kassette zwischen 5'-(IM14/15) und 3'-Bereich (IM16/17) von <i>neuO</i> in pMHH1	Amp, CM	diese Arbeit
pIM3 (4049)	CAT-Kassette zwischen 5'-(IM14/15) und 3'-Bereich (IM16/17) von <i>neuO</i> in pUC19	Amp, CM	diese Arbeit
pIM4 (4168)	<i>argW</i> -Lokus aus <i>E. coli</i> K1 RS176 in pBluescript <sup>®</sup> II SK(+)	Amp	diese Arbeit
p4A (3502)	<i>neuO</i> aus RS218 ohne 5'- <i>Heptanucleotide-Repeats</i> in pQE32	Amp	(Bergfeld <i>et al.</i> , 2007)
p4A:H119A (3503)	<i>neuO</i> aus RS218 mit Austausch Histidin119Alanin ohne 5'- <i>Heptanucleotide-Repeats</i> in pQE32	Amp	(Bergfeld <i>et al.</i> , 2007)
p4A-Kan <sup>R</sup> (3867)	p4A mit Austausch Amp- gegen Kan-Resistenz	Kan	diese Arbeit
p4A:H119A-Kan <sup>R</sup> (3866)	p4A:H119A mit Austausch Amp- gegen Kan-Resistenz	Kan	diese Arbeit

\*Nummern entsprechend der Stammsammlung des IHM Würzburg.

#### 4.5.2. Isolierung von *E. coli*

Stuhlproben von gesunden Freiwilligen wurden auf MacConkey-Agar ausgestrichen, um Laktose-fermentierende *E. coli* identifizieren zu können. Pro Isolat wurden zehn Kolonien zusätzlich auf Citrat-Agar überimpft, um ebenfalls Laktose-positive *Klebsiella*-Spezies auszuschließen: Nur die Citrat-verstoffwechselnden Klebsiellen verfärben den Agar über einen pH-Indikator, nicht aber die Citrat-negativen *E. coli*. Laktose-positive, Citrat-negative Stämme wurden in die Stammsammlung des IHM Würzburg eingefroren und mit MAC bezeichnet (Tab. 8-1). Aus Urin, Blutkultur und Cervixabstrichen isolierte *E. coli* wurden aus der diagnostischen Abteilung des IHM Würzburg bezogen. Diese Stämme wurden, ebenfalls mit MAC bezeichnet, in die Stammsammlung eingelagert. Eine Einzelkolonie wurde pro Isolat bezüglich der K1-Kapsel Expression analysiert (s. 4.18.2).

#### 4.5.3. Kryokonservierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme, die dauerhaft gelagert werden sollten, wurden mit einem Wattetupfer von einer dicht bewachsenen Agarplatte abgenommen, in 1 ml Einfriermedium eingerieben und bei -80° C gelagert.

#### 4.5.4. Nährmedien

Citrat-Agar	Oxoid, Wesel
Columbiaagar mit 5% Schafblut (COS)	bioMerieux, Nürtingen
LB-Medium	Oxoid, Wesel
LB-Agar	Oxoid, Wesel
MacConkey-Agar	Becton & Dickinson, Heidelberg
SOB-Medium	2% Bactotrypton
	0,5% Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	autoklavieren
SOC-Medium	SOB-Medium
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glucose
$\beta$ -Galaktosidasesubstrat	6 $\mu$ l IPTG (1 M)
	8 $\mu$ l X-Gal (250 mg/ml in DMF)

	36 µl DMF
	mischen, auf LB-Platte ausplattieren, trocknen
Einfriermedium	Standard I Nährbouillon (Merck, Darmstadt)
	20% Glycerin

#### 4.5.5. Mediums Zusätze

Ampicillin	100 µg/ml	Ratiopharm, Ulm
Chloramphenicol	30 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gentamicin	200 µg/ml	Biochrom, Berlin
Kanamycin	30 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	10% (w/v)	Serva, Heidelberg

### 4.6. Zellkultur

#### 4.6.1. Eukaryotische Zellen

Zellkulturexperimente wurden mit immortalisierten, humanen mikrovaskulären Gehirndothelzellen (*human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC) durchgeführt [(eine freundliche Gabe von K.S. Kim, Department of Pediatrics, Baltimore, MD, USA) (Stins *et al.*, 1997, Stins *et al.*, 2001)]. HBMEC wurden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Medien für die Zellkultur wurden vor ihrem Einsatz auf 37° C vorgewärmt. Die verwendeten Zellen befanden sich zwischen der 17. und 25. Passage. Die HBMEC wurden regelmäßig mit dem Lichtmikroskop hinsichtlich ihres Wachstums und möglicher Kontaminationen kontrolliert.

#### 4.6.2. Zellkulturmedien

RPMI 1640 (mit 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> und L-Glutamin)	Biochrom, Berlin
Erhaltungsmedium für HBMEC	RPMI 1640
	10% FCS (v/v)
	10% Nu-Serum (v/v)
	2 mM L-Glutamin
	5 U/ml Heparin
	1 mM Natriumpyruvat
	1% MEM-Vitamine

	30 µg/ml ECGS
Beschichtung („Coaten“) Zellkulturflaschen	0,2% Gelatine (w/v), autoklaviert
Trypsin-EDTA (0,05%)	Biochrom, Berlin
2× Einfriermedium	RPMI 1640
	30% FCS
	20% DMSO
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Infektionsmedium	RPMI 1640
	5% FCS
	100 µg/ml Ampicillin
Zellyse	1% Saponin in RPMI 1640, sterifiltriert
Gentamicinlösung	200 µg/ml Gentamicin in RPMI 1640

#### 4.6.3. Beschichtung von Zellkulturmaterialien

Für die Anzucht von HBMEC war das Beschichten („Coaten“) der Zellkulturmaterialien mit Gelatine notwendig. Dafür wurde 0,2% Gelatine in das Zellkulturgefäß gegeben, bis dessen Boden gut bedeckt war. Das Gefäß wurde anschließend kurz durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen und überschüssige Lösung abgesaugt.

#### 4.6.4. Passagierung von HBMEC

HBMEC wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen angezogen und alle 2-3 Tage passagiert. Um konfluent gewachsene HBMEC-Monolayer zu passagieren („splitten“) wurde zunächst das Erhaltungsmedium entfernt. Durch die Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA für 3 min bei 37° C sowie durch anschließendes leichtes Klopfen wurden die HBMEC vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Der Erfolg der Trypsinbehandlung wurde mikroskopisch überprüft. Ein Drittel der Zellen überführte man in neue 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen, in denen sie zusammen mit 10 ml Erhaltungsmedium weiterkultiviert wurden.

#### 4.6.5. Kryokonservierung von HBMEC

Für die Kryokonservierung wurden die HBMEC einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen trypsiniert, bei 1350 rpm und RT für 5 min pelletiert (Megafuge1.0R) und anschließend in 500 µl Erhaltungsmedium aufgenommen. Zu dieser Suspension kamen 500 µl 2× Einfriermedium. Nach dem Mischen der HBMEC mit dem Einfriermedium wurden diese für 15 min bei 4° C inkubiert, um dem im Einfriermedium enthaltenen DMSO den Eintritt in die HBMEC zu



ermöglichen. Danach wurden die Zellen zügig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die HBMEC in flüssigen Stickstoff überführt ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), und endgültig gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem Stickstoff geholt, schnell in der Hand angewärmt und in eine  $75\text{ cm}^2$ -Flasche überführt, in die bereits 20 ml vorgewärmtes Erhaltungsmedium gegeben worden war.

### 4.6.6. Zählen von HBMEC

Um die Zellzahl für Infektionsversuche einstellen zu können (s. 4.19.1.), mussten HBMEC gezählt werden. Dazu wurden die Zellen erneut abtrypsiniert. Nach der Zugabe von 3 ml Erhaltungsmedium entnahm man der Zellsuspension  $10\ \mu\text{l}$  und versetzte diese mit  $10\ \mu\text{l}$  Trypanblau. Trypanblau kann nicht in lebende Zellen eindringen, färbt aber tote Zellen blau.  $10\ \mu\text{l}$  des Zell/Trypanblau-Gemisches wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier große Quadrate der Kammer wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Blaue (tote) HBMEC wurden nicht mitgezählt. Unter Berücksichtigung von Verdünnungs- und Kammerfaktor konnte die Zellzahl in der Suspension bestimmt werden.

### 4.7. Oligonukleotide

In dieser Studie verwendete Oligonukleotide („Primer“) wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, in lyophilisierter Form bezogen und in Aqua dest. resuspendiert. Verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit für die MLST genutzten Oligonukleotide wurden bereits beschrieben (Wirth *et al.*, 2006, Tartof *et al.*, 2005).

Tabelle 4-3: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')*	Genlokus/Genombereich	Acc. Nr. (Position)/Ref.**
HC399	CGCCAGCAGGATCTAGATG	CUS-3 Endosialidase <i>siaK1</i>	CP000711 (2647-2629)
HC400	ATTGGCTTGATGAGAAGGTAG	CUS-3 Integrase	CP000711 (1324-1344)
HC402	TGAGCTTCGCATGATAGCTG	<i>neuO</i>	CP000711 (1597-1616)
HC403	CCGTTGATGATAATGGGTCAG	<i>neuO</i>	CP000711 (2229-2209)
HC403R	CTGACCCATTATCATCAACGG	<i>neuO</i>	CP000711 (2209-2229)
HC404B	AATGCTTTTTAATGACAAGAAAAG	intergenisch <i>siaK1/neuO</i>	CP000711 (2428-2405)
HC404CR	CGTTGACGTCAATGTTTTTTGC	CUS-3 <i>siaK1</i>	CP000711 (2449-2470)
HC407	GATGATGTTACCGCTCAGAG	CUS-3 <i>siaK1</i>	CP000711 (3260-3241)
HC409	CACTTCAATAGCGTCAGCAG	CUS-3 Integrase	CP000711 (1229-1210)
HC410	CAGGAAGTATCGTATCGCTC	CUS-3 Integrase	CP000711 (838-857)
HC413	TGACGGTGAAATGCCATCAG	<i>dsdC</i>	CP000468 (2610611-2610592)
HC414	CGATACCGCAACAGCTACTC	CUS-3 bei <i>dsdC</i>	CP000468 (2608509-2608528)
HC448	CGCAAAGCAGAAGCACGTC	<i>argW</i>	CP000468 (2569840-2569858)
HC473	GTCATGTAGTGCGGCTGTC	CUS-3 bei <i>argW</i>	CP000711 (146-128)
HC473R	GACAGCCGCACTACATGAC	CUS-3 bei <i>argW</i>	CP000711 (128-146)
IM8R	CACCTGACCTTGCTGACGC	CUS-3 Integrase	CP000711 (736-754)
IM9	gcgcgc <u>ATGCATA</u> AAAAATAAACAAATAGGGGTTCC	pQE-32	5'-fl. Bereich der Amp-Resistenz
IM10	gcgcgc <u>ATGCATC</u> AGACCAAGTTTACTCATATATAC	pQE-32	3'-fl. Bereich der Amp-Resistenz
IM11	GTTTTTCCAGCTCTTACGGTG	IS629	AF139596 (541-561)
IM12	CATCGTATACGCGCCGTATC	IS629	AF139596 (1103-1122)
IM14	gcgcgc <u>GAGCTC</u> GGGAAACAGGTTCTCGATAG	CUS-3 <i>siaK1</i>	CP000711 (3069-3050)
IM15	gcgcgc <u>CCCGGG</u> ATTAGTATCCTACGTTATTTTACC	intergenisch <i>siaK1/neuO</i>	CP000711 (2373-2396)
IM16	gcgcgc <u>GGATCC</u> AAAACATCATGCAGACATATTAC	Intergenisch <i>neuO/CUS-3 Integrase</i>	CP000711 (1584-1562)
IM17	gcgcgc <u>GCATGC</u> ATCGTATCGCTCATTGCGAC	CUS-3 Integrase	CP000711 (846-865)
IM18	TTCCGGTACTGGTGCTGTG	<i>yapH</i> -Homolog	AE014075 (2753845-2753826)
IM19	GCTGGGCCATACTCCTGC	IS629	AF139596 (472-455)
IM20	CATCCTGTTTACCTCTTTCTC	IS629	AF139596 (1604-1623)
IM23	ATACAGGAAGCCGTATTGCG	<i>yapH</i> -Homolog	AE014075 (2752351-2752332)
IM24	ATAAAGTGACCGGGTATATCG	<i>yapH</i> -Homolog	AE014075 (2753305-2753285)
IM25	TCGAAGCGGTGCTGTAAATC	CUS-3 ORF22	CP000711 (22763-22745)
IM26	CTTTGGCGACTTTGTAGCGA	CUS-3 ORF22	CP000711 (22205-22224)
IM30	CGCAGACGCATACCTGCAG	CUS-3 <i>siaK1</i>	CP000711 (4049-4031)
IM32	CTTCCTGTTTAATTTTCACCC	CUS-3 <i>siaK1</i>	CP000711 (3479-3499)

\*Restriktionsschnittstellen für Klonierungen sind unterstrichen. \*\* Acc. Nr.: Accession number (EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank); Ref.: Referenz

Fortsetzung Tabelle 4-3.

Name	Sequenz (5'-3')*	Genlokus/Genombereich	Acc. Nr. (Position)/Ref.**
IM33	CGTCATCATATACTGCGGG	CUS-3 <i>siaK1</i>	CP000711 (2762-2780)
IM34	GCGTGCATCAGATGGGCA	<i>neuO</i> in p4A	CP000711 (1901-1884)
IM35	GCGTGCATCAGATGGGGC	<i>neuO</i> in p4A-H119A	CP000711 (1901-1884)
<i>etsA</i> _F	CAACTGGGCGGGAACGAAATCAGGA	ABC-Transporter <i>etsA</i>	(Johnson <i>et al.</i> , 2006b)
<i>etsA</i> _R	TCAGTTCGCGCTGGCAACAACCTAC	ABC-Transporter <i>etsA</i>	(Johnson <i>et al.</i> , 2006b)
<i>hlyF</i> _F	GGCGATTTAGGCATTCCGATACTC	Hämolysin <i>hlyF</i>	(Johnson <i>et al.</i> , 2006b)
<i>hlyF</i> _R	ACGGGGTCGCTAGTTAAGGAG	Hämolysin <i>hlyF</i>	(Johnson <i>et al.</i> , 2006b)
<i>ibeA</i> _F	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	Invasionsprotein <i>ibeA</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>ibeA</i> _R	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	Invasionsprotein <i>ibeA</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>hlyD</i> _F	CTCCGGTACGTGAAAAGGAC	Hämolysin <i>hlyD</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>hlyD</i> _R	GCCCTGATTACTGAAGCCTG	Hämolysin <i>hlyD</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>malX</i> _F	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	Phosphotransferasesystem <i>malX</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>malX</i> _R	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	Phosphotransferasesystem <i>malX</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>fyuA</i> _F	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	Siderophor <i>fyuA</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
<i>fyuA</i> _R	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	Siderophor <i>fyuA</i>	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005b)
JP5	TGAGCTATGCGCAACATTATG	K1-Polysialyltransferase <i>neuS</i>	X60598 (1164-1184)
JP6	ATCGTGCAAAGAGGGAGATG	K1-Polysialyltransferase <i>neuS</i>	X60598 (1954-1935)
KB9	AATACGACTCACTATAGGGC	pBluescript® II SK(+)	5'-Bereich der pBS-MCS
329	ACCATGATTACGCCAAGC	pBluescript® II SK(+)	3'-Bereich der pBS-MCS
QE-R	GTTCTGAGGTCATTACTGG	pQE30	3'-Bereich der pQE30-MCS
CAT1	TAAGGAAGCTAAAATGGAGA	CAT-Kassette	Z50120 (942-923)
CAT2	TTACGCCCCGCCCTGCCACT	CAT-Kassette	Z50120 (270-289)
CM1	GGTTCGCGGGCGGTGTTTC	CAT-Kassette	Z50120 (985-1002)
CM2	GAGATTTTCAACGTGGATCC	CAT-Kassette	Z50120 (101-82)

\*Restriktionsschnittstellen für Klonierungen sind unterstrichen. \*\*Acc. Nr.: Accession number (EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank); Ref.: Referenz.

**4.8. Antikörper**

$\alpha$ -DIG-Antikörper, alkalische Phosphatase(AP)-konjugiert	Roche Diagnostics, Mannheim
Maus- $\alpha$ -K1, monoklonaler Antikörper (mAb) 735	(Frosch <i>et al.</i> , 1985)
Maus- $\alpha$ -K1 oac <sup>+</sup> , mAb58-5	Monosan, Uden, The Netherlands & Abcam, Cambridge, UK
Goat- $\alpha$ -Maus Antikörper, AP-konjugiert	Dianova, Hamburg
Goat- $\alpha$ -Maus IgG- & IgM-Antikörper, Meerrettich-Peroxidase (POX)-konjugiert	Dianova, Hamburg

**4.9. Agarosegelelektrophorese**Lösungen:

TBE (10 $\times$ )	100 mM Tris-Base/100 mM Borsäure/2,5 mM EDTA (pH 8,3)
Probenauftragspuffer GEBS	20% Glycerin/50 mM EDTA/0,05% Bromphenolblau/0,5% Sarcosyl (pH 8,0)
Ethidiumbromidlösung	0,001% Ethidiumbromid

Zur Auftrennung und Beurteilung von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für die Elektrophorese von PCR-Produkten wurde 1,5% (w/v) Agarose, für die Elektrophorese von chromosomaler DNA sowie von Restriktionsverdau wurde 0,8% (w/v) Agarose in 1 $\times$  TBE in der Mikrowelle aufgeköcht und in horizontale Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren wurden die mit mindestens  $\frac{1}{6}$  (v/v) GEBS versehenen, zu analysierenden Proben aufgetragen. Das in GEBS enthaltene Bromphenolblau diente als Lauffront. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurde als Größenstandard die Smart-Ladder verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 180-220 V mit 1 $\times$  TBE als Laufpuffer. Nach dem Gellauf wurde die im Gel enthaltene DNA für 10 min in der Ethidiumbromidlösung angefärbt und in der Geldokumentationsanlage (UVT-28 MP) mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

**4.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde der Nukleinsäuregehalt der Probe am Nanodrop (peqlab) bestimmt. Dabei gilt, dass eine optische Dichte (OD) bei 260 nm von 1 etwa 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA entspricht. Die Reinheit der DNA wurde über den Quotienten  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  bestimmt: Der  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ -Quotient beträgt für eine reine DNA-Lösung 1,8-2,0; liegt der ermittelte Quotient unter diesem Wert, ist eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen anzunehmen.

#### 4.11. Photometrische Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur

Die Bestimmung der OD einer Bakterienkultur erfolgte bei 600 nm in geeigneter Verdünnung am Photometer CO8000. Eine  $OD_{600nm}$  von 1 entspricht bei *E. coli* etwa  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml.

#### 4.12. DNA-Präparationen

##### 4.12.1. DNA-Präparationen mit Qiagen-Kits

Kits zur DNA-Präparation von Qiagen wurden entsprechend den Herstellerangaben benutzt. Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR *Purification Kit*, für die Präparation chromosomaler DNA das QIAGEN *Genomic-tip 100/G Kit* (Details s. 4.12.2.), für die Extraktion von DNA aus 0,8%igem Agarose-Gel das QIAquick *Gelextraction Kit* und für die Präparation von Plasmid-DNA das QIAprep *Spin Miniprep Kit* verwendet.

##### 4.12.2. Präparation chromosomaler DNA

###### Lösungen:

Puffer B1	1,86 g $Na_2EDTA \times 2H_2O$ /0,61 g Tris/0,5% Tween 20/0,5% Triton X-100 in 200 ml Aqua dest. (pH 8,0)
RNase A-Lösung	100 mg/ml RNase
LysozymbLösung	100 mg/ml Lysozym
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K
Puffer B2	28,7 g Guanidin-HCl/20% Tween 20 in 200 ml Aqua dest.

Zur Präparation chromosomaler DNA wurden über Nacht auf einer LB-Platte angezogene Bakterien in 5 ml  $1 \times$  PBS eingerieben, um die  $OD_{600nm}$  der Suspension zu bestimmen.  $1,5 \times 10^{10}$  Zellen wurden in  $1 \times$  PBS eingestellt und bei 4000 rpm für 10 min pelletiert (Megafuge1.0). Die weiteren Schritte zur Lyse der Bakterien und Präparation ihrer chromosomalen DNA wurden mit dem QIAGEN *Genomic-tip 100/G*, sowie den Puffern B1 und B2 und den Enzymen RNase A, Lysozym und Proteinase K entsprechend der Herstellerangaben vorgenommen. Die abschließend erhaltene DNA wurde über Nacht bei  $4^\circ$  C in 100  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. Ihre Qualität und Quantität wurde mittels Agarose-Gel und photometrischer Auswertung ( $OD_{260nm}$ ) bestimmt.

##### 4.12.3. Fällung von PCR-Produkten mit PEG8000/NaCl

PCR-Produkte müssen für anschließende Sequenzierungen aufgereinigt werden, da u. a. Primer aus dem PCR-Ansatz die Sequenzierreaktion stören können. Neben dem bereits erwähnten QIAquick PCR *Purification Kit* wurde die Aufreinigung von PCR-Produkten auch mittels PEG8000/NaCl-Fällung vorgenommen. Die PCR-Produkte für die MLST (s. 4.13.3.)

bzw. für die CUS-3-Genotypisierung (s. 4.13.4.) wurden dafür direkt in den 96-Well Mikrotiterplatten aufgereinigt: Die 100 µl-Ansätze wurden mit 60 µl 20% PEG8000/2,5 M NaCl versetzt, die Platte versiegelt, gevortext und abzentrifugiert (etwa 10 sec bei 1000 rpm), und die DNA über Nacht bei 4° C gefällt. Am nächsten Tag wurde die DNA für 1 h bei 4° C und 4000 rpm (Megafuge 1.0R, Einsatz 6447K) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die restliche Flüssigkeit durch eine 1-minütige Überkopfzentrifugation bei 1700 rpm und 4° C auf dickem Whatman-Filterpapier aus den Wells entfernt. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen (10 min, 4000 rpm, 4° C), und überschüssige Flüssigkeit durch Überkopfzentrifugation entfernt (s. o.). Die aufgereinigte DNA wurde abschließend in 6 µl Aqua dest. aufgenommen und bei -20° C gelagert oder direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Ausbeute an aufgereinigtem PCR-Produkt wurde im Agarosegel überprüft.

### 4.13. PCR und DNA-Sequenzierung

#### 4.13.1. PCR

PCR (Polymerase-Kettenreaktion, *Polymerase chain reaction*) wurden mit der Taq-DNA-Polymerase (New England Biolabs) oder mit der PfuUltra DNA-Polymerase (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt:

100 µl PCR-Ansatz mit NEB-Polymerase:      100 µl PCR-Ansatz mit PfuUltra-Polymerase:

10 µl Reaktionspuffer (10×)	10 µl Reaktionspuffer (10×)
10 µl dNTP (2 mM je dNTP)	10 µl dNTP (2 mM je dNTP)
1 µl Vorwärts („F“) -Primer (20 µM)	1 µl Vorwärts („F“) -Primer (20 µM)
1 µl Rückwärts („R“) -Primer (20 µM)	1 µl Rückwärts („R“) -Primer (20 µM)
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl PfuUltra-Polymerase (2,5 U/µl)
ad 100 µl Aqua dest.	ad 100 µl Aqua dest.

Als Template wurden 20 ng chromosomale DNA, 10 ng Plasmid-DNA oder direkt mit einem Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommene Bakterien in die PCR eingesetzt.

#### PCR-Programm:

94° C	10 min	} 36 Zyklen
48-63° C*	1 min	
72° C	0,5-5 min**	
94° C	1 min	
48-63° C	1 min	
72° C	10 min	

Die Schmelztemperatur  $T_m$  (\*; Primeranlagerung) war für die verschiedenen Oligonukleotide variabel und berechnete sich aus ihrer Sequenz:  $T_m = [4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)] - 4^\circ \text{C}$ . Bei der

Festlegung der Elongationszeit (\*\*; Primerverlängerung) galt der Grundsatz, dass pro Minute etwa 1 kb DNA-Sequenz durch die DNA-Polymerase erzeugt wird. Das Vorhandensein bzw. die Größe von PCR-Produkten wurde stets im 1,5%igen Agarosegel überprüft.

#### 4.13.2. DNA-Sequenzierung

##### Lösungen:

Ethanol/Natriumacetat      7 ml Ethanol/280 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,6)

Die DNA-Sequenzierung erfolgte in dieser Arbeit mit der „Kettenabbruch“-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

##### Sequenzieransatz:

2 µl Sequenzierprimer [(1 µM) (entsprechend PCR-Produkt)]

2 µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1

1-2 µl PCR-Produkt (100 ng)

##### Sequenzierreaktion:

96° C	2 min	} 36 Zyklen
96° C	10 sec	
50° C	5 sec	
60° C	2 min	
4° C	Lagerung	

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion wurde jeder Ansatz mit 15 µl Aqua dest. aufgefüllt und mit 52 µl Ethanol/Natriumacetat versetzt. Die Platte konnte versiegelt, gevortext und abzentrifugiert werden. Durch eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA gefällt und anschließend wie unter 4.12.3. beschrieben pelletiert und gewaschen. Das aufgereinigte Produkt wurde in 25 µl HiDi aufgenommen, in 96-Well Mikrotiterplatten (für Sequenzierreaktionen) umpipettiert und im ABI3100 oder im ABI3130 sequenziert.

Alternativ konnten aufgereinigte PCR-Produkte (100 ng) oder Plasmide (400 ng) zusammen mit 5 µM Sequenzierprimer (entsprechend PCR-Produkt) und 1× Sequenzierpuffer in einem Gesamtvolumen von 9 µl direkt in das DNA-Labor des IHM Würzburg gegeben werden, das die weiteren Sequenzierschritte übernahm (DNA-Sequenzierer: ABI3130).

#### 4.13.3. Multilokus-Sequenztypisierung

Um *E. coli*-Isolaten ST und STC zuzuordnen, wurden Nukleotidsequenzen (ds) von internen DNA-Fragmenten (Längen s. u.) der folgenden Haushaltsgene mittels PCR (s. 4.13.1.) und DNA-Sequenzierung (s. 4.13.2.) ermittelt:

Adenylat-Kinase <i>adk</i>	536 bp
Fumarat-Hydratase <i>fumC</i>	469 bp

DNA-Gyrase <i>gyrB</i>	460 bp
Isocitrat/Isopropylmalat-Dehydrogenase <i>icd</i>	518 bp
Malat-Dehydrogenase <i>mdh</i>	452 bp
Adenylosuccinat-Dehydrogenase <i>purA</i>	478 bp
ATP/GTP-Bindemotiv <i>recA</i>	510 bp

Die MLST wurde in dieser Arbeit im Wesentlichen nach dem Schema von M. Achtman und Mitarbeitern durchgeführt (Wirth *et al.*, 2006). Allerdings betrug die Annealing-Temperatur 55° C und die Elongationszeit 1,5 min, und für die Vorwärts-Sequenzierung von *mdh* wurde der Primer *mdh*-F2 verwendet (Tartof *et al.*, 2005). Die MLST-PCR wurden mit der NEB-Taq-Polymerase zu 100 µl in 96-Well Mikrotiterplatten (für PCR-Reaktionen) durchgeführt. Durch den Abgleich der Haushaltsgensequenzen mit den frei zugänglichen Sequenzen aus der *E. coli* MLST-Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) wurden den Sequenzen Allelnummern zugeordnet. Aus der Kombination der Allele ergaben sich ST (Allelkombinationen für ST vgl. *E. coli* MLST-Datenbank). Neue Allelvarianten wurden dem Kurator der *E. coli* MLST-Datenbank mitgeteilt, der diesen Varianten neue Nummern zuwies und daraus resultierende ST bestimmte. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass Frau M.Sc. Julia Batzilla (geb. Pagels) im Rahmen ihrer Masterarbeit 66 *E. coli* K1-Isolate mit der MLST analysiert hat, und dass von M. Achtman, C. Ewers und L. Wieler bezogene Isolate bereits typisiert waren (s. 5.1.1.1.).

#### 4.13.4. CUS-3-Genotypisierung

Die CUS-3-Genotypisierung wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Dabei wurde die DNA-Sequenz über PCR (s. 4.13.1.) und DNA-Sequenzierung (s. 4.13.2.) von folgenden CUS-3-Genen bzw. Genabschnitten (Länge s. u.) ermittelt:

CUS-3 ORF22 (kleine Untereinheit der Phagen-Terminase)	438 bp
Endosialidase <i>siaK1</i> _Fragment 1 ( <i>siaK1</i> _1)	492 bp
Endosialidase <i>siaK1</i> _Fragment 2 ( <i>siaK1</i> _2)	441 bp
O-Acetyltransferase <i>neuO</i>	648 bp

Die PCR für die CUS-3-Genotypisierung wurden bei einer Annealing-Temperatur von 55° C und einer Elongationszeit von 1,5 min (*neuO*/ORF22) bzw. 3 min (*siaK1*) mit der Taq-Polymerase (New England Biolabs) zu 100 µl in 96-Well Mikrotiterplatten (für PCR-Reaktionen) durchgeführt. ORF22 wurde mit IM25/IM26, *neuO* mit HC399 (für ST62-Stämme: HC404B)/HC400 amplifiziert und sequenziert. Für die *neuO*-Sequenzierung wurden zusätzlich HC402 und HC403R verwendet. Für *siaK1* wurde zunächst ein ca. 1,5 kb großes Fragment mit IM30/HC404CR amplifiziert, von dem ein Fragment zu 492 bp mit IM30 und IM32 (*siaK1*\_1) bzw. ein Fragment zu 441 bp mit HC407 und IM33 (*siaK1*\_2) sequenziert



wurde. Analog zu dem Vorgehen bei der MLST wurden ORF22-, *siaK1\_1*-, *siaK1\_2*- und *neuO*-Allelvarianten Nummern zugeteilt, auf deren Basis CUS-3-Genotypen (CUS-3\_GT) gebildet werden konnten. Verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 4-3 aufgeführt. Die Allelkombinationen der 18 in dieser Arbeit identifizierten CUS-3\_GT sind in Tabelle 8-3 aufgelistet.

#### **4.14. Klonierungsmethoden**

##### *4.14.1. Restriktionsverdau von DNA*

Restriktionsverdau wurden mit den von New England Biolabs bezogenen Restriktionsenzymen und Puffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Wenn erforderlich, wurden zwei Enzyme in den Verdau eingesetzt.

##### Ansatz Restriktionsverdau:

2 µl NEB-Puffer [(10×) (entsprechend Restriktionsenzym/en)]

2 µl BSA [(10×) (falls für Enzymaktivität erforderlich)]

2 µl Restriktionsenzym/e (20 U/µl)

1-2 µg DNA

ad Aqua dest. 20 µl

Die Restriktionsansätze wurden für 2 h bei 37° C im Heizblock inkubiert. Wenn chromosomale DNA für den Southern Blot (s. 4.16.2.) verdaut werden sollte, wurden 2,5 µg chromosomale DNA eingesetzt und diese über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

##### *4.14.2. Alkalische Dephosphorylierung*

Um Ringschlüsse („Religationen“) von Vektoren zu verhindern, die nur mit einem Enzym geschnitten wurden, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt. Dabei entfernt das Enzym CIP die 5'-Phosphatreste geschnittener DNA-Fragmente und verringert dadurch ihre Religationsrate. Da die CIP mit den meisten Puffern, die für den Restriktionsverdau verwendet werden, kompatibel ist, konnte die alkalische Dephosphorylierung während des Restriktionsverdau (s. 4.14.1.) durchgeführt werden. Dem Restriktionsansatz wurde dazu zunächst 1 µl CIP zugegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37° C wurde das Restriktionsenzym durch eine 20-minütige Inkubation bei 80° C inaktiviert. Nach dem Abkühlen der Probe wurde erneut 1 µl CIP zu dem Ansatz gegeben und es schloss sich eine 45-minütige Inkubation bei 37° C an; dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

#### 4.14.3. Auffüllreaktion mit der T4-DNA-Polymerase

Manche Enzyme erzeugen sogenannte „klebrige, kohäsive“ Enden in Restriktionsfragmenten, die für nachfolgende Klonierungen mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase in glatte Enden überführt werden können: Das Enzym füllt die 5'-Überhänge der DNA-Fragmente durch seine Polymerasefunktion auf, und die 3'-Überhänge werden durch die Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase entfernt.

##### Auffüllansatz:

4 µl NEB-Puffer 2 (10×)  
4 µl BSA (10×)  
2 µl dNTP (2 mM)  
2 µl T4-DNA-Polymerase (3 U/µl)  
27 µl verdaute und aufgereinigte DNA  
ad 40 µl Aqua dest.

Die Auffüllreaktion fand für 20 min bei 12° C statt. Anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 72° C denaturiert.

#### 4.14.4. Ligationsreaktion

Für die Insertion von DNA-Fragmenten (Inserts) in linearisierte Vektoren wurde das Enzym T4-DNA-Ligase benutzt, das Nukleotidfragmente durch Bildung von Phosphodiester-Bindungen verknüpft. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor für die Liagtionsreaktion sollte etwa 3:1 betragen.

##### Ligationsansatz:

1,5 µl Ligase-Puffer (10×)  
1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)  
Insert (3 Teile)  
Vektor (1 Teil)  
ad 15 µl Aqua dest.

Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16° C.

### **4.15. Transformation von E. coli**

#### 4.15.1. Herstellung kompetenter Zellen

700 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* (DH5α, SM10λpir oder K1-Stämme) aus einer über Nacht-Kultur auf eine  $OD_{600nm} = 0,1$  angeimpft und bei 37° C bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,55-0,6 (exponentielle Wachstumsphase) schüttelnd inkubiert. Um das Bakterienwachstum zu stoppen, wurde die Suspension für 10 min im Eisbad unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Die Bakterien wurden für 15 min bei 4° C und 5000 rpm (Zentrifugen RCB5 oder

RC5Bplus, Rotor GS3) pelletiert und anschließend zunächst mit 500 ml, danach mit 200 ml 4° C kaltem Aqua dest. und anschließend mit 20 ml 4° C kalter 10%iger Glycerin-Lösung gewaschen (jeweils 15 min, 4° C, 5000 rpm). Die Zellen wurden in 1,5 ml kalter Glycerin-Lösung aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80° C.

#### 4.15.2. Aufreinigung von Ligationsansätzen

##### Lösungen:

Acrylamidlösung	200 µg/ml Acrylamid
NaCl-Lösung	5 M NaCl

Die unter 4.14.4. beschriebenen Ligationsreaktionen sollten per Elektroporation in *E. coli* eingebracht werden. Dafür wurde die Plasmid-DNA mit der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [(PCI) (25:24:1)]-Methode von den für die Ligase-Enzymfunktion benötigten Salzen befreit, die bei der Elektroporation einen Kurzschluss verursachen können. Der Ligationsansatz wurde dafür zunächst mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt, mit 250 µl PCI versetzt, kräftig geschüttelt und bei 13000 rpm und RT für 2 min zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge 15). Die obere, wässrige Phase des Gemisches, die die Plasmid-DNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Zu der unteren PCI-Phase wurden 50 µl Aqua dest. gegeben, und der Ansatz wurde erneut kräftig geschüttelt und zentrifugiert (s. o.). Die obere, wäßrige Phase wurde zu der bereits erhaltenen Plasmidlösung pipettiert. Die DNA wurde mit 150 µl Diethylether extrahiert und das Gemisch wurde 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Dieses Mal konnte die obere (Ether)-Phase verworfen werden; zum vollständigen Entfernen des Ethers wurde dieser für 15 min bei 37° C im Thermoblock verdampft. Die Zugabe von 1/10 v/v Acrylamidlösung (15 µl), 1/10 NaCl-Lösung und des dreifachen Volumen -20° C kaltem Ethanol (540 µl) sowie eine anschließende Inkubation bei -80° C für 30 min bewirkten die Fällung der Plasmid-DNA. Zur Pelletierung der Plasmid-DNA wurde diese bei 13000 rpm und 4° C für 15 min zentrifugiert (Biofuge 15R), und der Überstand konnte verworfen werden. Zum Entfernen des NaCl wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 4° C kaltem, 70%igen Ethanol 15 min bei 13000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Alkohol wurde abgekippt, das Pellet wurde für 10 min im Vakuumverdampfer (SpeedVac) getrocknet und abschließend für 15 min bei 37° C in 5 µl Aqua dest. gelöst.

#### 4.15.3. Elektroporation

Durch einen kurzen elektrischen Impuls kann die Zellmembran von speziell dafür behandelten *E. coli*-Zellen (s. 4.15.1.) kurzzeitig für Plasmid-DNA durchlässig gemacht werden. Für die Elektroporation wurden entweder 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (1 ng/ $\mu\text{l}$ ) oder 2  $\mu\text{l}$  aufgereinigter Ligationsansatz (s. 4.15.2.) zu 40  $\mu\text{l}$  auf Eis aufgetauter kompetenter *E. coli*-Zellen gegeben. Das Gemisch wurde luftblasenfrei in Elektroporationsküvetten pipettiert und in das Elektroporationsgerät (Bio-Rad) gestellt, um die Transformation mit folgenden Einstellungen durchzuführen: 2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$  und 400  $\Omega$ . Die Bakterien wurden sofort in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37° C schüttelnd inkubiert. Entsprechend der Plasmidresistenz wurden 10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  und 900  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf antibiotikahaltigen Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Zur Überprüfung der Religationsrate des Vektors wurde ein Blue/White-Screening vorgenommen. Dazu wurden die Platten zusätzlich mit  $\beta$ -Galaktosidasesubstrat versehen, und über das Verhältnis von blauem (religierter Vektor) zu weißem (Vektor mit Insert) konnte die Religationsrate bestimmt werden.

#### 4.16. DNA-Hybridisierung

##### 4.16.1. Herstellung DIG-markierter Sonden

DNA-Fragmente, die als Sonden eingesetzt werden sollten, wurden über PCR amplifiziert und über das QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Etwa 2-3  $\mu\text{g}$  linearisierte DNA wurden über Nacht mit DIG-konjugiertem dUTP markiert. Dazu füllte man die DNA mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 15  $\mu\text{l}$  auf, denaturierte sie 10 min bei 100° C im Wasserbad (SW20) und stellte sie zum Abkühlen etwa 3 min auf Eis. Für die Markierungsreaktion wurden der DNA 2  $\mu\text{l}$  Hexanukleotidgemisch, 2  $\mu\text{l}$  dNTP-Markierungsgemisch (enthält DIG-markiertes dUTP) und 1  $\mu\text{l}$  Klenow-Enzym zugegeben, und der Ansatz wurde über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag stoppte man die DNA-Markierungsreaktion durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  200 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) und fällte die DNA mit 2  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 75  $\mu\text{l}$  -20° C kaltem Ethanol für 30-60 min bei -80° C. Auf die DNA-Fällung folgte das Waschen des Pellets mit 1 ml 70% Ethanol für 15 min bei 13000 rpm und 4° C (Kühlzentrifuge Biofuge15R). Das Pellet wurde für 10 min in der SpeedVac plus (SC110A) getrocknet, und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer für 5 min im Thermoblock bei 37° C resuspendiert. Eine Verdünnungsreihe der erhaltenen DIG-markierten Sonde wurde zusammen mit DIG-markierter Kontroll-DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetropft. Durch kurzzeitige Behandlung mit UV-

Licht (120 mJ) im UV-Crosslinker (Stratalinker 1800) wurde die DNA irreversibel an die Membran gebunden („gecrosslinkt“) und mittels CSPD-System quantifiziert (s. 4.16.5.).

#### 4.16.2. Southern Blot

##### Lösungen:

HCl	250 mM
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl/0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl (pH 7,0)/3 M NaCl
Hochsalzpuffer	10× SSPE

Nachdem die chromosomale DNA mit den gewünschten Restriktionsenzymen verdaut worden war (s. 4.14.1.), wurde der Restriktionsverdau mit 10 µl GEBS versetzt und auf ein etwa 10-15 cm langes 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Um später die DNA-Fragmentgrößen bestimmen zu können, wurden die DIG-markierten Marker III (20 µl) und VII (10 µl) zusätzlich aufgebracht. Sobald die blaue Lauffront des GEBS aus dem Gel auslief (nach ca. 3 h), wurde das Gel gefärbt und fotografiert, um den Verdau zu überprüfen. Das Gel wurde nun nacheinander in HCl (20 min; Depurinierung der DNA), Denaturierungspuffer (30 min; Denaturierung der DNA in Einzelstränge) und abschließend in Neutralisierungspuffer (30 min) leicht geschwenkt. Der Kapillartransfer („Blotten“) der DNA aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (*parablot NY plus*) erfolgte entweder für 4 h oder über Nacht durch den Flüssigkeitsstrom eines Hochsalzpuffers, der die DNA aus dem Gel auf die Membran überführte. Nach Abschluss des Blottens wurde die Nylonmembran luftgetrocknet und die DNA gecrosslinkt.

#### 4.16.3. Kolonie-Blot und Dot-Blot

##### Lösungen:

Lyselösung 1	10% SDS
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl/0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung 1	1,5 M NaCl/0,5 M Tris (pH 8,0)
Neutralisierungslösung 2	2× SSPE
Lyselösung 2	5× SSC/0,5% SDS/1 mM EDTA

Mit dem Kolonie-Blot können viele Bakterienklone parallel, bspw. nach einer Klonierung, auf das Vorhandensein des gewünschten Konstrukts überprüft werden. Über Nacht auf einer LB-Agarplatte angezogene *E. coli*-Stämme wurden auf eine runde, positiv geladene Nylonmembran abgezogen und luftgetrocknet. Alternativ konnten auch zweimal 10 µl einer 10 min aufgekochten Bakteriensuspension ( $OD_{600nm} = 10$ ) auf eine positiv geladene Nylonmembran getropft werden. Die Membran wurde mit den aufgetragenen Bakterien nach

oben nacheinander auf dicke Filterpapiere gelegt, die mit folgenden Substanzen getränkt waren: Lyselösung 1 (3 min, Lyse der Bakterien), Denaturierungspuffer (5 min, Denaturierung der DNA), Neutralisierungslösung 1 (5 min) und Neutralisierungslösung 2 (5 min). Nach dem erneuten Trocknen wurde die DNA im UV-Crosslinker an die Nylonmembran gebunden. Es schloss sich eine 20-minütige Inkubation in Lyselösung 2 bei 57° C an. Nach diesem Schritt wurden die Bakterienreste mit Kleenex von der Membran abgewischt. Nach dem erneuten Trocknen und Crosslinken wurde die Nylonmembran hybridisiert (s. 4.16.4.).

Neben dem Abziehen/Auftropfen von Bakterienkolonien gibt es auch die Möglichkeit, chromosomale DNA auf eine Nylonmembran zu tropfen, um sie anschließend zu hybridisieren („Dot-Blot“). Dazu wurden 20 µl einer DNA-Lösung (10 ng/µl) auf eine positiv geladene Nylonmembran pipettiert und getrocknet. Die Membranen wurden nacheinander für jeweils 5 min auf dicken Filterpapieren mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungslösung 1 und Neutralisierungslösung 2 inkubiert. Nach dem Crosslinken der DNA an die Membran konnte mit der Hybridisierung begonnen werden (s. 4.16.4.).

#### 4.16.4. Hybridisierung von DNA mit DIG-markierten Sonden

##### Lösungen:

Hybridisierungslösung „High SDS“ 7% SDS/50% Formamid/5 × SSC/50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)/1% Sarcosyl/2% Blockierungsreagenz  
Substanzen bei 60° C lösen, Lagerung bei -20° C.

Die auf der Nylonmembran denaturiert vorliegende DNA aus Southern- (s. 4.16.2.), Kolonie- oder Dot-Blots (s. 4.16.3.) wurde mit DIG-markierten Sonden (s. 4.16.1.) hybridisiert. Um unspezifische Anlagerungen der Sonde an die Membran zu vermindern, wurde diese zunächst für 45 min bei 42° C mit High-SDS im Hybridisierungsofen (OV5) vorhybridisiert. 100 ng der DIG-markierten Sonde wurden in 10 ml Hybridisierungslösung pipettiert, und die Lösung wurde für 10 min bei 100° C im Wasserbad aufgekocht, um die DNA-Sonde zu denaturieren. Nach kurzem Abkühlen auf Eis (ca. 10 min) wurde das High-SDS durch die Sonde ersetzt, und die Membran wurde über Nacht bei 42° C inkubiert. Die DIG-markierte Sonde war mit dem CSPD-System nachweisbar (s. 4.16.5.).

#### 4.16.5. Nachweis DIG-markierter DNA-Sonden mit dem CSPD-System

##### Lösungen:

Lösung 1 (stringentes Waschen) 2× SSC/0,1% SDS  
Lösung 2 (stringentes Waschen) 0,1× SSC/0,1% SDS

Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure/150 mM NaCl (pH 7,5)
Waschpuffer	0,3% Tween20 in Maleinsäurepuffer
Puffer 2	1% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
$\alpha$ -DIG-Antikörper-Lösung	$\alpha$ -DIG-AK 1:10000 in Puffer 2
Puffer 3	100 mM Tris-HCl (pH 9,6)/100 mM NaCl
CSPD-Lösung	CSPD 1:100 in Puffer 3

DIG-markierte Sonden, die sich während der Hybridisierung an die Ziel-DNA angelagert haben, können durch einen DIG-spezifischen Antikörper erkannt werden. Durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase wird die Umsetzung eines Substrats (CSPD) katalysiert, bei der Licht emittiert wird. Die Detektion der CSPD-Chemilumineszenz erfolgte durch das Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms.

Um ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde diese abgenommen, und die Nylonmembran zweimal für 5 min bei RT mit Lösung 1 und zweimal für 15 min bei 68° C mit Lösung 2 stringent gewaschen. Für den DIG-Nachweis wurde die Nylonmembran mit folgenden Substanzen nacheinander bei Raumtemperatur inkubiert:

- 1-5 min in Waschpuffer
- 30 min in Puffer 2
- 30 min in  $\alpha$ -DIG-Antikörper-Lösung
- 2× 15 min in Waschpuffer
- 2-5 min in Puffer 3
- 5 min in CSPD-Lösung

Die Nylonmembran wurde in Frischhaltefolie gewickelt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Eine 15-minütige Inkubation der Membran bei 37° C im Brutschrank beschleunigte die Enzymreaktion. Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach etwa 45 min entwickelt wurde (Entwicklungsmaschine AGFA Curix 60).

#### 4.16.6. Strippen von Nylonmembranen

##### Lösungen:

Stripplösung	200 mM NaOH/0,1% SDS
Aufbewahrungslösung	2 × SSC

DNA auf Nylonmembranen kann mehrfach mit unterschiedlichen Sonden hybridisiert werden. Die jeweils benutzte Sonde muss dafür durch das sog. „Strippen“ entfernt werden. Dafür wurde die Membran zweimal für 15 min mit Stripplösung bei 37° C schüttelnd inkubiert (Sonde dissoziiert von DNA). Nachdem die Nylonmembran 2-3 min in Aufbewahrungslösung geschwenkt wurde, konnte sie entweder in Aufbewahrungslösung bis zum nächsten Gebrauch bei RT gelagert oder neu hybridisiert werden.

#### 4.17. Plasmid- und Stammkonstruktionen

##### 4.17.1. Klonierung des *argW*-Lokus aus *E. coli* K1-Stamm RS176

Um den Aufbau des *argW*-Bereiches in ST62-Stämmen zu ermitteln, war es notwendig den Locus zu klonieren. Dafür wurde zunächst chromosomale DNA von *E. coli* K1-Stamm RS176 (ST62) präpariert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym NsiI wurde ein ca. 6 kb großes DNA-Fragment im Southern Blot identifiziert, das mit der CUS-3 Integrase (HC409/HC410)-Sonde hybridisierte [(die CUS-3 Integrase befindet sich in unmittelbarer Nähe des *argW*-Lokus) (Deszo *et al.*, 2005)] und in pBS kloniert werden sollte. Dazu wurde ein zweiter NsiI-Verdau auf ein 0,8% Gel aufgetragen, um die Fragmente im Bereich von 5,5-6,5 kb auszuschneiden. Nach deren Aufreinigung über das QIAquick *Gelextraction Kit* konnten die Fragmente in den PstI-verdauten pBS ligiert werden (PstI- und NsiI-Schnittstellen sind kompatibel). Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde ein Colony-Blot durchgeführt und mit der CUS-3 Integrase-Sonde hybridisiert, um Bakterien zu detektieren, die das pBS/CUS-3 Integrase *argW*-Konstrukt (pIM4) enthielten. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep *Spin Miniprep Kit* aufgereinigt und über einen Primerwalk sequenziert: 329-HC473-HC473R-IM8R-HC400-IM20-IM12-IM11-IM19-IM23-IM24-IM18-KB9 (Tab. 4-3).

##### 4.17.2. NeuO-knock out

*NeuO* sollte in den CUS-3/*neuO*-positiven Stämmen RS218 und IMT5155 durch eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette ersetzt werden, die die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) codiert. Für diesen *neuO*-knock out wurde der Suizidvektor pMHH1 sowie im Wesentlichen das Protokoll von Gunzer *et al.* verwendet (Gunzer *et al.*, 1998).

##### 4.17.2.1. Erzeugung des Donorstammes für den *neuO*-knock out

Die 5' (IM14/15)- und 3' (IM16/17)- flankierenden Bereiche des *neuO*-Gens von Stamm IMT5155 wurden sukzessive in die SacI/XmaI- bzw. BamHI/SphI-Schnittstellen von pUC19 kloniert. Anschließend wurde die Chloramphenicol-Resistenz-Kassette mit HindIII aus pBS/CAT verdaut, aufgefüllt und in die zwischen XmaI und BamHI liegende SmaI-Schnittstelle von pUC19 ligiert (pIM3). Der klonierte Bereich wurde mit einem SacI/SphI-Verdau in den ebenso geschnittenen Vektor pMHH1 umklontiert (pIM1). Dieses Plasmid wurde in *E. coli* SM10 $\lambda$ pir elektroporiert. Zur Replikation von pMHH1 und seinen Derivaten ist das Vorhandensein des sog.  $\pi$ -Faktors unerlässlich; dieser Faktor ist in *E. coli* SM10 $\lambda$ pir enthalten, nicht aber in *E. coli* DH5 $\alpha$  oder den hier verwendeten *E. coli* K1-Stämmen. In



Stämmen ohne  $\pi$ -Faktor kann das Plasmid also nur über eine homologe Rekombination in das bakterielle Chromosom erhalten werden.

#### 4.17.2.2. Erzeugung von Transkonjuganden durch Konjugation

Über die auf pMHH1 codierten *mob*-Gene sowie weitere Faktoren von SM10 $\lambda$ pir können Plasmide gerichtet von dem Donorstamm an einen Rezipienten übertragen werden („Konjugation“). Für die Erzeugung von Transkonjuganden wurden Donor (SM10 $\lambda$ pir/pIM1) und Rezipient (RS218 bzw. IMT5155) in 5 ml LB-Medium bei 37° C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-1 angezogen, für den Donorstamm wurden dem Medium 30  $\mu$ g/ml Chloramphenicol zugesetzt. Anschließend musste der Donorstamm zweimal mit 5 ml LB-Medium für 10 min bei 4000 rpm (Megafuge 1.0) gewaschen und in 5 ml LB-Medium aufgenommen werden, um das Antibiotikum wieder zu entfernen. 1 ml Donor wurde mit 0,5 ml Rezipient gemischt und bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und die Suspension etwa 2 €-Stück groß auf einer COS-Platte ausgestrichen. Die Konjugation fand über Nacht bei 37° C statt. Am nächsten Tag wurde der Bakterienrasen in 1 ml LB-Medium eingerieben und eine Verdünnungsreihe dieser Suspension bis 10<sup>-4</sup> in 1 $\times$  PBS erstellt. 50  $\mu$ l jeder Verdünnungsstufe wurden auf Chloramphenicol-haltigen MacConkey-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Um den Rezipienten- von dem Donorstamm zu trennen, wurden am nächsten Tag insgesamt vier große, rote Einzelkolonien (Rezipient) gepickt und mit einem Drei-Ösen-Ausstrich auf Chloramphenicol-haltigen MacConkey-Agar überimpft. Dieser Schritt wurde mindestens dreimal wiederholt, bis keine kleinen, farblosen Kolonien (Donor) mehr auf der Platte zu erkennen waren. Mit dem Wachstum von Rezipientenstämmen auf Chloramphenicol-haltigem MacConkey-Agar wurde die Rekombination von pIM1 in das *E. coli* K1 Genom bestätigt.

#### 4.17.2.3. Erzeugung von Mutanten aus Transkonjuganden

In der zweiten Selektionsrunde sollten aus den Transkonjuganden aus 4.17.2.2. Mutanten erzeugt werden, die nur noch den gewünschten Austausch von *neuO* gegen die CAT-Kassette aufwiesen, nicht aber weitere pMHH1-Bestandteile. Durch das in pMHH1 enthaltene *sacB* Gen wird bei Verstoffwechselung von Sucrose ein toxisches Produkt erzeugt, und ausschließlich Bakterien, die pMHH1 nicht mehr enthalten, überleben auf Sucrose-haltigen Platten [Übersicht in: (Reyrat *et al.*, 1998)]. Um solche Klone zu finden, wurde eine Kolonie der Transkonjugande in 5 ml LB-Medium eingerieben und bei 37° C ca. 2 h geschüttelt, bis eine leichte Trübung des Mediums sichtbar wurde. Aus dieser Suspension wurde

anschließend eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-4}$  erstellt, und je 50  $\mu$ l pro Verdünnungsstufe wurden auf LB-Platten mit 10% Sucrose ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei RT und am nächsten Tag bei 28° C inkubiert, bis sich nach ca. 4 h sucroseresistente Klone deutlich vom Hintergrund abhoben. Die etwas größeren, sich vom Hintergrund abhebenden Kolonien überführte man mit einem Zahnstocher auf Sucrose-, Ampicillin- bzw. Chloramphenicol-haltige LB-Platten. Sucrose/Ampicillin-negative (kein pMHH1), Chloramphenicol-positive Klone wurden näher charakterisiert, um eine 2. homologe Rekombination zu bestätigen. Der Austausch von *neuO* gegen die CAT-Kassette und die Identität der *knock out*-Mutanten IMT5155 $\Delta$ *neuO* und RS218 $\Delta$ *neuO* wurde durch PCR (IM30/CM1 und CM2/HC448) und anschließende DNA-Sequenzierung, DNA-Hybridisierung (Sonden: HC402/403 und CAT1/CAT2) sowie phänotypisch durch Objektträgeragglutination mit mAb735 und mAb58-5 überprüft.

#### 4.17.3. Komplementation von *neuO*-negativen *E. coli* K1-Isolaten in trans

Über die Elektroporation wurden *neuO*-negative bzw. *neuO*-*knock out* *E. coli* K1-Stämme *in trans* mit Plasmid p4A (funktionelles NeuO) bzw. Plasmid p4A:H119A (nicht-funktionelles NeuO) komplementiert (Bergfeld *et al.*, 2007). Einige *neuO*-negative *E. coli* K1-Stämme, in die p4A:H119A bzw. p4A eingebracht werden sollten, waren Ampicillin-resistent. Um diese Stämme komplementieren zu können, wurden neue Konstrukte hergestellt, in denen die Ampicillin-Kassette aus p4A:H119A bzw. p4A durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt wurde. Dazu wurde die Ampicillin-Kassette aus beiden Plasmiden zunächst über eine inverse PCR (IM9/IM10) entfernt. Die Kanamycin-Kassette wurde mit PstI aus pUC4K herausgeschnitten und über die NsiI-Schnittstellen der Primer IM9/IM10 in p4A:H119A bzw. p4A ligiert, wodurch p4A:H119A-Kan<sup>R</sup> und p4A-Kan<sup>R</sup> entstanden.

### 4.18. Methoden zum Antigennachweis

#### 4.18.1. Objektträgeragglutination

Für den Nachweis der *E. coli* K1-Kapsel sowie der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung wurde die Objektträgeragglutination mit mAb735 bzw. mAb58-5 angewendet. Dafür gab man 10  $\mu$ l der unverdünnten Antikörper-Lösung auf einen Objektträger, und mit einem Zahnstocher wurden über Nacht gewachsene Bakterien von einer Agarplatte abgenommen und in den Antikörper eingerieben. Wenn die Lösung nach Einreiben der Bakterien trüb blieb, war das Ergebnis negativ. Wenn sich jedoch kleine Verklumpungen bildeten, war das Ergebnis positiv, d. h. die Bakterien besaßen das spezifische Antigen, das mit dem Antikörper zu

Antigen/Antikörper-Komplexen reagierte. Die Objektträgeragglutination wurde vor allem für die Überprüfung des Phänotyps von gentechnisch veränderten Stämmen eingesetzt; sie eignet sich aufgrund des hohen Antikörperverbrauchs aber nicht für Screening-Verfahren.

#### 4.18.2. Kolonie-Immunoblot mit mAb735

##### Lösungen:

Lösung A	500 mM NaOH
Lösung B	1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
Lösung C	2 × SSC
Lösung D	70% Ethanol (v/v) in Aqua dest.
BSA	1% BSA in 1× PBS, 0,2% BSA in 1× PBS
Lösung E	100 mM Tris-HCl, pH 9,6
Substratlösung	100 mM Tris-HCl, pH 9,6/1 mM MgCl <sub>2</sub> /1 mg NBT/ 0,5 mg BCIP in 10 ml; Lösung frisch ansetzen.

Um eine *E. coli* K1-Stammsammlung aufzubauen, wurden alle gesammelten, in Tabelle 8-1 aufgeführten *E. coli* (MAC)-Isolate mit dem K1-spezifischen mAb735 im Kolonie-Immunoblot auf das Vorhandensein der K1-Kapsel getestet. Zu testende *E. coli*-Stämme wurden über Nacht auf einer LB-Agarplatte angezogen. Die gewachsenen Kolonien wurden auf eine Nitrocellulosemembran überführt und für 10 min unter dem Flow getrocknet. Die Lyse und Fixierung der Bakterien wurde durch je 5-minütige Inkubationen der Membran auf dicken Whatman-Filter, die mit den Lösungen A, B (zweimal), C und D getränkt wurden, erreicht. Nach dem erneuten Trocknen der Membran wurde diese ab jetzt schüttelnd auf dem PheroShaker zunächst für 30 min bei RT mit 1% BSA in PBS blockiert und anschließend für 1 h mit 10 ml des 1. Antikörpers mAb735 (1:1000 in 1% BSA/PBS, zweimal verwendbar) inkubiert. Es schlossen sich drei 10-minütige Waschschrte mit 0,2% BSA/PBS an, nach denen 10 ml des 2. Antikörpers Goat- $\alpha$ -Maus-AP (1:5000 in 0,2% BSA/PBS, einmal verwendbar) für 1 h auf die Membran gegeben wurden. Es wurde erneut, wie oben beschrieben, zweimal mit 0,2% BSA/PBS, und anschließend einmal mit Lösung E gewaschen. Nach einer 5- bis 10-minütigen Inkubation mit Substratlösung verfärbten sich K1-positive *E. coli*-Isolate violett. Die Reaktion wurde mit Aqua dest. abgestoppt. K1-positive Isolate konnten sofort identifiziert und mit einer  $\delta$ -Nummer versehen in die Stammsammlung des IHM Würzburg eingefroren werden (Tab. 8-2).

#### 4.18.3. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

##### Lösungen:

Poly-D-Lysin	25 $\mu$ g/ml in 1× PBS
--------------	-------------------------

Waschpuffer	1× PBS
Glutaraldehydlösung	0,05% in 1× PBS
Blockierungspuffer	1% BSA in 1× PBS
ABTS	1× ABTS-Substrattablette (50 mg) in 1% Substratpuffer (50 ml) bei 4° C lagern

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren, bei dem Antigene (hier: K1-Kapsel bzw. K1-Kapsel O-Acetylierung) mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (hier: mAb735 bzw. mAb58-5) und einer anschließenden enzymatischen Farbreaktion detektiert werden können.

Die für den ELISA verwendeten 96-Well Mikrotiterplatten (high-binding für ELISA) wurden vor der Zugabe von Antigen für 1 h mit 20 µl Poly-D-Lysin bei RT inkubiert, um die Bindungskapazität der Platten zu erhöhen, und anschließend dreimal mit 1× PBS gewaschen. Über Nacht angezogene *E. coli* K1-Stämme wurden in 1× PBS auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 eingestellt, und 20 µl dieser Suspension wurden in die Vertiefungen der präparierten Mikrotiterplatten pipettiert. Zur Bakterienanlagerung (=Antigenanlagerung) wurde die Platte 1 h abgedeckt bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37° C mit 100 µl Glutaraldehydlösung (Abtöten und Fixieren der Bakterien) wurde die Platte dreimal mit 1× PBS gewaschen. Durch eine 30-minütige Inkubation bei 37° C mit 150 µl Blockierungspuffer wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Anlagerung des 1. Antikörper (20 µl mAb735, 1:400 bzw. mAb58-5, 1:100 in Blockierungspuffer) für 45 min bei 37° C. Die Platte wurde wieder dreimal gewaschen, und mit 20 µl des POX-konjugierten 2. Antikörper (Goat- $\alpha$ -Maus IgG&IgM, 1:2000 in Blockierungspuffer) beschickt 30 min bei 37° C inkubiert. Nach dem letzten Waschen der Platte wurden 20 µl ABTS in die Vertiefungen gegeben, um den ELISA zu entwickeln. Nach 3, 5 und 10 min Inkubation bei 37° C wurde die OD<sub>414nm</sub> im ELISA-Reader (MultiScan EX) bestimmt.

#### **4.19. Funktionelle Analysen**

##### *4.19.1. Infektionsversuche mit HBMEC*

Für die Infektionsversuche mit *E. coli* K1 wurden zunächst  $5 \times 10^4$  HBMEC in die Vertiefungen einer 24-Well Mikrotiterplatte ausgesät und zwei Tagen bei 37 ° C inkubiert, um eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  zu erreichen (überprüft durch Zellzählung). Um die Zellen infizieren zu können, wurde der Überstand von den HBMEC abgenommen, und die Zellen wurden dreimal mit 1× PBS gewaschen. Für die Herstellung der Infektionslösung wurden über Nacht angezogene *E. coli* K1-Stämme in 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika eingerieben und bei 37° C geschüttelt. Nach 45 min wurde die OD<sub>600nm</sub> der

Bakterien bestimmt. Für Infektionsversuche mit dem RS218-Stammpaar wurde eine Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) von 40 ( $4 \times 10^6$  Bakterien/ $1 \times 10^5$  HBMEC), für Versuche mit dem A160-Stammpaar wurde eine MOI von 600 ( $6 \times 10^7$  Bakterien/ $1 \times 10^5$  HBMEC) in Infektionsmedium verwendet. Nach 4 h Inkubation bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> wurden Adhärenz sowie Invasion der Bakterien bestimmt. Dazu wurde die Infektionslösung zunächst von den Zellen entfernt. Für die Bestimmung der Adhärenz wurden nicht-adhärente Bakterien durch dreimaliges Waschen mit 1× PBS entfernt, und die HBMEC wurden für 10 min mit 1 ml 1% Saponin bei 37° C lysiert. Die Zellen wurden mit der Pipettenspitze vom Boden der Vertiefungen abgekratzt, gemischt und in eine 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurden Verdünnungsreihen in 1× PBS hergestellt und auf LB-Platten ausplattiert, um am nächsten Tag die CFU zu bestimmen. Mit dieser Vorgehensweise wurden alle zell-assoziierten Bakterien erfasst; aufgrund der geringen Anzahl invadierter Bakterien im Vergleich zu adhärenzhaften Bakterien werden die invadierten Bakterien aber vernachlässigt und es wird nur von Adhärenz gesprochen. Für die Bestimmung der *E. coli* K1-Invasion in HBMEC wurde ein *gentamicin protection assay* zur Abtötung extrazellulärer Bakterien durchgeführt. Dafür wurde die Infektionslösung durch 1 ml Gentamicinlösung ersetzt, und der Ansatz 1 h bei 37° C weiterinkubiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen, deren Lyse mit Saponin und die CFU-Bestimmung (s. o.). Für das A160-Stammpaar wurden Infektionsdauer sowie MOI modifiziert: Bei einer Infektionsdauer von 90 min wurde eine MOI von 1000 auf die Zellen gegeben, und Adhärenz und Invasion wurden bestimmt. Für eine 24- bzw. 48-stündige Infektion wurden die HBMEC mit einer MOI von 10 infiziert. Nach 4 h wurde die Bakteriensuspension durch Infektionsmedium mit 200 µg/ml Gentamicin ersetzt, der Ansatz bei 37° C weiter inkubiert, und die Invasion nach dem gewünschten Zeitraum ermittelt.

### 4.19.2. In vivo-Experimente mit White Leghorn-Hühnern

*In vivo*-Experimente mit *White Leghorn*-Hühnern wurden in einer Kooperation mit Christa Ewers und Lothar Wieler am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen in Berlin realisiert. Für alle *in vivo*-Experimente wurden 5-Wochen alte, spezifisch pathogenfreie Hühner der Rasse *White Leghorn* aus der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, verwendet.

#### 4.19.2.1. In vivo-Infektionsexperimente

Für *in vivo*-Infektionsversuche wurden pro Stamm sechs (IMT5155-Varianten) bzw. vier (IMT9579-Varianten) Tiere intratracheal mit 500 µl einer log-Phase Kultur, die auf eine Bakteriendichte von ca.  $5 \times 10^9$  eingestellt wurde, infiziert und stündlich bezüglich ihres

Gesundheitszustandes überwacht. Die Tiere wurden 24 h nach der Infektion euthanisiert. Um die bakteriellen Keimzahlen in verschiedenen Organen bestimmen zu können, wurden Gewebeproben entnommen und in  $1 \times$  PBS (1 ml/g Organ) mit dem Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik) homogenisiert. Verdünnungsreihen der Suspensionen wurden in  $1 \times$  PBS erstellt und auf LB-Platten ausplattiert. Um das Plasmidvorhandensein nachzuweisen, wurden stichprobenartig einige Verdünnungsstufen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen, und das Wachstum von aus dem Tier reisolierten Stämmen auf Selektivplatten bestätigte das Vorhandensein des jeweiligen Plasmids. Nach 24-stündiger Infektion bei  $37^\circ \text{C}$  konnten Kolonien ausgezählt und die Keimlast als CFU pro g Organ bestimmt werden.

#### 4.19.2.2. *In vivo-Kolonisierungsexperimente*

Um die Kolonisierung des Hühnerdarms durch *E. coli* K1 zu bestimmen, wurden jeweils zwölf Tiere pro Stamm (IMT5155-Varianten) per Knopfkanüle zunächst mit 500  $\mu\text{l}$  einer 10%igen Natrium-Bikarbonat-Lösung vorbehandelt, um den pH-Wert des Magens zu erhöhen und es einer möglichst großen Menge Bakterien zu ermöglichen, den Magen zu passieren. 30 min nach dieser Behandlung wurden die Tiere über die Knopfkanüle mit  $1 \times 10^{10}$  Bakterien in PBS inokuliert. Die Natrium-Bikarbonat-Behandlung sowie die Inokulation mit Bakterien wurden nach 24 h wiederholt („Booster“-Effekt). Die Kloake der Tiere wurde vor Inokulation der Bakterien sowie danach täglich mit einem Wattetupfer abgestrichen. Das Material wurde auf *Enterobacteriaceae*-spezifische Gassner-Platten, die entsprechend der Antibiotikaresistenz der eingesetzten Stämme mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 30  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol supplementiert waren, überimpft. Diese Strategie verhinderte das Wachstum anderer Darmbakterienspezies. Wenn ein Wachstum auf den Selektivplatten zu detektieren war, wurde das entsprechende Tier als mit dem jeweiligen Bakterium besiedelt betrachtet. Einige gewachsene Stämme wurden mit der p4A:H119A (QE<sub>R</sub>-IM35)- bzw. p4A (QE<sub>R</sub>-IM34)- spezifischen PCR auf das Vorhandensein des jeweiligen Plasmids überprüft.

#### 4.19.3. *Statische in vitro-Biofilmbildungsexperimente*

Die statische *in vitro*-Biofilmbildung wurde in Anlehnung an das Protokoll von O'Toole und Kolter (O'Toole & Kolter, 1998) mit dem Kristallviolett-Assay quantifiziert. Von den zu untersuchenden Bakterien wurde eine OD<sub>600nm</sub> von 0,01 in LB:PBS (20:80, v/v) eingestellt, und 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension inkubierten 24 h bei  $37^\circ \text{C}$  in 96-Well Mikrotiterplatten (Flachboden). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Bakterien einmal mit 200  $\mu\text{l}$  Aqua dest. gewaschen, und mit 100  $\mu\text{l}$  Kristallviolett für 10 min bei  $37^\circ \text{C}$  angefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit 200  $\mu\text{l}$  Aqua dest. wurde das Kristallviolett für 30 min bei RT mit

100 µl Ethanol aus dem Biofilm extrahiert, und anschließend im Platten-Photometer (MultiScanEX) bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert.

#### 4.19.4. Austrocknungsexperimente mit Hühnertrockenkot

Hühnertrockenkot (HTK) der Firma Anton Knoll wurde von Federn und Eierschalenreste befreit, zur Homogenisierung gesiebt, und zum Abtöten enthaltener Keime autoklaviert. Im Anschluss wurde der HTK in sterilem Aqua dest. (14% w/v) resuspendiert und 8 min konstanter Beschallung mit Ultraschall (Output=8, Branson Sonifier 450) ausgesetzt, um die Suspension zu homogenisieren. Über Nacht auf Agarplatten angezogene Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium eingerieben, und die OD<sub>600nm</sub> der Suspension wurde bestimmt. Anschließend pelletierte man die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 20° C (Megafuge1.0) und verwarf den Überstand. Zum Einstellen einer Zelldichte von 2×10<sup>10</sup>/ml wurden die Bakterien in dem entsprechenden Volumen HTK-Suspension aufgenommen. Je 50 µl (entspricht 1×10<sup>9</sup> Bakterien) der HTK/Bakterien-Suspension wurden auf Glasplättchen (Ø 15 mm) gegeben, die sich in einer 24-Well-Mikrotiterplatte befanden, und für 4 h unter der Sicherheitswerkbank luftgetrocknet. Danach wurden die Plättchen dunkel bei 15-20° C und einer Luftfeuchtigkeit von 30-40% gelagert; diese Werte wurden konstant dreimal pro Tag ermittelt (Temperatur-Feuchtlogger TA120). Zu definierten Zeitpunkten (s. 5.3.4.) wurden zwei Glasplättchen pro Stamm entnommen und in je ein 50 ml PP-Röhrchen gegeben. Die getrocknete HTK/Bakterien-Suspension wurde in 1 ml 1× PBS resuspendiert, Verdünnungsreihen in 1× PBS hergestellt und auf MacConkey-Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37° C konnte die Anzahl überlebender Bakterien als CFU/50 µl bestimmt werden. Die *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung wurde für alle in die Austrocknungsexperimente eingesetzten Stämme im ELISA mit mAb58-5 überprüft.

#### 4.19.5. Wachstumskurven

Über Nacht auf LB-Agar gewachsene *E. coli* K1-Stämme wurden in 20 ml LB/PBS (1:5, v/v) auf eine OD<sub>600nm</sub>=0,01 eingestellt und bei 37° C schüttelnd inkubiert. Wenn nötig, wurden dem Medium je nach Stamm entsprechende Antibiotika zugegeben. Die OD<sub>600nm</sub> der Bakterien wurde über 6 h alle 30 min bestimmt.

## 4.20. Datenauswertung

### 4.20.1. Statistik

Für die Analyse nicht-zufälliger Assoziationen von zwei unabhängigen Variablen wie dem ST und dem *neuO*-Vorhandensein wurde in dieser Arbeit der 2-seitige Fisher's Exakt Test auf <http://www.langsrud.com/fisher.htm> verwendet. Unterschiede zwischen O-acetylierten und nicht-O-acetylierten Bakterien in den verschiedenen funktionellen Tests (s. 5.3.) wurden mit dem 2-seitigen, gepaarten Student's *T*-Test bezüglich ihrer Signifikanz analysiert (Excel, Microsoft).

### 4.20.2. Simpson's Diversitätsindex und Speziesreichtum

Der Simpson's Diversitätsindex für die *E. coli* K1-Stammsammlung wurde auf <http://www.comparingpartitions.info/index.php?link=Tool> berechnet (Hunter & Gaston, 1988). Weitere Informationen zu diesem Test sowie zum Speziesreichtum sind auf <http://www.countrysideinfo.co.uk/simpsons.htm> zu erhalten.

### 4.20.3. DNA-Sequenzanalyse

Die Programme EditSeq und MegAlign (DNASar, Madison, WI, USA) wurden für die Analyse und Auswertung von DNA-Sequenzdateien verwendet. Mit dem Programm Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) konnten DNA-Chromatogramme begutachtet werden. Das Programm TraceEditPro (Ridom, Würzburg) fügte auf Basis von DNA-Chromatogrammen MLST- bzw. CUS-3-Sequenzen doppelsträngig zusammen.

### 4.20.4. Konkat-Meister

Das Programm Konkat-Meister wurde von Dr. med. Johannes Elias programmiert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Quellcode ist bei Dr. med. Johannes Elias, IHM Würzburg, auf Anfrage erhältlich. Mit dem Programm Konkat-Meister können Textdateien verknüpft („konkateniert“) werden. Diese Funktion wurde in der vorliegenden Arbeit für die Konkatenierung von MLST- und CUS-3-Sequenzdaten verwendet.

### 4.20.5. SplitsTree und NeighborNet

Die mit Konkat-Meister erzeugten konkatenierten Sequenzen wurden mit ClustalW abgeglichen („aligned“). Netzwerke wurden auf Basis von unkorrigierten *p*-Distanzen („*uncorrected p-distances*“) mit der *NeighborNet*-Methode in *SplitsTree* v4.10 (Huson & Bryant, 2006, Bryant & Moulton, 2004) erzeugt. MLST- und CUS-3-Gruppen mit ähnlichen



ST bzw. CUS-3\_GT wurden auf Basis von *Bootstrap*-Werten über 70% in 1000 Wiederholungen definiert.

### 4.20.6. Hauptkomponentenanalyse

Für die Hauptkomponentenanalyse wurden die konkatenierten MLST- und CUS-3-Sequenzen zunächst mit MUSCLE [(Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004)] aligned. Die über *SplitsTree* und *NeighborNet* definierten MLST- und CUS-3-Gruppen konnten anschließend mit der Hauptkomponenten-Analyse (principal component analysis) unter Verwendung von Jalview (Clamp *et al.*, 2004) auf <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html> bestätigt werden.

### 4.20.7. UPGMA-Analyse

Hybridisierungsdaten der sechs untersuchten ExPEC-Gene *etsA*, *hlyF*, *ibeA*, *hlyD*, *malX* und *fyuA* wurden mit dem Programm START (*Sequence Type Analysis and Recombinational Tests*) und der darin enthaltenen UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*)-Clusteranalyse (Jolley *et al.*, 2001) ausgewertet.

## 5. Ergebnisse

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden phylogenetische sowie funktionelle Aspekte der *Escherichia coli* K1 O-Acetyltransferase NeuO untersucht. Für phylogenetische Analysen (s. 5.1.) wurde eine *E. coli* K1-Stammsammlung mit Isolaten unterschiedlicher Herkunft erstellt und anhand der auf DNA-Sequenzen basierenden MLST typisiert, um die Verteilung von *neuO* innerhalb der *E. coli* K1-Population zu untersuchen. Die Sequenzanalyse von *neuO* sowie von weiteren Genen des *neuO*-kodierenden Prophagen CUS-3 ermöglichte die Abschätzung der evolutionären Beziehung zwischen dem Phagen und seinem Wirt *E. coli* K1. Einige humane und aviäre Isolate wurden bezüglich ihrer Verwandtschaft analysiert (s. 5.2.). Für funktionelle Analysen (s. 5.3.) wurden nicht-O-acetylierte und O-acetylierte *E. coli* K1-Stämme in Zellkultur-, Tier-, Biofilm- und Austrocknungsversuchen verglichen. Mit diesen Experimenten wurde der Einfluss der NeuO-vermittelten K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Anpassung des Bakteriums an die genannten Umweltbedingungen untersucht.

### 5.1. Phylogenetische Analysen der *E. coli* K1 O-Acetyltransferase *neuO*

Die unter dem Abschnitt 5.1.1.1. beschriebene *E. coli* K1-Stammsammlung, die MLST (s. 5.1.1.2.) sowie Untersuchungen zum CUS-3 kodierten O-Acetyltransferasegen *neuO* (s. 5.1.2.) wurden in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Heike Claus und Frau M.Sc. Julia Batzilla (geb. Pagels) erstellt bzw. durchgeführt und sind in Teilen auch Gegenstand der Masterarbeit von Frau M.Sc. Julia Batzilla.

#### 5.1.1. *E. coli* K1-Populationsbiologie

##### 5.1.1.1. *E. coli* K1-Stammsammlung

Über einen Zeitraum von zwei Jahren (2005 und 2006) wurden 633 *E. coli*-Stämme gesammelt. Die Isolate stammten zum Einen aus Stuhlproben gesunder Freiwilliger (n=147), darunter Mitarbeiter des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) Würzburg und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), sowie Studenten, die verschiedene Kurse am IHM besuchten. Zum Anderen wurden Isolate von der diagnostischen Abteilung des IHM Würzburg bereitgestellt, die aus dem Urin von an HWI erkrankten Patienten (n=457) oder aus dem Blut von an einer *E. coli*-Bakteriämie erkrankten, adulten Patienten (n=23) stammten (Tab. 5-1 und 8-1). Sechs Isolate wurden aus Cervixabstrichen gewonnen, bei denen eine Assoziation mit einer Erkrankung aber unbekannt ist.

Für alle gesammelten *E. coli*-Stämme wurde ein Kolonie-Immunoblot mit dem K1-spezifischen Antikörper mAb735 durchgeführt (Frosch *et al.*, 1985), um die Isolate auf das Vorhandensein der K1-Kapsel zu untersuchen. Alle *E. coli* K1-Stämme wurden mit dem Präfix  $\delta$  und einer fortlaufenden Nummer gekennzeichnet. Insgesamt konnten 106 K1-positive *E. coli*-Stämme detektiert werden, von denen 42 aus Stuhlproben, 58 aus Urin und fünf aus Blutkulturen stammten; ein K1-Stamm wurde aus einem Cervixabstrich isoliert (Tab. 5-1, 8-1 und 8-2). Die K1-Kapsel wurde statistisch signifikant häufiger bei Isolaten aus Stuhlproben als bei Isolaten aus HWI identifiziert ( $p < 0,0005$ , Fisher's Exakt Test, 2-seitig).

Tabelle 5-1: Überblick über die am IHM Würzburg gesammelten *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> aus...	Anzahl gesammelter <i>E. coli</i> -Stämme	Anzahl K1-positiver <i>E. coli</i> -Stämme	Prozent K1-positiver <i>E. coli</i> -Stämme (%)
Stuhlproben	147	42	29
Urin	457	58	13
Blutkultur	23	5	22
Cervixabstrichen	6	1	17
Gesamt	633	106	17

Um die Diversität der Stammsammlung zu erhöhen, wurden neben humanen *E. coli* K1-Isolaten auch Stämme aviären Ursprungs sowie Isolate aus verschiedenen geographischen Regionen und aus unterschiedlichen Jahren mit in die Studie einbezogen. Daher wurde die oben beschriebene Sammlung um weitere 77 *E. coli* K1-Stämme aus den Laboren von Mark Achtman (ehemals: Max Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin), Lothar Beutin (ehemals: Robert Koch-Institut, Berlin), Ulrich Dobrindt (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg) sowie Christa Ewers und Lothar Wieler (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin) ergänzt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* K1-Stämme sind in den Tabellen 5-2 und 8-2 zusammengefasst. Insgesamt wurden 183 *E. coli* K1-Stämme analysiert, darunter 144 Isolate humanen und 39 Isolate aviären Ursprungs, die zwischen 1943 und 2006 in elf verschiedenen Ländern gesammelt wurden. Unter den humanen Stämmen waren 59 aus asymptomatischen Trägertum, 61 stammten aus HWI und 22 wurden aus invasiven Erkrankungen isoliert (unter dem Begriff „invasive Erkrankungen, IE“ sind in dieser Arbeit Neugeborenen-Meningitis und Bakteriämie zusammengefasst). Je ein humanes Isolat stammte aus einem Cervix-Abstrich bzw. von einer Appendizitis. Alle aviären Isolate (n=39) stammten von an Coliseptikämie erkrankten Vögeln (Tab. 5-2 und 8-2).

Tabelle 5-2: *E. coli* K1-Stammsammlung.

Wirt	Epidemiologie	Land	Anzahl	Sammlungszeitraum
Geflügel	Coliseptikämie	Deutschland	24	1980-2004**
Geflügel	Coliseptikämie	Frankreich	4	1993***
Vögel	Coliseptikämie	Israel	4	nicht bekannt
Vögel	Coliseptikämie	Niederlande	3	2003
Pute	Coliseptikämie	Kanada	1	1993
Huhn	Coliseptikämie	Jordanien	1	2000
Huhn	Coliseptikämie	USA	1	nicht bekannt
Ente	Coliseptikämie	nicht bekannt	1	1999
Mensch	Appendizitis	Schweden	1	1943
Mensch	Cervixabstrich	Deutschland	<b>1</b>	2005
Mensch	Asymptomatisches Trägertum	Deutschland	<b>42</b>	2005/06
Mensch	Asymptomatisches Trägertum	Deutschland	10	nicht bekannt
Mensch	Asymptomatisches Trägertum	Großbritannien	3	1977-1979**
Mensch	Asymptomatisches Trägertum	USA	2	1978**
Mensch	Asymptomatisches Trägertum	Belgien	1	1948
Mensch	Asymptomatisches Trägertum	nicht bekannt	1	nicht bekannt
Mensch	Invasive Erkrankung*	Deutschland	<b>5</b>	2005/06
Mensch	Invasive Erkrankung	Deutschland	1	nicht bekannt
Mensch	Invasive Erkrankung	USA	5	1974-1977
Mensch	Invasive Erkrankung	Finnland	5	1976/77**
Mensch	Invasive Erkrankung	nicht bekannt	6	nicht bekannt
Mensch	Harnwegsinfekt	Deutschland	<b>58</b>	2005/06
Mensch	Harnwegsinfekt	Finnland	1	nicht bekannt
Mensch	Harnwegsinfekt	Schweden	1	nicht bekannt
Mensch	Harnwegsinfekt	nicht bekannt	1	nicht bekannt

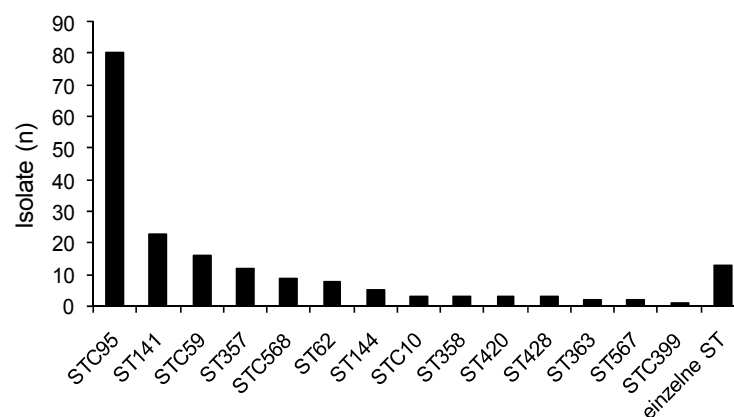
Fett gedruckt: Isolate aus der  $\delta$ -Stammsammlung des IHM Würzburg (s. Tab. 5-1).

\*Der Begriff „Invasive Erkrankung“ umfasst Neugeborenen-Meningitis und Bakteriämie. \*\*Isolierungsjahr von einem Isolat nicht bekannt. \*\*\*Isolierungsjahr von drei Isolaten nicht bekannt.

### 5.1.1.2. Multilokus-Sequenztypisierung der *E. coli* K1-Stammsammlung

Alle 183 Isolate der unter 5.1.1.1. beschriebenen *E. coli* K1-Stammsammlung sind mittels der auf DNA-Sequenzen basierenden Typisierungsmethode MLST nach dem Schema von M. Achtman analysiert worden (Wirth *et al.*, 2006), um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen Isolaten bestimmen zu können. Anhand der DNA-Sequenzen von Haushaltsgenen und anschließendem Abgleich der Sequenzen mit Allelen in der Datenbank <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli> konnten den *E. coli* K1-Stämmen Sequenztypen und Sequenztyp-Komplexe zugeordnet werden.

Für die sieben in der MLST zu analysierenden Haushaltsgene *adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA* wurden jeweils 12, 15, 16, 13, 13, 14 bzw. 14 unterschiedliche Allele in den untersuchten *E. coli* K1-Stämmen ermittelt. Deren unterschiedliche Kombinationen führten zu der Identifizierung von 39 verschiedenen ST, die innerhalb der Stammsammlung aber nicht gleich oft vorkamen (Abb. 5-1). Der mit Abstand häufigste ST war der ST95 (n=61), gefolgt von ST141 (n=23), ST59 (n=13) und ST357 [(n=12) (Abb. 5-1)]. 13 ST wurden jeweils nur in einem Stamm gefunden. 17 Isolate wurden neue ST zugeordnet, die vorher noch nicht identifiziert und in der *E. coli* MLST-Datenbank vertreten waren. Insgesamt 109 Isolate wurden Sequenztyp-Komplexen zugeordnet, die ST zusammenfassen, die sechs Allele mit dem Gründer-ST des Komplexes teilen (vgl. Abb. 3-2). Der Sequenztyp 95-Komplex [(STC95) (n=80)] war der häufigste Komplex, gefolgt von STC59 (n=16), STC568 (n=9), STC10 (n=3) und STC399 [(n=1) (Abb. 5-1)]. Die zu den jeweiligen ST zählenden ST sind Tabelle 5-3 zu entnehmen; in Tabelle 5-3 finden sich auch weitere Informationen zu den Charakteristika der gesammelten *E. coli* K1-Isolate.



**Abbildung 5-1:** Häufigkeit der verschiedenen Sequenztypen und Sequenztyp-Komplexe in der *E. coli* K1-Stammsammlung. Einzelne ST wurden nur in jeweils einem Isolat gefunden.

Tabelle 5-3: Genetische Charakterisierung der 183 gesammelten *E. coli* K1-Stämme.

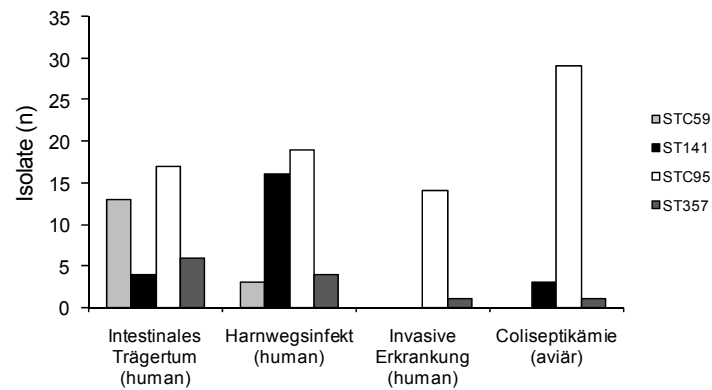
Sequenztyp (n)	Sequenztyp-Komplex (n)	Epidemiologie (n)	<i>neuO</i> -positive Isolate (n)	CUS-3-Genotyp [(n) (GT)]	Isolate mit <i>neuO</i> an <i>argW</i> (n)
10 (3)	10 (3)	hu TR (2), hu HWI (1)	1	n. z.	1
59 (13), 379 (2), 415 (1)	59 (16)	hu TR (13), hu HWI (3)	0	-	0
62 (8)		hu TR (3), hu IE (5)	7	GT8 (1)	1
95 (61), 140 (5), 142 (1), 368 (1), 370 (1), 390 (7), 416 (1), 417 (1), 418 (1), 421 (1)	95 (80)	hu TR (17), hu HWI (19), hu IE (14), hu Ap (1), av CS (29)	78	GT1 (1), GT2 (38), GT3 (1), GT4 (1), GT5 (3), GT8 (5), GT10 (10), GT 11 (1), GT16 (1)	77
141 (23)		hu TR (4), hu HWI (16), av CS (3)	0	-	0
144 (5)		hu TR (1), hu HWI (3), hu IE (1)	3	GT17 (1), GT18 (2)	3
357 (12)		hu TR (6), hu HWI (4), hu IE (1), av CS (1)	7	GT12 (1), GT14 (1)	7
358 (3)		hu TR (1), hu HWI (1), av CS (1)	2	GT13 (1), GT15 (1)	2
363 (2)		hu TR (1), av CS (1)	0	-	0
399 (1)	399 (1)	hu TR (1)	0	-	0
420 (3)		hu TR (1), hu HWI (1), hu IE (1)	0	-	0
428 (3)		hu TR (1), hu HWI (2)	2	GT6 (1), GT9 (1)	2
567 (2)		hu HWI (2)	0	-	0
80 (8), 568 (1)	568 (9)	hu TR (2), hu HWI (6), hu CV (1)	1	n. z.	1
115, 126, 131, 139, 364, 419, 427, 429, 430, 569, 573, 577, 579 („einzelne ST“)		hu TR (6), hu HWI (3), av CS (4)	2	GT2 (1), GT7 (1)	2
<b>183</b>	<b>109</b>		<b>103</b>		<b>96</b>

Abkürzungen: hu: human; av: aviär; TR: asymptomatisches Trägertum; HWI: Harnwegsinfekt; IE: invasive Erkrankung (Neugeborenen-Meningitis und/oder Bakteriämie); Ap: Appendizitis; CS: Coliseptikämie; CV: Cervixabstrich. n. z., nicht zugeordnet; CUS-3-Genotyp konnte nicht zugeordnet werden.

Durch einen Abgleich der in dieser Arbeit gefundenen Sequenztypen mit den ST der K1-Stämme aus der *E. coli* MLST-Datenbank konnte nachgewiesen werden, dass die vorgestellte Stammsammlung einen beträchtlichen Teil der genetischen Diversität von *E. coli* K1 widerspiegelt (Daten nicht gezeigt). Ein Großteil der *E. coli* K1-Isolate aus der präsentierten K1-Stammsammlung wurde 2005 und 2006 in Würzburg, Deutschland, gesammelt (n=106,  $\delta$ -Stämme). Dieser Datensatz wurde im Hinblick auf Speziesreichtum und Simpson's Diversitätsindex mit den hinzugezogenen K1-Stämmen (n=77) verglichen. Der Speziesreichtum beschreibt die Anzahl verschiedener Organismen (hier: ST), die in einer geografischen Region vorkommen. Der Simpson's Diversitätsindex (Hunter & Gaston, 1988) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei Spezies (ST) aus einer zufällig genommenen Probe zur gleichen Art (ST) gehören; ein Wert von 1 beschreibt die maximale Diversität. In der Würzburger 2005/06- $\delta$ -Sammlung (n=106) wurden mehr verschiedene ST (n=28) gefunden als innerhalb der 77 K1-Stämme aus verschiedenen geografischen Gebieten und Jahren [(n=21) (Tab. 8-2)]. Der Speziesreichtum liegt damit in der deutschen Sammlung über dem der hinzugezogenen Isolate. Der Simpson's Diversitätsindex für die 2005/06- $\delta$ -Kollektion betrug 0.89 und für die restliche Sammlung 0.77. Die K1-Isolate der 2005/06- $\delta$ -Sammlung scheinen also im Vergleich mit den erhaltenen K1-Stämmen diverser zu sein.

Im Folgenden soll auf die Verteilung der vier häufigsten ST bzw. STC innerhalb der verschiedenen klinischen Bedingungen eingegangen werden (Abb. 5-2). STC59-Isolate (n=16) waren fast immer mit asymptomatischem Trägertum assoziiert (n=13). Nur drei Isolate mit diesem ST wurden bei HWI detektiert. Im Gegensatz dazu wurden 70% aller ST141-Stämme (16 von 23) aus HWI isoliert, und nur vier stammten aus Stuhlproben. ST357-Isolate (n=12) dagegen konnten keiner bestimmten klinischen Bedingung zugeordnet werden, sondern wurden zu etwa gleichen Teilen bei intestinale Trägertum (n=6) und HWI (n=4) gefunden; ein Isolat stammte aus einer IE, ein weiteres aus aviärer Coliseptikämie. Auch der STC95 (n=80) konnte sowohl bei intestinalen (n=17), HWI- (n=19) und IE-Isolaten (n=14) detektiert werden.

Einigen humanen und aviären Stämmen konnten dieselben ST zugeordnet werden. Insgesamt 29 von 39 APEC-Stämmen aus dieser Studie gehörten dem STC95 an. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass ab einem gewissen Zeitpunkt der Studie das Interesse speziell bei STC95-Stämmen lag (s. 5.1.2.1.), und aviäre Coliseptikämie-Isolate aus diesem ST-Komplex gezielt untersucht wurden.

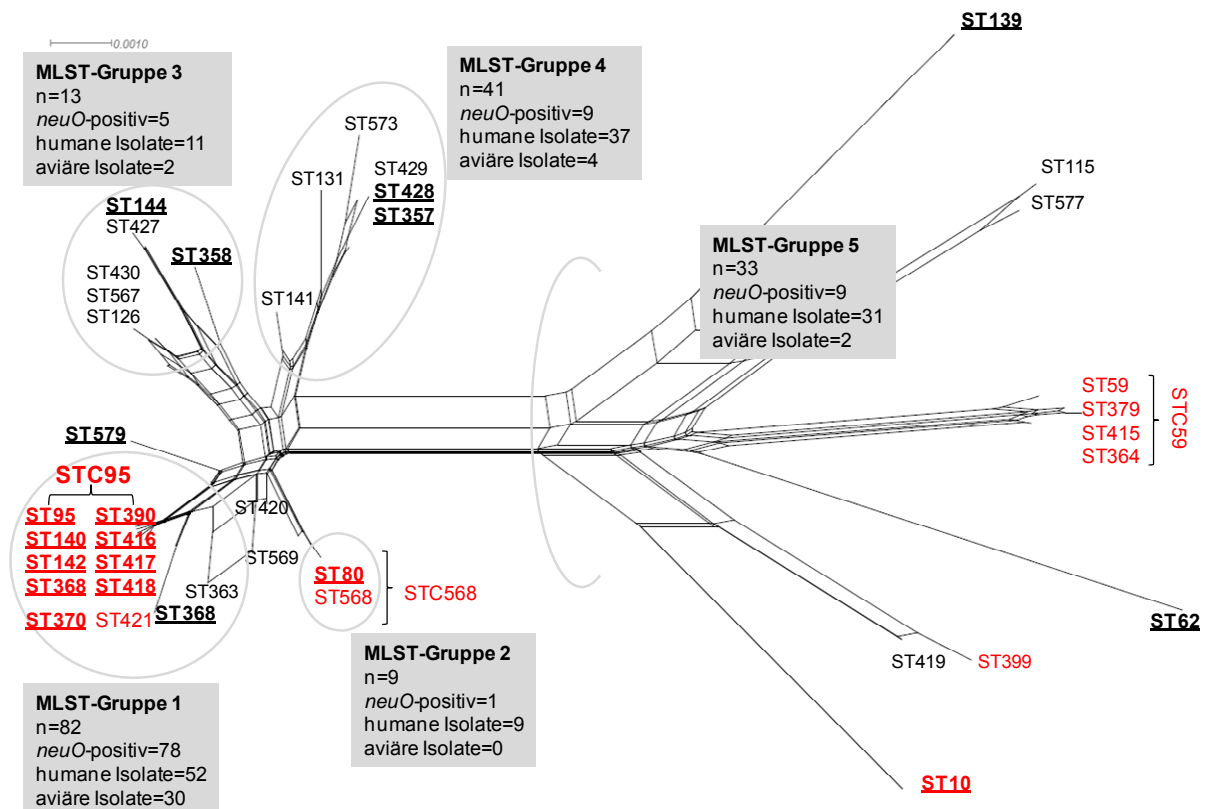


**Abbildung 5-2:** Verteilung der vier häufigsten Sequenztypen bzw. Sequenztyp-Komplexe bei *E. coli* K1 aus unterschiedlichen klinischen Bedingungen. Es ist zu beachten, dass bei der aviären Coliseptikämie ein intendierter Bias bezüglich der Verwendung von STC95-Stämmen vorlag.

Die 39 verschiedenen, in den 183 *E. coli* K1-Isolaten gefundenen ST wurden über die Grenzen von STC hinweg anhand ihrer Ähnlichkeit auf DNA-Ebene gruppiert. Mit dem Programm KonkatMeister konnten die den 39 ST zugrunde liegenden DNA-Sequenzen verknüpft (konkateniert) werden. Über die Funktion *NeighborNet* in dem Programm *SplitsTree* v4.10 (Huson & Bryant, 2006) wurde ein Alignment der konkatenierten DNA-Sequenzen hergestellt. Darauf basierend konnten Netzwerke gebildet werden (Abb. 5-3). Ähnlichkeiten zwischen DNA-Sequenzen der einzelnen ST wurden durch die Berechnung sog. *Bootstrap*-Werte identifiziert, die das Programm *SplitsTree* ausgab. Konnten *Bootstrap*-Werte von mehr als 70% (in 1000 Wiederholungen) ermittelt werden, wurde der Split als statistisch signifikant betrachtet. Alle ST an diesem Split wurden einer MLST-Gruppe zugeordnet. Dieses Vorgehen ermöglichte die Bildung von insgesamt fünf MLST-Gruppen, von denen MLST-Gruppe 1 82 Isolate, Gruppe 2 9, Gruppe 3 13, Gruppe 4 41 und Gruppe 5 33 Isolate beinhaltete. Lediglich ST420 (n=3), ST569 (n=1) und ST579 (n=1) konnten keiner Gruppe zugeordnet werden. Stämme aus dem gleichen STC fanden sich auch in der jeweils gleichen MLST-Gruppe wieder: STC95-Isolate in Gruppe 1, STC568-Stämme in MLST-Gruppe 2 und STC59-Isolate in Gruppe 5. Humane und aviäre *E. coli* K1-Stämme waren in denselben MLST-Gruppen zu finden (Abb. 5-3).

Die richtige Zuordnung von ST zu den aufgestellten MLST-Gruppen wurde zum Einen durch das Wiederfinden aller ST eines ST-Komplexes in identischen Gruppen unterstrichen. Zum Anderen konnten die Gruppen mit der unabhängigen statistischen Methode der Hauptkomponenten-Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die *E. coli* K1 MLST-Gruppen wurden später mit den Gruppen des Prophagen CUS-3 (s. 5.1.3.1.) verglichen, um deren evolutionäre Beziehung abzuschätzen (s. 5.1.3.2.).





**Abbildung 5-3:** NeighborNet-Analyse der *E. coli* K1-Sequenztypen (*SplitsTree* v4.10). Konkatenierte MLST-Sequenzen der 39 verschiedenen ST, die in den 183 gesammelten K1-Isolaten gefunden wurden, wurden analysiert. Splits mit *Bootstrap*-Werten von  $>70\%$  wurden für die Definition von fünf MLST-Gruppen herangezogen. Charakteristika der einzelnen Gruppen sind den eingefügten Tabellen zu entnehmen. In fett markierten, unterstrichenen ST wurde mindestens ein *neuO*-positives Isolat detektiert (s. 5.1.2.1.). Rot eingefärbt sind die STC mit den jeweiligen zugehörigen ST.

### 5.1.2. NeuO-Populationsbiologie

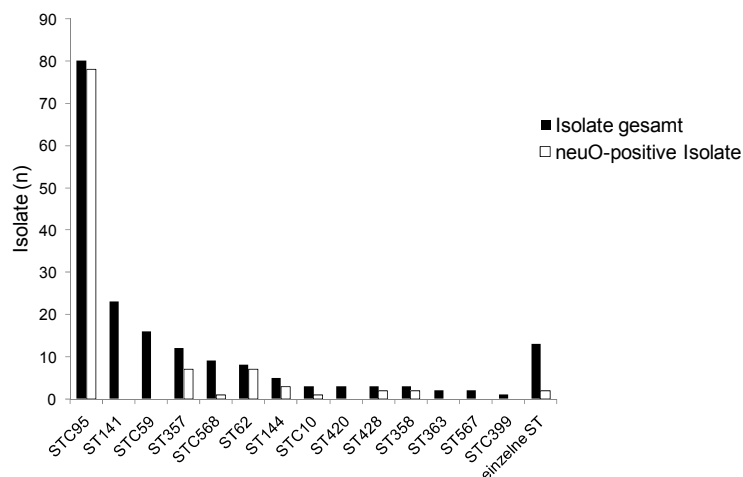
#### 5.1.2.1. Verteilung von *neuO* in der *E. coli* K1-Population

Das O-Acetyltransferasegen *neuO* wird von dem *E. coli* K1 spezifischen, lysogenen Prophagen CUS-3 codiert, der in den *dsdC/argW*-Lokus des bakterielle Genoms integriert ist (Deszo *et al.*, 2005, Stummeyer *et al.*, 2006). Untersuchungen zu *neuO* werden in den folgenden Abschnitten gezeigt.

Die Verteilung von *neuO* in den 183 *E. coli* K1-Isolaten der präsentierten, MLST-typisierten Stammsammlung wurde sowohl mittels *neuO*-spezifischer PCR (umfasst das gesamte Gen, ca. 1,2 kb) als auch mittels *neuO*-spezifischer DNA-Hybridisierung (umfasst ca. 600 bp des Gens) untersucht. Von den 183 *E. coli* K1-Isolaten waren 103 (56%) sowohl in der *neuO*-spezifischen PCR, als auch in der *neuO*-spezifischen Hybridisierung positiv. Für ein humanes fäkales ST62-Isolat (KK3/2) war zwar die *neuO*-Hybridisierung positiv, aber nicht die PCR für das gesamte Gen, da das Insertionselement (IS) 629 das Gen unterbrach. *NeuO* war unter

den verschiedenen ST nicht zufällig verteilt. Der Großteil der 103 *neuO*-positiven Isolate gehörte zum STC95 (n=78, 76%). Insgesamt 78 der 80 STC95-Stämme (98%) enthielten das Gen. Dagegen wurde lediglich in 25 der 103 nicht-STC95-Isolate (24%) das Gen detektiert. Die 25 *neuO*-positiven nicht-STC95-Stämme waren zufällig unter den übrigen ST verteilt. Die Assoziation von *neuO* mit dem STC95 ist statistisch signifikant ( $p < 5 \times 10^{-7}$ ; Fisher's Exact Test, 2-seitig). In einigen MLST-Linien wurde das Gen gar nicht gefunden: Alle Stämme des STC59 und des ST141 waren bspw. *neuO*-negativ (Tab. 5-3 und Abb. 5-4).

*NeuO*-positive Stämme wurden hauptsächlich in der MLST-Gruppe 1 gefunden, was nicht verwundert, da dieser Gruppe alle STC95-Isolate angehörten (s. 5.1.1.2.). *NeuO*-positive Isolate waren seltener in den anderen vier MLST-Gruppen vertreten, trotzdem konnte aber mindestens ein *neuO*-positives Isolat in jeder Gruppe identifiziert werden (Abb. 5-3).

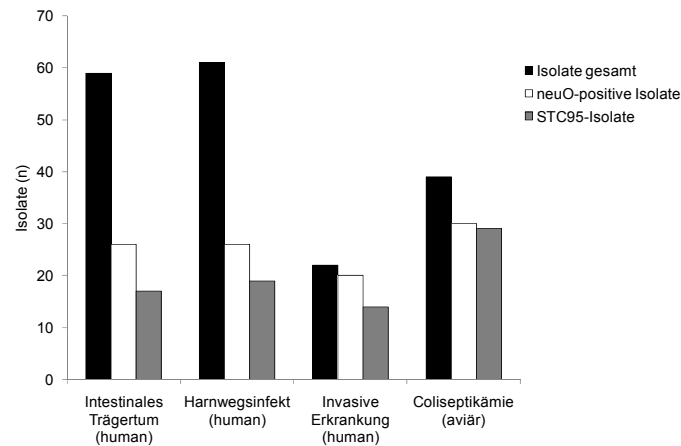


**Abbildung 5-4:** Vorkommen von *neuO* bei den verschiedenen Sequenztypen und Sequenztyp-Komplexen der *E. coli* K1-Stammsammlung.

Von den Isolaten aus humanem intestinalen Trägertum (n=59) und aus humanen HWI (n=61) enthielten je 26 *neuO* (43.3% bzw. 42.6%). Dagegen waren nahezu alle Isolate aus invasiven Erkrankungen *neuO*-positiv (20 von 22; 91%). Ob das Gen aber tatsächlich mit invasiven Erkrankungen assoziiert ist, ist schwer abzuschätzen, da der STC95, für den der Besitz von *neuO* charakteristisch ist, ebenfalls häufig aus invasiven Erkrankungen isoliert wurde (70%). Auch bei Isolaten aus intestinale Trägertum und HWI entspricht die Präsenz von *neuO* etwa der des STC95 (Abb. 5-5).

Die signifikante Assoziation von *neuO* mit STC95-Isolaten humanen Ursprungs führte zu der Frage, ob diese Kopplung auch für *E. coli* K1-Stämme aviären Ursprungs zutrifft. Daher wurden gezielt STC95-Isolate aus aviärer Coliseptikämie auf das Vorhandensein von *neuO* untersucht. Auch in diesen Stämmen war das Gen mit dem STC95 assoziiert (Abb. 5-5). In

den zehn untersuchten aviären nicht-STC95-Isolaten waren nur zwei Isolate *neuO*-positiv (20%), was in etwa der Rate *neuO*-positiver Stämme bei humanen nicht-STC95-Isolaten entspricht (25%).



**Abbildung 5-5:** *NeuO*- und ST95-Komplex-Verteilung in humanen und aviären *E. coli* K1-Isolaten. Der *neuO*-positive Appendizitis-Stamm wurde nicht berücksichtigt.

Die Assoziation von *neuO* mit dem K1-Phänotyp wurde bereits auf die K1-Spezifität von CUS-3 zurückgeführt (King *et al.*, 2007b). Um zu belegen, dass *neuO* ausschließlich in K1-positiven *E. coli*-Isolaten vorlag, wurde die Präsenz des Gens in 100 K1-negativen *E. coli* (MAC)-Stämmen untersucht. Mit der *neuO*-spezifischen DNA-Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, dass keiner der untersuchten K1-negativen Stämme das Gen besaß (Daten nicht gezeigt).

#### 5.1.2.2. Charakterisierung von *neuO*

Mittels *neuO*-spezifischer PCR und anschließender DNA-Sequenzierung wurden von allen 103 *neuO*-positiven *E. coli* K1-Isolaten die Allelvariante des Gens sowie die Anzahl der 5'-*Heptanucleotide-Repeats* in dem Gen bestimmt.

##### 5.1.2.2.1. Allelvarianten von *neuO*

Durch die *neuO*-Sequenzierung aller *neuO*-positiven Stämme konnten fünf verschiedene Allelvarianten des Gens identifiziert werden (die variable Anzahl der 5'-*Heptanucleotide-Repeats* am 5'-Ende von *neuO* wurde hierbei nicht berücksichtigt), die als *neuO*-1 (n=64), *neuO*-2 (n=2), *neuO*-3 (n=28), *neuO*-4 (n=3) und *neuO*-5 (n=6) bezeichnet wurden (*neuO*-Sequenzen sind in der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank unter Acc. Nr. FM863923-FM863927 hinterlegt). Insgesamt wurden sieben polymorphe Stellen in *neuO* detektiert, von denen drei nicht-synonym waren. Um zu analysieren, ob die resultierenden

Aminosäureaustausche in NeuO einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms besitzen, wurden Donor-Substrat-Kinetiken durchgeführt. Die Aktivität von NeuO-2 bzw. NeuO-5 wurde aber nicht untersucht, da ihre Aminosäuresequenzen der Aminosäuresequenz der Allelvarianten NeuO-3 bzw. NeuO-4 entspricht (Abb. 5-6). Die Kinetiken wurden im Rahmen einer Kooperation von Frau Dr. rer. nat. Anne K. Bergfeld (MHH) erstellt und für die vorliegende Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Keiner der Aminosäureaustausche in NeuO-1, NeuO-3 oder NeuO-4 beeinträchtigte die Funktion des Enzyms (Abb. 5-6).

	Nukleotidposition							Aminosäureposition			$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )**	
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3		
	5*	3*	7	7*	9	9	7	2	5	3		
<i>neuO-1</i>	T	G	G	G	T	A	G	NeuO-1	L	V	V	1.86±0.02
<i>neuO-2</i>	C*	G	G	A*	T	G	G	NeuO-2	S	V	I	n. b.
<i>neuO-3</i>	C*	G	A	A*	T	G	G	NeuO-3	S	V	I	1.88±0.03
<i>neuO-4</i>	C*	A*	G	A*	G	G	G	NeuO-4	S	I	I	1.90±0.06
<i>neuO-5</i>	C*	A*	G	A*	G	G	A	NeuO-5	S	I	I	n. b.

**Abbildung 5-6:** Nukleotidpolymorphismen in *neuO*. Positionen sind vertikal angeordnet. Die *Heptanucleotide-Repeats* am 5'-Ende des Gens wurden ignoriert. Von *neuO-1/NeuO-1* abweichende Nukleotide bzw. Aminosäuren sind fett gedruckt. Nicht-synonyme Mutationen sind mit \* gekennzeichnet. *NeuO-1* ist das Referenzallel aus dem CUS-3-positiven Stamm RS218 (Acc. Nr.: CP000711). \*\*Der kinetische Parameter  $k_{cat}$  (Wechselzahl bzw. Umsatzrate), ein Maß für die Effizienz eines Enzyms, wurde für NeuO-1, NeuO-3 und NeuO-4 in einem spektrophotometrischem Test bei pH=7,5 und 25° C von Frau Dr. Anne K. Bergfeld (MHH) ermittelt. Donor-Substrat-Kinetiken wurden mit 0,025 mM Acetyl-CoA und 2 mg/ml Sialinsäure erstellt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von je 885 ng aufgereinigter Enzymvariante gestartet, und  $k_{cat}$  wurde auf Basis von Anfangsgeschwindigkeitsmessungen bestimmt. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmungen +/- Standardabweichung sind angegeben. N.b., nicht bestimmt.

#### 5.1.2.2.2. 5'-Heptanucleotide-Repeats von *neuO*

Die *E. coli* K1-Kapsel kann phasenvariabel (Frequenz 1:50 bis 1:20) O-acetyliert werden (Orskov *et al.*, 1979). Dies lässt sich auf *Heptanucleotide-Repeats* (5'-AAGACTC-3') am 5'-Ende des Gens zurückführen, die die Expression von *neuO* bestimmen: Nur wenn die Anzahl der *Repeats* durch drei teilbar ist, wird enzymatisch aktives Protein gebildet und die K1-Kapsel O-acetyliert [(*on*-Phase) (Deszo *et al.*, 2005)]. Die Betrachtung der *Repeat*-Anzahl war von Bedeutung, da bereits gezeigt werden konnte, dass mit ihrer Zunahme die katalytische Effizienz von NeuO steigt (Bergfeld *et al.*, 2007).

Entsprechend der Sequenzanalyse besaßen 23% der 103 *neuO*-positiven Stämme das Gen in der *on*-Phase, und bei 77% der Isolate befand sich das Gen in der *off*-Phase [(*Repeats* nicht durch drei teilbar) (Tab. 5-4)]. In allen Erkrankungsisolaten aviären und humanen Ursprungs

lag der Anteil von *neuO* in der *on*-Phase bei mindestens 23%. In Isolaten aus humanem asymptomatischen Trägertum betrug diese Quote dagegen nur 12% (Tab. 5-4). Dieser Unterschied war statistisch aber nicht signifikant ( $p > 0.05$ ; Fisher's Exact Test, 2-seitig).

Tabelle 5-4: *NeuO*-Phasenvariation in Bezug auf die Herkunft der *E. coli* K1-Isolate.

	<b>Aviäre Coliseptikämie</b>	<b>Humanes Trägertum</b>	<b>Humane HWI*</b>	<b>Humane IE**</b>	<b>Gesamt</b>
<b><i>neuO on</i> (n)</b>	7	3	9	5	24
<b><i>neuO off</i> (n)</b>	23	23	17	15	79***
<b>Prozent <i>neuO on</i> (%)</b>	23	12	35	25	23***
<b>Median Repeat-Anzahl</b>	25	23,5	23,5	19	22***

\*HWI: Harnwegsinfekt. \*\*IE: Invasive Erkrankung. \*\*\*Das *neuO*-positive Appendizitis-Isolat (*neuO* in der *off*-Phase) ist nicht explizit aufgeführt, aber in die Gesamtberechnung mit einbezogen worden.

Die Anzahl der *Repeats* in den 103 *neuO*-positiven *E. coli* K1-Isolaten variierte zwischen 2 und 93 mit einem Median von 22. Insgesamt 93 Stämme (90%) besaßen 5 bis 47 *Repeats* (Abb. 5-7). Der Median der *Repeat*-Anzahl war ähnlich bei Isolaten aus den unterschiedlichen klinischen Bedingungen (Tab. 5-4), sowie zwischen Isolaten mit unterschiedlichen ST (Daten nicht gezeigt), so dass keine Assoziation zwischen dem Median der *Repeat*-Anzahl von *neuO* und der klinischen Bedingung oder phylogenetischen Gruppe der Isolate detektierbar war.

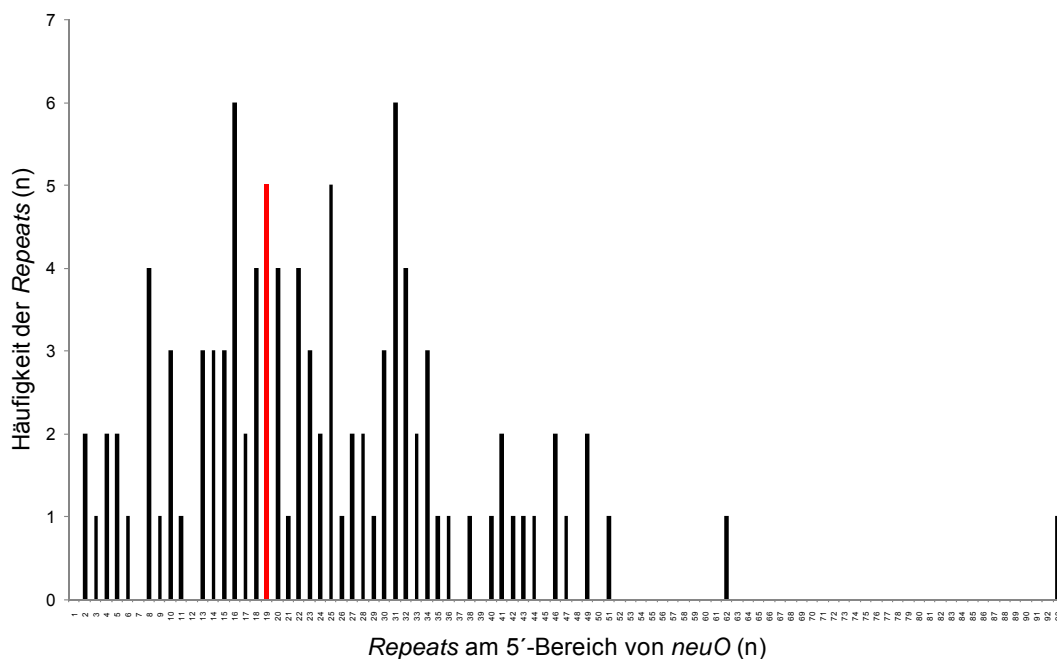


Abbildung 5-7: Häufigkeiten der Heptanucleotide-Repeat-Anzahlen in *neuO* in der *E. coli* K1-Stammsammlung. Die *Repeat*-Anzahlen in *neuO* wurden durch DNA-Sequenzierung bestimmt und gegen ihre Häufigkeit in den *neuO*-positiven Isolaten aufgetragen. Der Median ist rot dargestellt.

### 5.1.3. Evolutionäre Beziehung zwischen *E. coli* K1 und CUS-3

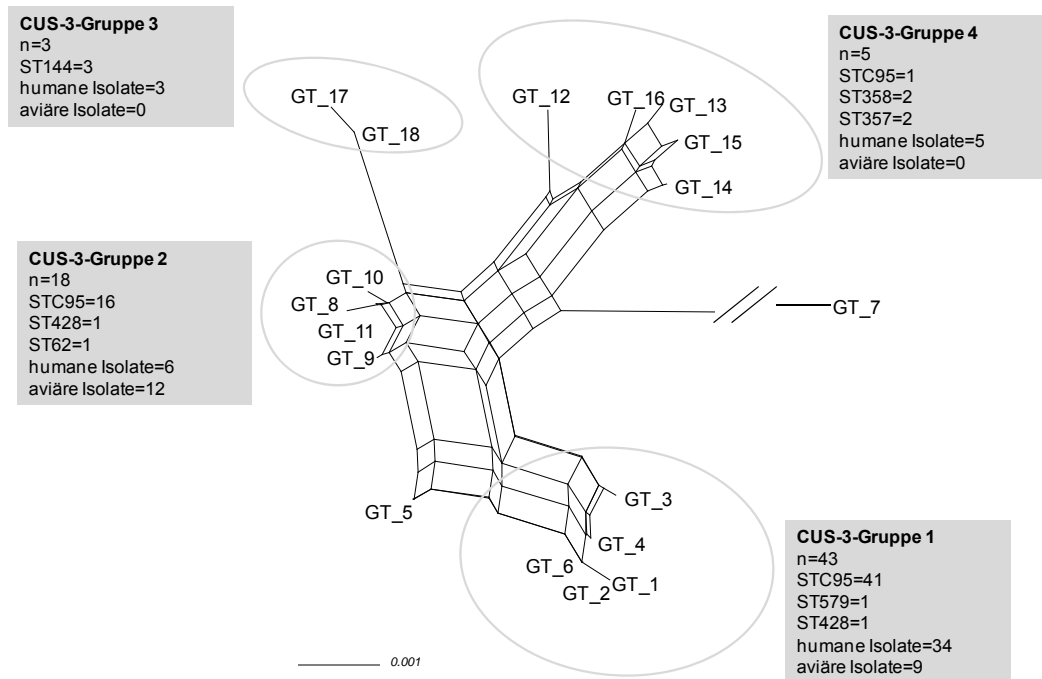
#### 5.1.3.1. Genotypisierung von CUS-3

Zur Analyse der Assoziation von *E. coli* K1 mit CUS-3 wurde eine Sequenztypisierung des Prophagen etabliert. Neben *neuO* (648 bp) wurden das CUS-3 ORF22 (kleine Untereinheit der Phagen-Terminase; 438 bp) sowie zwei Fragmente der CUS-3 Endosialidase *siaK1* (*siaK1\_1*: 492 bp und *siaK1\_2*: 491 bp) sequenziert (insgesamt: 2019 bp). Die beschriebenen Gene wurden für die CUS-3-Genotypisierung ausgesucht, da sie als CUS-3-spezifisch angesehen werden können und Rekombinationen mit Genabschnitten anderer Phagen weitestgehend auszuschließen sind. *NeuO* und ORF22 wurden bisher nur in CUS-3, nicht aber in anderen Phagen identifiziert. Endosialidasen kommen zwar in weiteren K1-spezifischen Phagen vor, haben aber auf DNA-Sequenzebene nur entfernt Ähnlichkeit mit der CUS-3 *siaK1*.

Die ORF22- und *siaK1*-PCR wurde für alle 103 *neuO*-positiven Isolate (s. 5.1.2.1.) durchgeführt. ORF22 wurde in 78 Isolaten (76%) detektiert. In 96 von 103 (97%) *neuO*-positiven Isolaten konnten *siaK1\_1* und *siaK1\_2* sequenziert werden, in vier Isolaten wurde das IS629 in *siaK1\_1* und/oder *siaK1\_2* gefunden, und drei Isolate waren in der *siaK1*-PCR negativ. Insgesamt fünf *neuO*- (s. 5.1.2.2.1.), sechs ORF22-, sieben *siaK1\_1*- und 15 *siaK1\_2*-Allele konnten identifiziert werden. Von den 103 *neuO*-positiven Stämmen wurden 73 einem von insgesamt 18 CUS-3-Genotypen (CUS-3\_GT) zugeordnet (Abb. 5-8 und Tab. 8-3). Die restlichen 30 Isolate waren ORF22- und/oder *siaK1*-negativ bzw. *siaK1* war durch das IS629 unterbrochen. Der häufigste CUS-3\_GT war CUS-3\_GT2 (n=39), gefolgt von CUS-3\_GT10 (n=10) und CUS-3\_GT8 (n=6). Der Großteil (n=13) der restlichen 15 CUS-3\_GT wurde nur in jeweils einem Stamm identifiziert. STC95-Isolate besaßen hauptsächlich CUS-3\_GT2 (n=38), CUS-3\_GT10 (n=10) oder CUS-3\_GT8 [(n=5) (Tab. 5-3)]. 13 der 25 *neuO*-positiven nicht-STC95-Isolate (52%), aber nur 17 der 78 *neuO*-positiven STC95-Stämme (22%) konnte kein CUS-3\_GT zugewiesen werden; in diesen Stämmen fehlte ORF22 und/oder *siaK1*, bzw. *siaK1* enthielt ein IS629.

Mit Hilfe des Programmes Konkat-Meister sowie der *NeighborNet*-Funktion in *SplitsTree* v4.10 wurden, analog zu der Vorgehensweise für die Bildung der MLST-Gruppen (s. 5.1.1.2.), CUS-3-Gruppen aus den konkatenierten Sequenzen der 18 CUS-3\_GT erstellt. Insgesamt wurden vier CUS-3-Gruppen identifiziert (*Bootstrap*-Wert > 70%): CUS-3-Gruppe 1 mit 43, CUS-3-Gruppe 2 mit 18, CUS-3-Gruppe 3 mit 3 und CUS-3-Gruppe 4 mit 5 Isolaten (Abb. 5-8). Die CUS-3\_GT5 (n=3) und CUS-3\_GT7 (n=1) konnten keiner Phagengruppe eindeutig zugeordnet werden. Nur insgesamt vier Isolate der CUS-3-Gruppen 1

und 2 gehörten nicht zum STC95, und nur ein STC95-Isolat wurde in den CUS-3-Gruppen 3 oder 4 identifiziert. Aviäre und humane *E. coli* K1-Isolate besaßen gleiche CUS-3\_GT und wurden in identischen CUS-3-Gruppen detektiert (Abb. 5-8). Die CUS-3-Gruppen konnten mit der Hauptkomponenten-Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5-8:** NeighborNet-Analyse der CUS-3-Genotypen (*SplitsTree* v4.10). Die Abbildung basiert auf den konkatenierten Sequenzen der 18 CUS-3\_GT. Splits mit *Bootstrap*-Werten von >70% (in 1000 Wiederholungen) ermöglichten die Definition von vier CUS-3-Gruppen. Charakteristika der einzelnen Gruppen sind den eingefügten Tabellen zu entnehmen.

### 5.1.3.2. Assoziation von MLST- mit CUS-3-Gruppen

Die evolutionäre Beziehung zwischen *E. coli* K1 und CUS-3 ist weitgehend unbekannt. Auf der Basis der MLST- und der CUS-3-Genotypisierungsdaten wurden Gruppen mit phylogenetisch ähnlichen Isolaten erstellt. Die Verteilung der CUS-3-Gruppen innerhalb der MLST-Gruppen wurde analysiert, um das Verhältnis zwischen dem Wirtsbakterium und seinem Prophagen abzuschätzen. In Tabelle 5-5 ist gezeigt, welche MLST-Gruppen und CUS-3-Gruppen miteinander assoziiert sind. Die MLST-Gruppe 2 konnte in diese Analyse nicht mit einbezogen werden, da im einzigen *neuO*-positiven Stamm dieser Gruppe ( $\delta$ 40, STC568, humanes HWI-Isolat) das ORF22 fehlte und damit kein CUS-3\_GT zuzuordnen war. Von insgesamt 61 Isolaten der CUS-3-Gruppen 1 und 2 gehörten 57 der MLST-Gruppe 1 an. Dagegen war nur eins von acht Isolaten aus den CUS-3-Gruppen 3 und 4 in MLST-Gruppe 1 zu detektieren (Tab. 5-5). Sieben der acht Isolate aus den CUS-3-Gruppen 3 und 4

konnten den MLST-Gruppen 3, 4 oder 5 zugeordnet werden. Mit dem Fisher's Exact Test konnte die Assoziation der MLST-Gruppe 1 mit den CUS-3-Gruppen 1 und 2 bestätigt werden ( $p < 5 \times 10^{-6}$ , 2-seitig). Die CUS-3-Gruppen waren damit entlang der MLST-Gruppen nicht zufällig verteilt; es scheint vielmehr eine Aufspaltung der CUS-3\_GT entsprechend der phylogenetischen Herkunft der *E. coli* K1-Isolate zu geben. *E. coli* K1 und CUS-3 zeigten demzufolge Anzeichen einer Koevolution.

Tabelle 5-5: Assoziation von MLST-Gruppen mit CUS-3-Gruppen.

		CUS-3-Gruppe				n. z.*
		1	2	3	4	
MLST-Gruppe	1	41	16	0	1	20
	2	0	0	0	0	1
	3	0	0	3	2	5
	4	1	1	0	2	0
	5	0	1	0	0	8
n. z.*		1	0	0	0	0

\* n. z., nicht zugeordnet: Isolate konnten keiner MLST- bzw. CUS-3-Gruppe zugeordnet werden.

#### 5.1.4. Chromosomale Lokalisation von *neuO*/CUS-3

Der Prophage CUS-3 ist im Bereich des *dsdC*- (5'-Ende CUS-3)/*argW*-Lokus (3'-Ende CUS-3) in das Genom des *E. coli* K1-Stammes RS218 integriert (Deszo *et al.*, 2005). *NeuO* befindet sich am 3'-Ende des Phagen. Um zu untersuchen, ob *neuO* und damit CUS-3 immer mit dem *argW*-Lokus assoziiert sind, wurde für alle *neuO*-positiven Stämme eine *neuO/argW*-spezifische PCR durchgeführt (Tab. 5-3). Von den insgesamt 103 *neuO*-positiven Stämmen zeigten 94 (91%) das erwartete PCR-Fragment von ca. 2.3 kb. Durch partielle Sequenzierung des PCR-Produktes wurde die Lokalisation von *neuO* am *argW*-Lokus bestätigt. Ein humanes fäkales STC95-Isolat ( $\delta 8$ ) enthielt ein IS629-ähnliches Insertionselement in der Phagenintegrase; ein weiteres humanes, fäkales Isolat (ST357,  $\delta 104$ ) wies ein PCR-Produkt von nur etwa 1,8 kb auf. Durch die Sequenzierung konnte aber in beiden Fällen die Lokalisation von *neuO* am *argW*-Lokus bestätigt werden.

In sechs humanen ST62-Stämmen (ein fäkales Isolat, fünf Isolate aus IE) wurde zwar das vollständige *neuO* detektiert, allerdings konnte in der *neuO/argW*-PCR kein Produkt amplifiziert werden. Um herauszufinden, wie in diesen Isolaten der *argW*-Lokus organisiert ist, wurde der Lokus aus dem Stamm RS176 (ST62, IE-Isolat) kloniert und sequenziert. Folgende Organisation des *argW*-Lokus konnte ermittelt werden:

***dsdC* - *yapH*\_Homolog - IS629 - *neuO* - Phagenintegrase - *argW*.**



Der *dsdC/argW*-Aufbau in RS176 ähnelt dem *dsdC/argW*-Lokus des UPEC-Stammes CFT073 (O6:H1:K2), bei dem ein *yapH*-Homolog zwischen den beiden Loci integriert ist (Welch *et al.*, 2002). Das *yapH*-Homolog in *E. coli* K1-Stamm RS176 war nicht vollständig, sondern wurde von dem IS629 unterbrochen. Dem IS629 folgten ein verkürztes *neuO*, von dem nur 255 bp des 3'-Bereiches vorhanden waren, eine Phagenintegrase, die eine 96%ige Homologie zur CUS-3 Integrase aufwies, und der *argW*-Lokus. Mittels PCR konnte diese Organisation des *argW*-Lokus in den weiteren fünf ST62-Stämmen bestätigt werden. Die Lokalisation der vollständigen *neuO*-Kopie im Genom der untersuchten ST62-Stämme konnte trotz intensiver Bemühungen nicht ermittelt werden.

#### 5.1.5. Analyse der potenziellen CUS-3 Attachment-Site

Stummeyer *et al.* schlugen eine potenzielle CUS-3 *Attachment-Site* (*att-Site*) im *E. coli* K1-Genom vor (Stummeyer *et al.*, 2006), die Teil einer homologen 16 bp *att-Site* des CUS-3- verwandten Coliphagen HK620 ist [(Clark *et al.*, 2001) (Abb. 5-9)]. In CUS-3-negativen Stämmen ist das HK620 *att-Site*-Homolog einmal am *dsdC/argW*-Lokus vorhanden, während es in CUS-3-positiven Stämmen den Phagen an dessen 5'- und 3'-Ende flankiert. In dem NMEC-Stamm RS218, in dem CUS-3 das erste Mal beschrieben wurde (Deszo *et al.*, 2005), ist am 5'-Ende (*dsdC*-Bereich) von CUS-3 in der potenziellen *att-Site* aber ein Cytosinrest deletiert (Abb. 5-9). Die Sequenzierung dieses Bereiches zeigte, dass er in fünf von zwölf untersuchten STC95-Stämmen unserer K1-Stammsammlung das 5'-Ende von CUS-3 unverändert vorlag, während in sieben STC95-Stämmen die beschriebene Deletion des Cytosinrestes nachzuweisen war. Die Basenfolge am 3'-Ende von CUS-3 entsprach in allen zwölf sequenzierten STC95-Isolaten der HK620-Sequenz (Daten nicht gezeigt).

<b>HK620</b>	:	ATGGTGTCCCCTGCAG
<b>RS218 (5')</b>	:	ATGGTGTCCC-TGCAG
<b>RS218 (3')</b>	:	ATGGTGTCCCCTGCAG
<b><i>argW</i></b>	:	ATGGTGTCCCCTGCAG

Abbildung 5-9: *Att-Site* von Coliphage HK620 und Homologe bei CUS-3 (5'- und 3'-Ende) sowie die entsprechende Sequenz im *E. coli* K1 *argW*-Lokus.

Obwohl die oben beschriebene *att-Site* von CUS-3 experimentell noch nicht bestätigt wurde, sollte untersucht werden, ob Sequenzvariationen in der putativen CUS-3 *att-Site* im *E. coli* K1-Genom ein Grund für die differentielle klonale Verteilung des Phagen in der *E. coli* K1-Population sein könnten (s. 5.1.2.1.). Dazu wurde über eine *dsdC/argW*-PCR die *att-Site* in einigen unterschiedlichen CUS-3/*neuO*-negativen Stämmen aus verschiedenen ST analysiert. Alle getesteten CUS-3-negativen Isolate aus STC59 (n=16), ST141 (n=19), ST144 (n=4) und

ST95 (n=2) waren in der *argW/dsdC*-PCR positiv. Die anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass die potenzielle CUS-3 *att-Site* in allen ST unverändert war. Dagegen konnte weder für *neuO*-negative ST80- (n=7) noch für *neuO*-negative ST357-Isolate (n=5) ein PCR-Produkt erhalten werden, was dafür spricht, dass der *argW*-Lokus in diesen Stämmen bereits mit anderen genetischen Elementen besetzt ist. Die Hypothese, dass Basenaustausche in der potenziellen CUS-3 *att-Site* die klonale Verteilung von CUS-3 bedingen, konnte nicht bestätigt werden.

## 5.2. Humane und aviäre *E. coli* K1-Stämme des ST95-Komplexes

Die genotypische Ähnlichkeit zwischen manchen humanen und aviären *E. coli* K1-Stämmen war bereits öfter Thema von Veröffentlichungen und lässt die Vermutung einer engen Verwandtschaft sowie einer Transmission dieser Isolate zwischen Mensch und Tier zu (Ott *et al.*, 1991, Johnson *et al.*, 2008, Ewers *et al.*, 2009). Auch einige humane und aviäre *E. coli* K1-Stämme aus dieser Arbeit konnten weder auf Basis der MLST noch auf Basis der CUS-3-Genotypisierung voneinander unterschieden werden. Insgesamt wurden vier ST/CUS-3\_GT-Kombinationen detektiert, denen sowohl humane als auch aviäre Stämme angehörten (Tabelle 5-6).

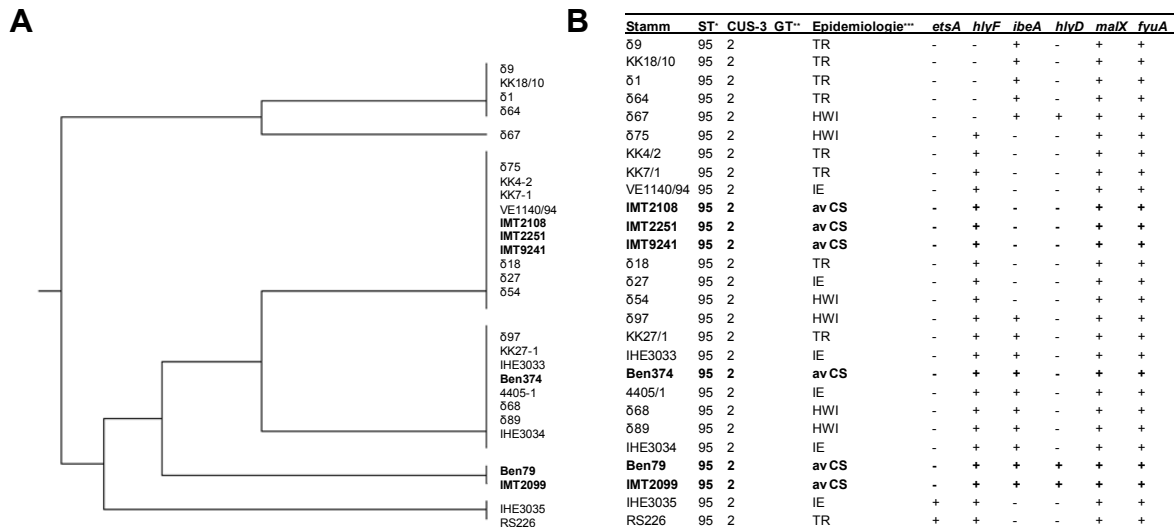
**Tabelle 5-6:** Humane und aviäre *E. coli* K1-Stämme mit gleichen ST und CUS-3\_GT.

	Herkunft <sup>***</sup>			
	humanes Trägertum	humane HWI	humane IE	aviäre Coliseptikämie
ST95 <sup>*</sup> / CUS-3_GT2 <sup>**</sup>	9	6	6	6
ST95 / CUS-3_GT8	2	0	0	3
ST95 / CUS-3_GT10	1	0	0	3
ST140 / CUS-3_GT10	1	0	0	4

<sup>\*</sup>ST: Sequenztyp. <sup>\*\*</sup>CUS-3\_GT: CUS-3-Genotyp. <sup>\*\*\*</sup>HWI: Harnwegsinfekt; IE: invasive Erkrankung.

Um zu analysieren, ob die mit der Sequenzierung nicht unterscheidbaren Stämme anhand ihres Gengehalts diskriminiert werden könnten, wurden die 27 Isolate der Subpopulation „ST95/CUS-3\_GT2“ (Tab. 5-6) auf das Vorhandensein verschiedener Gene mittels DNA-Hybridisierung untersucht. Bei den ausgewählten Genen handelte es sich um die ExPEC Plasmid-assoziierten Virulenzgene *etsA* und *hlyF* sowie um die ExPEC Chromosom-assoziierten Virulenzgene *ibeA*, *hlyD*, *malX* und *fyuA* (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005b, Johnson *et al.*, 2006b, Johnson *et al.*, 2007). Nicht alle Isolate der ST95/CUS-3\_GT2-Subpopulation waren in ihrem Gengehalt identisch. Dennoch konnte mit Hilfe einer UPGMA-Analyse keine strikte Separierung von humanen bzw. aviären Isolaten ermittelt werden (Abb. 5-10A). Zwei

Gruppen enthielten aviäre und humane Isolate mit denselben Genkombinationen (Abb. 5-10B). Somit ließen sich einige aviäre und humane Stämme mit den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden nicht voneinander unterscheiden.



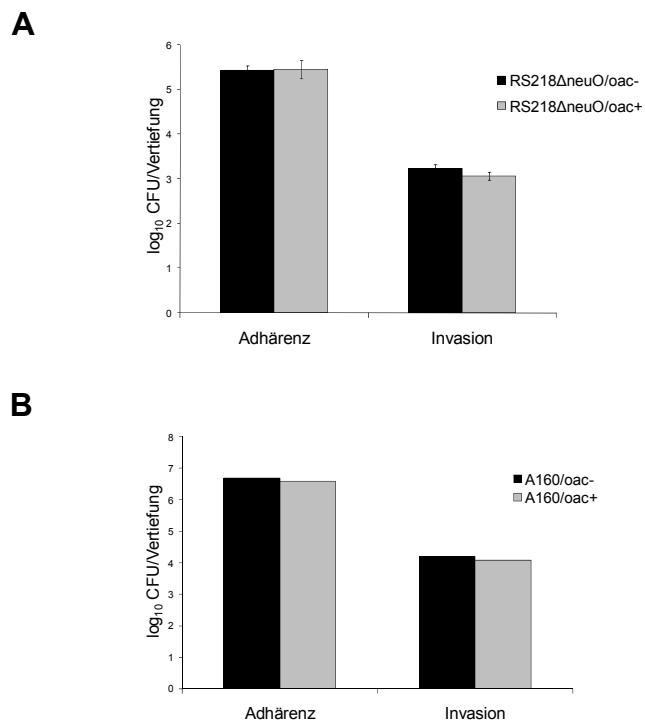
**Abbildung 5-10:** (A) UPGMA-Analyse für die 27 ST95/CUS-3\_GT2 *E. coli* K1-Isolate auf Basis der DNA-Hybridisierungsdaten der sechs untersuchten Gene. (B) Herkunft der Isolate (aviäre Isolate sind fett geschrieben) und Gengehalt. \*ST: Sequenztyp. \*\* CUS-3\_GT: CUS-3-Genotyp. \*\*\*TR: Trägertum; HWI: Harnwegsinfekt; IE: invasive Erkrankung; av CS: aviäre Coliseptikämie. -: Gen abwesend; +: Gen anwesend.

### 5.3. Funktionelle Analysen zur NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung

Die Polysaccharidkapsel von *E. coli* K1 kann phasenvariabel O-acetyliert werden. Für diese Modifikation ist das Enzym NeuO verantwortlich. Die funktionelle Relevanz der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung für das Bakterium im Infektionsgeschehen oder in der unbelebten Umwelt ist bisher größtenteils unverstanden. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden verschiedene *E. coli* K1-Wildtyp Variantenpaare sowie isogene Mutantenpaare miteinander verglichen, die sich in der K1-Kapsel O-Acetylierung voneinander unterschieden (Details zu den eingesetzten Stämmen s. Tab. 4-1 und 8-2). Für die Herstellung isogener Mutantenpaare wurden *neuO*-negative *E. coli* K1-Stämme oder *E. coli* K1 *neuO*-knock out ( $\Delta neuO$ )-Stämme, in denen das Gen gegen eine CAT-Kassette ausgetauscht worden war, entweder mit dem Plasmid p4A oder dem Plasmid p4A:H119A komplementiert. P4A kodiert ein konstitutiv aktives NeuO, das die K1-Kapsel O-acetyliert (*oac*<sup>+</sup>); p4A:H119A kodiert ein mutiertes NeuO, in dem das für die Enzymfunktion essentielle Histidin-119 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (Bergfeld *et al.*, 2007), und das die K1-Kapsel nicht O-acetyliert (*oac*<sup>-</sup>). Die Mutanten wurden eingesetzt, um eine phasenvariable *neuO*-Expression auszuschließen.

### 5.3.1. Rolle der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung in Infektionsversuchen mit humanen Gehirndothelzellen

Es wurde untersucht, ob die *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung die Adhärenz oder Invasion an HBMEC beeinflusst. In diese Versuche wurde zum Einen der CUS-3-positive NMEC-Stamm RS218 (ST95) eingesetzt, in dem das endogene *neuO* ausgeschaltet wurde. Der resultierende Stamm RS218 $\Delta$ *neuO* wurde mit p4A:H119A oder p4A komplementiert. Zum Anderen wurde der UPEC-Stamm A160 (ST141) in die Zellkulturversuche eingesetzt. Dieses CUS-3- und *neuO*-negative *E. coli* K1-Isolat wurde ebenfalls mit p4A:H119A bzw. p4A komplementiert. HBMEC wurden für 240 min mit einer MOI von etwa 40 mit dem RS218- bzw. von etwa 600 mit dem A160-Mutantenpaar infiziert. Anschließend wurden Adhärenz und Invasion der Bakterien bestimmt. Die O-Acetylierung war für beide Stämme ohne Bedeutung für Adhärenz oder Invasion an bzw. in die HBMEC (Abb. 5-11).



**Abbildung 5-11:** Infektion von HBMEC. Adhärenz und Invasion der Mutantenpaare (A) RS218 $\Delta$ *neuO*/*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und RS218 $\Delta$ *neuO*/*oac*<sup>+</sup> (p4A) bzw. (B) A160/*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und A160/*oac*<sup>+</sup> (p4A) an bzw. in HBMEC wurden bestimmt.  $1 \times 10^5$  HBMEC-Zellen wurden dafür mit einer MOI von etwa (A) 40 bzw. (B) 600 für 240 min infiziert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte als  $\log_{10}$  der CFU pro Vertiefung von (A) drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmungen +/- Standardabweichungen bzw. von (B) zwei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmungen.

Es wurden weitere HBMEC-Infektionsversuche mit dem A160-Stammpaar zur Bestimmung der bakteriellen Invasion durchgeführt, bei denen die Infektion für 90 min mit einer MOI von

1000 bzw. für 24 h und 48 h mit einer MOI von 10 durchgeführt wurde. Die Invasion der nicht-O-acetylierten war gegenüber der Invasion der O-acetylierten A160-Mutante in keiner der getesteten Bedingungen unterschiedlich. Die Adhärenz bzw. die Invasion von *E. coli* K1 an bzw. in HBMEC-Zellen wurde also unter keiner der getesteten Bedingungen durch die K1-Kapsel O-Acetylierung beeinflusst.

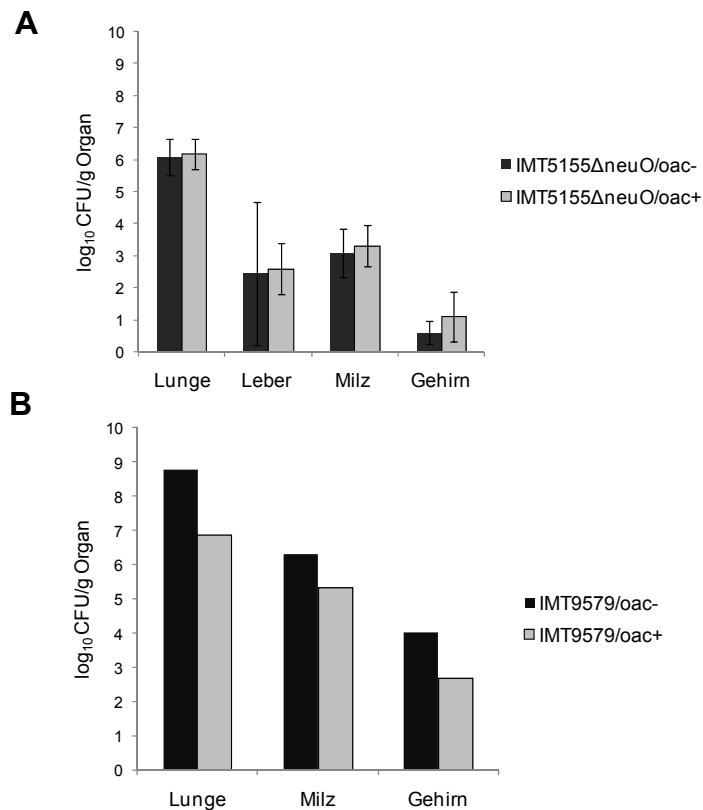
### 5.3.2. Rolle der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung im Tiermodell

Die Bedeutung der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung bei der Infektion und der Darmkolonisierung von 5-Wochen alten *White Leghorn*-Hühnern sollte untersucht werden. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Christa Ewers und Lothar Wieler vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen Berlin durchgeführt.

#### 5.3.2.1. In vivo-Infektionsexperimente mit *White Leghorn*-Hühnern

Nicht-O-acetylierte oder O-acetylierte Mutanten des CUS-3/*neuO*-positiven APEC-Stammes IMT5155 [(O2:K1:H5; ST140, STC95) (Ewers *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2005)] sollten in *in vivo*-Infektionsexperimenten untersucht werden. Dazu wurde zunächst das *neuO*-Gen ausgeknockt. Der resultierende Stamm IMT5155 $\Delta$ *neuO* wurde mit p4A:H119A oder p4A komplementiert. Je sechs *White Leghorn*-Hühner wurden intratracheal mit einer CFU von ca.  $6 \times 10^9$  IMT5155 $\Delta$ *neuO*/p4A:H119A bzw. p4A infiziert. Nach 24 h wurden die Tiere getötet, um die Keimzahlen in Lunge, Leber, Milz und Gehirn zu bestimmen. Die Untersuchung der Keimlast in den Organen zeigte keine Unterschiede zwischen den nicht-O-acetylierten und den O-acetylierten Mutanten (Abb. 5-12A). Allerdings waren in allen drei mit den IMT5155 $\Delta$ *neuO*-Varianten durchgeführten Infektionsversuchen erhebliche Unterschiede der Krankheitsausprägung bei einzelnen Tieren zu beobachten. Die Virulenz der IMT5155 $\Delta$ *neuO*-Mutanten erschien zudem attenuiert, was möglicherweise durch die Klonierungsvorgänge bedingt war.

In dem beschriebenen Hühnerinfektionsexperiment wurde neben den IMT5155 $\Delta$ *neuO*-Mutanten auch der APEC K1-Stamm IMT9579 (O1:K1:H7; ST95) getestet. Dieses Isolat ist CUS-3/*neuO*-negativ und wurde mit den Plasmiden p4A:H119A bzw. p4A komplementiert. Pro Mutante wurden vier Tiere mit vergleichbaren CFU (etwa  $3 \times 10^9$ ) intratracheal infiziert. Die Keimlast in den untersuchten Organen Lunge, Milz und Gehirn entsprach in zwei bisher durchgeführten Experimenten mit diesem Stammpaar weitgehend den Erwartungen (persönliche Mitteilung Christa Ewers). In allen untersuchten Organen wurde ein Trend in Richtung einer höheren Keimzahl für die nicht-O-acetylierte IMT9579-Mutante im Vergleich zu der O-acetylierten IMT9579-Mutante beobachtet (Abb. 5-12B).



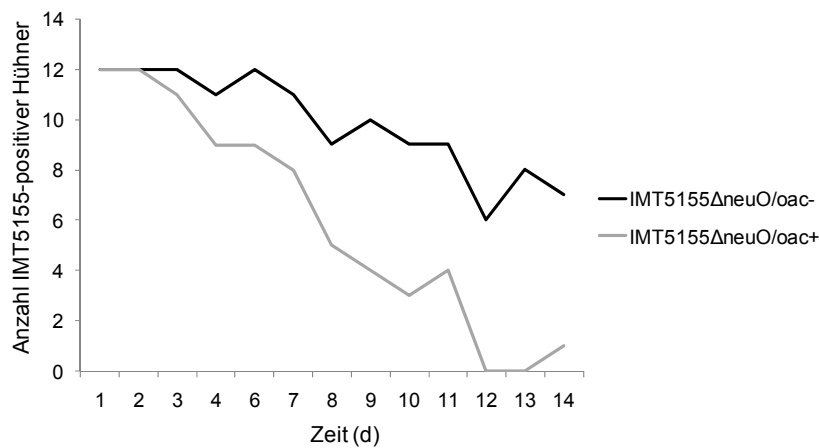
**Abbildung 5-12:** Infektion von *White Leghorn*-Hühnern. (A) Je sechs Hühner wurden mit IMT5155Δ*neuO*/oac<sup>-</sup> (p4A:H119A) und IMT5155Δ*neuO*/oac<sup>+</sup> (p4A) mit einer Infektionsdosis von  $6 \times 10^9$  intratracheal infiziert. (B) Je vier Hühner wurden mit IMT9579/oac<sup>-</sup> (p4A:H119A) und IMT9579/oac<sup>+</sup> (p4A) mit einer Infektionsdosis von  $3 \times 10^9$  intratracheal infiziert. Nach 24 h wurde die Keimzahl in den angegebenen Organen bestimmt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte von (A) drei unabhängigen Experimenten als log<sub>10</sub> der CFU/g Organ +/- Standardabweichungen bzw. von (B) zwei Experimenten als log<sub>10</sub> der CFU/g Organ.

### 5.3.2.2. In vivo-Kolonisierungsexperimente mit White Leghorn-Hühnern

Je zwölf *White Leghorn*-Hühner wurden per Knopfkanüle zweimal im Abstand von 24 h mit  $1 \times 10^{10}$  *E. coli* K1 IMT5155Δ*neuO*/p4A:H119A bzw. IMT5155Δ*neuO*/p4A inokuliert, um die Darmkolonisierung durch die Bakterien zu analysieren. Den Hühnern wurde vor der Inokulation 10%iges Natrium-Bikarbonat appliziert, das den pH-Wert des Magens erhöhen sollte, um den Bakterien die Passage durch den Magen zu erleichtern. Über zwei Wochen wurde die Kloake der Tiere regelmäßig mit einem Baumwolltupfer abgestrichen. Die inokulierten IMT5155Δ*neuO*-Mutanten wurden über ihr Antibiotikaresistenzmuster (Ampicillin und Chloramphenicol) auf Gassner-Platten reisoliert; die Antibiotikazugabe verhinderte das Wachstum der normalen Darmflora. Die Kloakenabstriche wurden zusätzlich ab Tag 3 der Inokulation über Nacht in BHI-Medium angereichert, bevor sie auf den beschriebenen Selektivplatten ausgestrichen wurden. Wenn Wachstum auf den Selektivplatten zu detektieren war, wurden die Tiere als mit der jeweiligen IMT5155Δ*neuO*-

Variante besiedelt angesehen. Die Identität einiger Reisolats wurde mit p4A:H119A- bzw. p4A-spezifischen PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Im Verlauf des Versuches war die Anzahl der Tiere, die die nicht-O-acetylierte IMT5155 $\Delta$ neuO-Mutante in der Kloake enthielten, konstant höher als die Anzahl der Tiere, die die O-acetylierte Mutante ausschieden (Abb. 5-13). Der nicht-O-acetylierte IMT5155 $\Delta$ neuO/p4A:H119A schien also besser den Darm der Hühner zu kolonisieren als der O-acetylierte IMT5155 $\Delta$ neuO/p4A. Das Experiment wurde bisher einmal mit 2 $\times$ 12 Tieren durchgeführt, und bedarf für endgültige Aussagen über die Darmkolonisierung der oben genannten Bakterien mehrerer Wiederholungen.



**Abbildung 5-13:** Kolonisierung von *White Leghorn*-Hühnern mit IMT5155/oac<sup>-</sup> (p4A:H119A) bzw. IMT5155/oac<sup>+</sup> (p4A). Die Anzahl der Tiere, die die inokulierten Varianten in ihrer Kloake enthielten, wurden über zwei Wochen bestimmt. 24 h nach der ersten Inokulation wurde mit den Kloakenabstrichen begonnen (Tag 1). Die Abbildung zeigt Daten eines Einzelexperimentes.

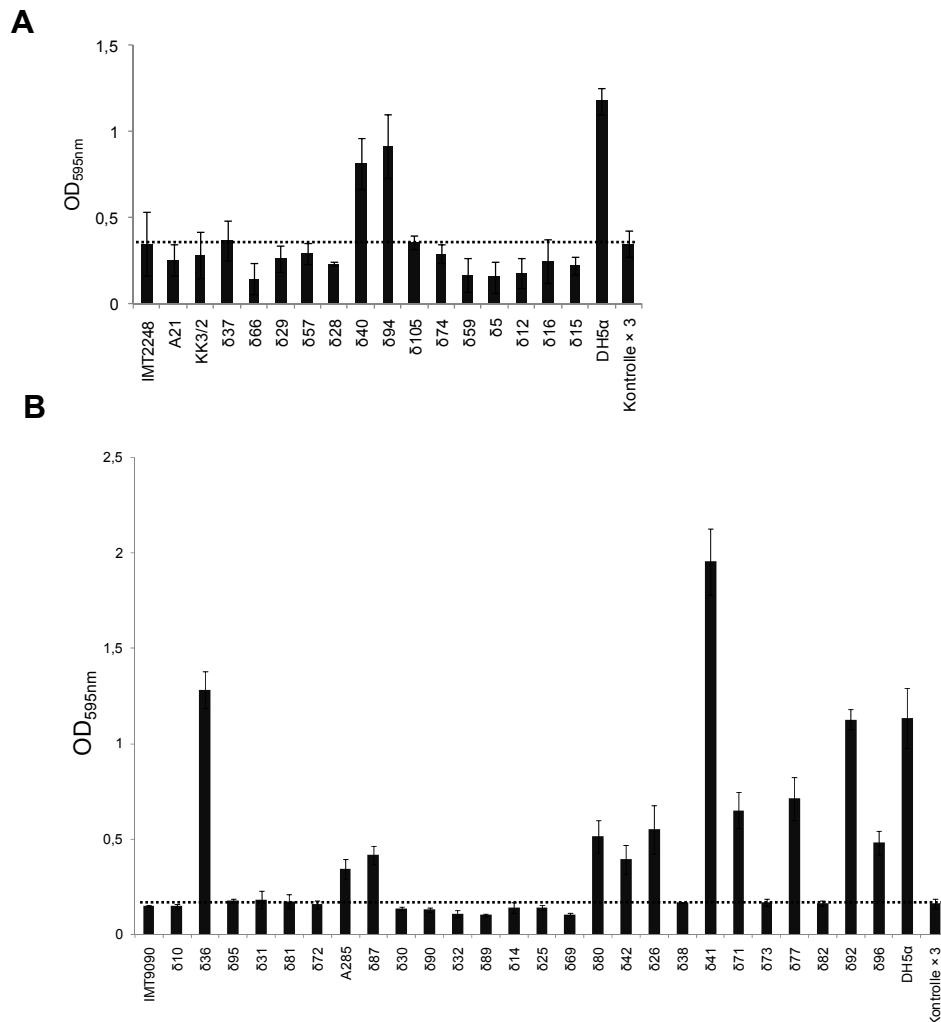
### 5.3.3. Rolle der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung bei der *in vitro*-Biofilmbildung

Der Einfluss der K1-Kapsel O-Acetylierung auf die *in vitro*-Biofilmbildung von *E. coli* K1 wurde mit Hilfe eines statischen Biofilm-Assays untersucht (O'Toole & Kolter, 1998). In diesem Test wird mit Hilfe von Kristallviolett die Menge der an das Substrat (hier: 96-Well-Mikrotiterplatte aus Polystyrol) adhärenierten Bakterien kolorimetrisch quantifiziert.

#### 5.3.3.1. Screening der *E. coli* K1-Stammsammlung auf Biofilm-bildende Isolate

Insgesamt wurden 44 Isolate der *E. coli* K1-Stammsammlung (s. 5.1.1.1.) aus unterschiedlichen klinischen Bedingungen und 20 verschiedenen ST auf ihre Fähigkeit gescreent, Biofilme zu produzieren (Abb. 5-14). In einem ersten Satz an Experimenten konnten unter 17 randomisiert ausgewählten *E. coli* K1-Stämmen zwei Isolate identifiziert werden, die über dem *cut-off* liegende Biofilmmengen bildeten (Abb. 5-14A). Bei beiden

Stämmen handelte es sich um Isolate aus HWI. In einem zweiten Satz an Biofilmexperimenten wurden daher 27 Isolate getestet, die ausschließlich aus HWI stammten. Insgesamt elf dieser Stämme produzierten Biofilme (Abb. 5-14B).



**Abbildung 5-14:** Screening auf Biofilm-bildende *E. coli* K1-Isolate. (A) Biofilmbildung von *E. coli* K1-Isolaten aus humanen Stuhlproben, HWI und IE sowie aus aviärer Coliseptikämie. (B) Biofilmbildung verschiedener *E. coli* K1-Isolate aus HWI. Details zu den einzelnen Isolaten sind Tab. 8-2 zu entnehmen. Stämme wurden als Biofilm-bildend angesehen, wenn der Wert der OD<sub>595nm</sub> mindestens das Dreifache des Wertes der OD<sub>595nm</sub> der Mediumkontrolle betrug [(cut-off, gestrichelte Linie) (Lappann *et al.*, 2006)]. Als Positivkontrolle diente in den Biofilmexperimenten der Biofilm-bildende *E. coli* K12-Stamm DH5α (Wood *et al.*, 2006). Die Grafiken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten als OD<sub>595nm</sub> +/- Standardabweichungen.

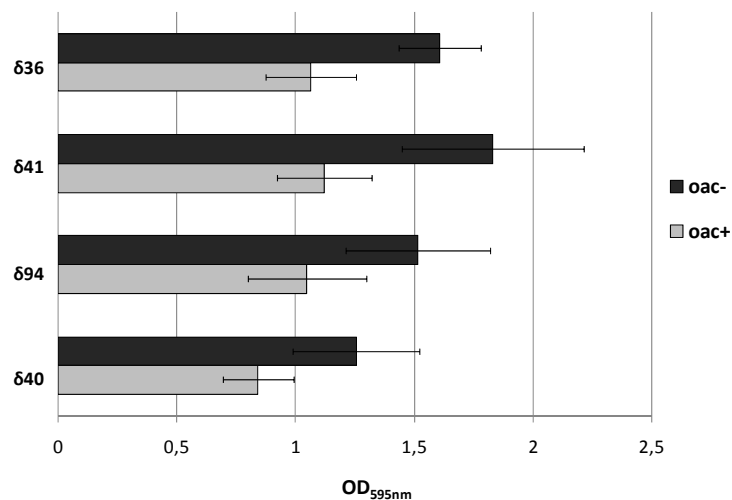
Eine signifikante Biofilmbildung ließ sich in dieser Arbeit also für insgesamt 13 Stämme beobachten, die ausschließlich aus HWI, aber unterschiedlichen ST stammten. Zehn der 13 Biofilm-positiven K1-Isolate waren *neuO*-negativ, ein Stamm besaß *neuO* in der *on*-Phase und zwei Stämme enthielten *neuO* in der *off*-Phase. Keiner der insgesamt sechs getesteten STC95-Stämme produzierte signifikante Biofilmmengen.



### 5.3.3.2. In vitro-Biofilmbildung isogener *E. coli* K1-Stammpaare

Der Einfluss der K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Biofilmbildung von *E. coli* K1 wurde mit ausgewählten Biofilm-bildenden Stämmen untersucht. *NeuO-on* und *off*-Varianten der Biofilm-positiven Stämme  $\delta 40$  (ST80) und  $\delta 94$  [(ST358) (Abb. 5-14A)] wurden mittels mAb58-5 im ELISA detektiert und isoliert. Die *neuO*-negativen, Biofilm-positiven Stämme  $\delta 36$  (ST141) und  $\delta 41$  [(ST59) (Abb. 5-14B)] wurden mit den Plasmiden p4A:H119A bzw. p4A komplementiert. Die nicht-O-acetylierten und O-acetylierten Varianten der vier Stammpaare wurden in Biofilmexperimenten verglichen (Abb. 5-15).

In allen vier getesteten Stammpaaren produzierte die O-acetylierte Variante mindestens 30% weniger Biofilm als die entsprechende nicht-O-acetylierte Variante (Abb. 5-15;  $p < 0.005$ ; Student's T-Test, 2-seitig, gepaart). Dieses Resultat war unabhängig von dem genetischen Hintergrund der Isolate (je ein getestetes Stammpaar gehörte MLST-Gruppe 2, 3, 4 oder 5 an). Es war ebenfalls unabhängig davon, ob *neuO* Plasmid-codiert oder chromosomal in den Stämmen enthalten war.



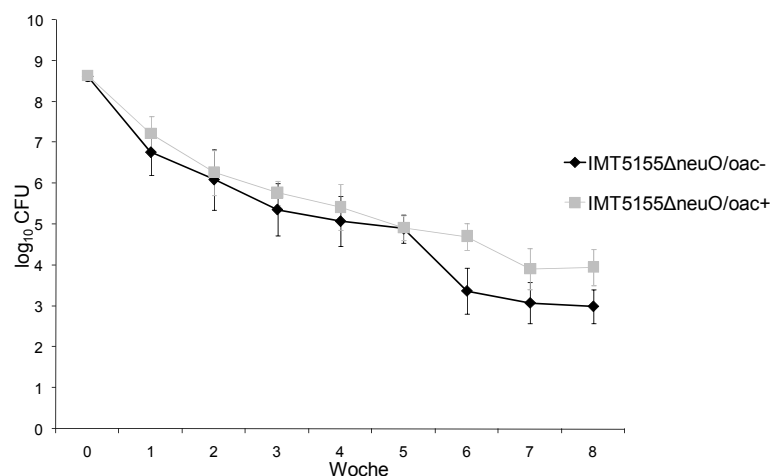
**Abbildung 5-15:** Einfluss der K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Biofilmbildung von *E. coli* K1.  $\delta 36$  und  $\delta 41$  wurden mit p4A:H119A (*oac*<sup>-</sup>) bzw. p4A (*oac*<sup>+</sup>) komplementiert. Phasenvarianten der Stämme  $\delta 40$  und  $\delta 94$  besaßen *neuO* in der *off* (*oac*<sup>-</sup>)- oder *on* (*oac*<sup>+</sup>)-Phase. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der OD<sub>595nm</sub> von fünf unabhängigen Experimenten in Sechsfachbestimmungen +/- Standardabweichungen.

### 5.3.4. Rolle der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung in Austrocknungsversuchen mit Hühnertrockenkot

Der Einfluss der *neuO*-vermittelten K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Resistenz von *E. coli* K1 gegenüber Austrocknung wurde untersucht. Das für die Durchführung der Austrocknungsversuche verwendete Protokoll wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Die

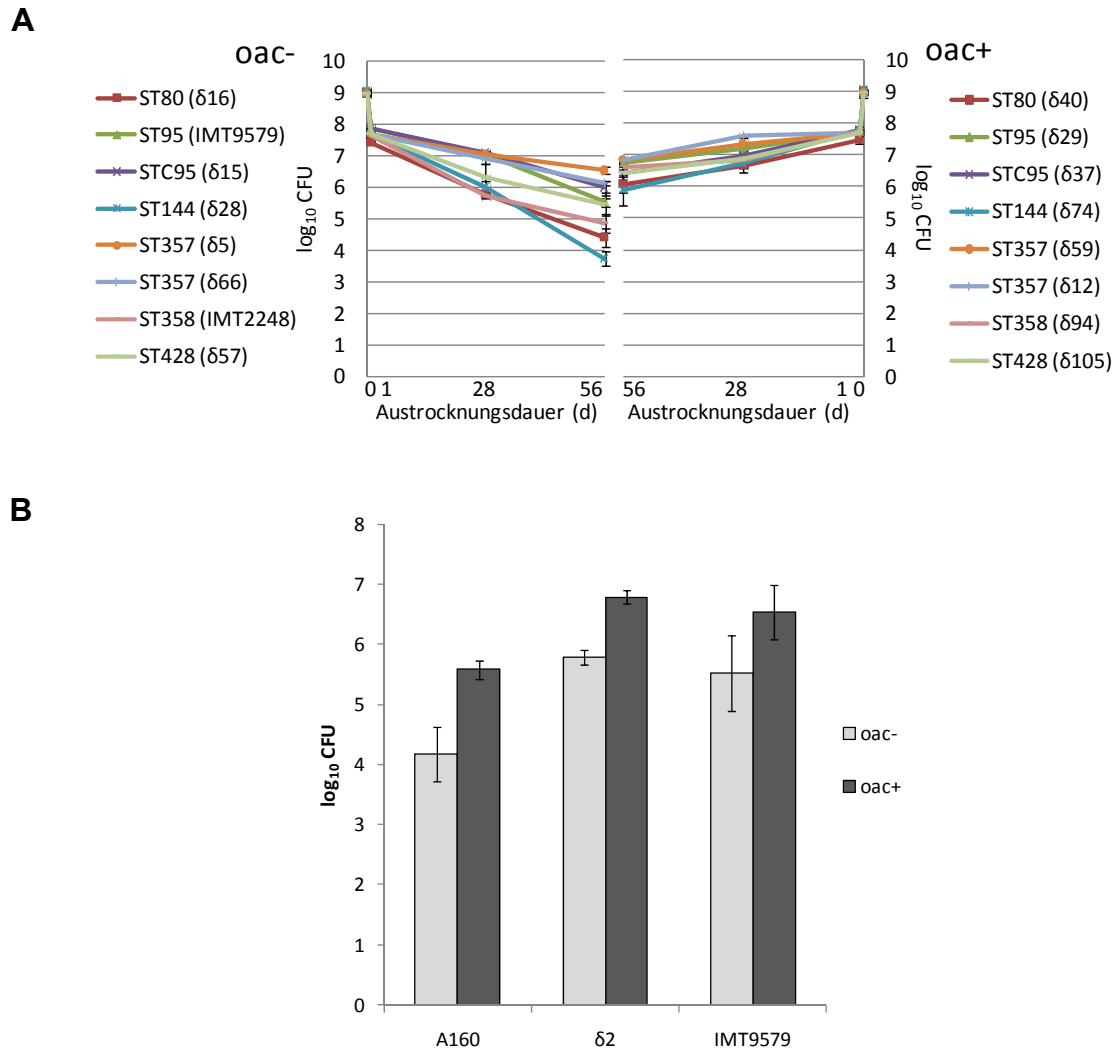
natürliche Ausscheidung der Bakterien in die Umwelt wurde mit kommerziell erhältlichen Hühnertrockenkot [(HTK) (Fa. Anton Knoll GmbH, Deutschland)] imitiert. Die Bakterien wurden in eine HTK-Suspension eingebracht, die Suspension wurde unter der Sicherheitswerkbank ausgetrocknet, und das anschließende Absterben der Bakterien in HTK konnte verfolgt werden.

Zunächst wurde das Überleben der Mutanten *IMT5155 $\Delta$ neuO/p4A:H119A* und *IMT5155 $\Delta$ neuO/p4A* in HTK über einen Zeitraum von acht Wochen verfolgt (Abb. 5-16). Die Einsaat war zwischen beiden Mutanten vergleichbar. Während der ersten fünf Wochen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Überlebensraten zwischen dem nicht-O-acetylierten *IMT5155 $\Delta$ neuO/p4A:H119A* und dem O-acetylierten *IMT5155 $\Delta$ neuO/p4A*. Ab sechs Wochen nach Beginn der Austrocknung wurde jedoch ein moderater, aber statistisch signifikanter Unterschied in den CFU zugunsten des O-acetylierten Stammes beobachtet [( $p < 0.005$ ; Student's T-Test, 2-seitig, gepaart) (Abb. 5-16)]. Zwölf Wochen nach Inokulation der *IMT5155*-Mutanten in den HTK waren weder nicht-O-acetylierte noch O-acetylierte Bakterien detektierbar (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5-16:** Überleben von *IMT5155 $\Delta$ neuO/oac<sup>-</sup>* (p4A:H119A) und *IMT5155 $\Delta$ neuO/oac<sup>+</sup>* (p4A) in HTK. Die Anzahl überlebender Bakterien wurde wöchentlich bestimmt. Die Anzahl der Bakterien zum Zeitpunkt 0 entspricht der Einsaat. Die Grafik zeigt die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmungen als log<sub>10</sub> der CFU +/- Standardabweichungen.

Die Austrocknungsversuche wurden mit weiteren *E. coli* K1-Wildtyp Variantenpaaren und isogenen Mutantenpaaren durchgeführt. Die erhöhte Austrocknungsresistenz O-acetylierter Isolate konnte auch in diesen Ansätzen bestätigt werden (Abb. 5-17A,  $p < 0.05$  für die verschiedenen *E. coli* K1-Isolate mit gleichem ST, Abb. 5-17B,  $p < 0.005$  für die isogenen Mutantenpaare; Student's T-Test, 2-seitig, gepaart).

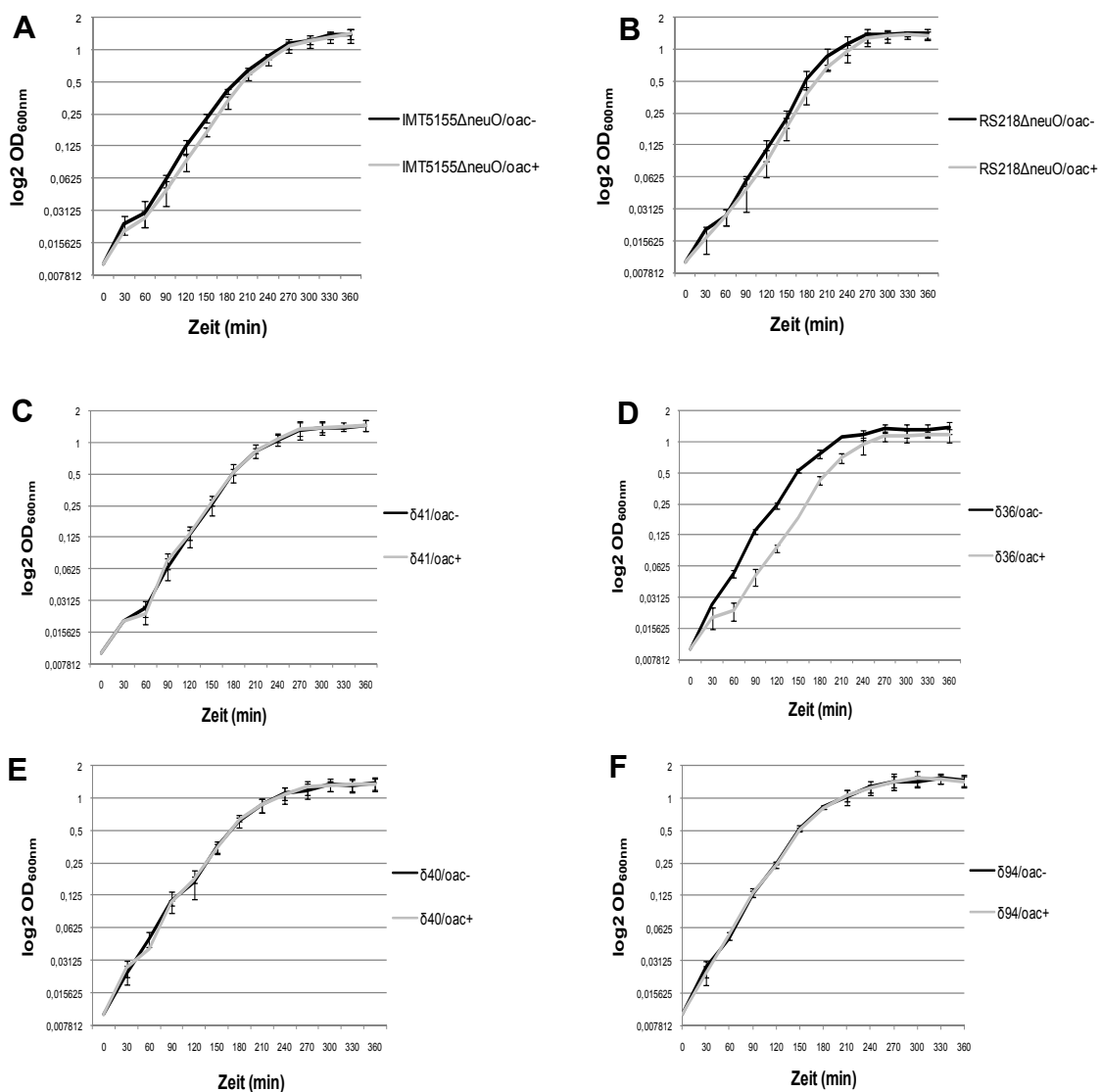


**Abbildung 5-17:** Überleben verschiedener *E. coli* K1-Stämme in HTK. (A) *NeuO*-negative (*oac*<sup>-</sup>) oder *neuO*-positive (*oac*<sup>+</sup>) *E. coli* K1-Isolate mit gleichem ST/STC. Die Anzahl überlebender Bakterien im HTK wurde nach einem, 28 und 56 Tagen bestimmt. Die Anzahl der Bakterien zum Zeitpunkt 0 entspricht der Einsaat. Details zu den eingesetzten Isolaten sind in Tabelle 8-2 enthalten. (B) Isogene *E. coli* K1-Mutantenpaare, mit p4A:H119A (*oac*<sup>-</sup>) bzw. p4A (*oac*<sup>+</sup>) komplementiert, nach acht Wochen in HTK. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte von (A) drei bzw. (B) sechs unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmungen als log<sub>10</sub> der CFU +/- Standardabweichungen.

Die höhere Austrocknungstoleranz von O-acetylierten gegenüber nicht-O-acetylierten *E. coli* K1 ließ sich damit im Vergleich von Stämmen mit unterschiedlichem *neuO*-Gehalt, aber gleichem ST/STC sowie aus isogenen Mutantenpaaren beobachten. Die NeuO-vermittelte K1-Kapsel O-Acetylierung schützt *E. coli* K1 demnach vor letalen Austrocknungseffekten, unabhängig davon, welcher phylogenetischen Gruppe die Bakterien angehörten, und ebenfalls unabhängig davon, ob *neuO* chromosomal oder Plasmid-codiert vorlag.

### 5.3.5. Wachstumskurven für verschiedene nicht-O-acetylierte und O-acetylierte *E. coli* K1-Varianten aus Stammpaaren

Schließlich wurde untersucht, ob die NeuO-Expression bzw. die K1-Kapsel O-Acetylierung einen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* K1 hat. Zwischen den nicht-O-acetylierten *E. coli* K1-Stämmen und den entsprechenden O-acetylierten Varianten konnten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Verdopplungsraten in verdünntem LB-Medium (LB/PBS, 1:5) ermittelt werden (Abb. 5-18A-C, E-F). Lediglich für Stamm  $\delta 36$  war zu Wachstumsbeginn der O-acetylierten Variante im Vergleich zur nicht-O-acetylierten Variante eine leichte Verzögerung zu beobachten; die O-acetylierte Variante wies aber mit der nicht-O-acetylierten Variante vergleichbare Verdopplungsraten auf (Abb. 5-18D).



**Abbildung 5-18:** Wachstumskurven für *E. coli* K1-Stammpaare. (A) IMT5155 $\Delta$ neuO/*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und IMT5155 $\Delta$ neuO/*oac*<sup>+</sup> (p4A), (B) RS218 $\Delta$ neuO/*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und RS218 $\Delta$ neuO/*oac*<sup>+</sup> (p4A), (C)  $\delta 41$ /*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und  $\delta 41$ /*oac*<sup>+</sup> (p4A), (D)  $\delta 36$ /*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und  $\delta 36$ /*oac*<sup>+</sup> (p4A), (E)  $\delta 40$ /*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und  $\delta 40$ /*oac*<sup>+</sup> (p4A), (F)  $\delta 94$ /*oac*<sup>-</sup> (p4A:H119A) und  $\delta 94$ /*oac*<sup>+</sup> (p4A).

und  $\delta 36/oac^+$  (p4A), (E)  $\delta 40/oac^-$  (*neuO-off*) und  $\delta 40/oac^+$  (*neuO-on*) sowie (F)  $\delta 94/oac^-$  (*neuO-off*) und  $\delta 94/oac^+$  (*neuO-on*). Die Grafiken zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmungen als  $\log_2$  der  $OD_{600nm}$  +/- Standardabweichungen.

## 6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau einer *Escherichia coli* K1-Stammsammlung und deren Charakterisierung mittels Multilokus Sequenztypisierung, um die Verteilung des O-Acetyltransferasegens *neuO* in der *E. coli* K1-Population analysieren zu können. Des Weiteren sollte eine CUS-3-Genotypisierung Einblicke in die evolutionäre Beziehung zwischen Bakterium und Prophage bieten. Humane und aviäre *E. coli* K1-Stämme wurden genetisch verglichen. Die funktionelle Relevanz der NeuO-vermittelten K1-Kapsel O-Acetylierung *in vivo* und *ex vivo* sollte zudem untersucht werden.

### 6.1. Verteilung und Charakterisierung von *neuO* und CUS-3 in einer phylogenetisch charakterisierten *E. coli* K1-Stammsammlung

#### 6.1.1. Häufigkeit der *E. coli* K1-Kapsel

*E. coli* K1-Stämme lassen sich nicht nur aus asymptomatischen Trägern, sondern auch aus Menschen mit verschiedenen Erkrankungen isolieren. *E. coli* K1 ist zudem nicht ausschließlich auf den humanen Wirt beschränkt, sondern auch in anderen Spezies zu finden. Für den Aufbau einer neuen *E. coli* K1-Stammsammlung wurden am IHM Würzburg 633 *E. coli*-Isolate aus den Stuhlproben gesunder Freiwilliger, aus dem Urin von an HWI erkrankten Patienten, aus der Blutkultur von bakteriämischen Patienten sowie aus Cervixabstrichen gewonnen und auf die K1-Kapselexpression hin untersucht. Insgesamt bildeten 106 Stämme das K1-Kapselpolysaccharid (17%). Der K1-Phänotyp wurde signifikant häufiger in Isolaten aus Stuhlproben als in Isolaten aus HWI gefunden ( $p < 0.0005$ ). Der Anteil der K1-Kapsel bei Fäkalisolaten lag in dieser Studie bei 29% und entsprach damit weitgehend den Werten aus verschiedenen Untersuchungen, die den Anteil des K1-Phänotyps in *E. coli*-Isolaten aus Stuhlproben mit etwa einem Fünftel angeben [(Tab. 3-1) (Sarff *et al.*, 1975, Korhonen *et al.*, 1985, Wullenweber *et al.*, 1993, Bettelheim *et al.*, 2003)]. Auch der Anteil der K1-Kapsel bei *E. coli*-Isolaten aus HWI in dieser Studie (13%) ist mit Literaturangaben vergleichbar, auch wenn die Angaben zwischen verschiedenen Studien mit 9% (Ewers *et al.*, 2007) bis 34% (Johnson *et al.*, 2001) teilweise deutlich variieren (Tab. 3-1). Die K1-Kapsel konnte bei 22% der in dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Isolate aus bakteriämischen, adulten Patienten detektiert werden. Daten aus der Literatur stimmen mit diesen Werten überein und geben die Häufigkeit der K1-Kapsel bei aus nicht-neonataler Bakteriämie isolierten *E. coli*-Stämmen mit 12% bis 20% an [(Tab. 3-1) (Pitt, 1978, Pitt, 1979, Devine *et al.*, 1989)]. Insgesamt entspricht der für die vorgestellte *E. coli*-Stammsammlung ermittelte Anteil K1-positiver *E.*

*coli*-Isolate an den jeweiligen epidemiologischen Bedingungen Angaben, die auch in der Literatur wiedergefunden werden können. Um die Diversität und Repräsentativität der *E. coli* K1-Sammlung zu erhöhen, wurde sie mit 77 bereits als K1-positiv beschriebenen *E. coli*-Isolaten aus den Laboren von M. Achtman, L. Beutin, U. Dobrindt sowie C. Ewers und L. Wieler ergänzt, die aus unterschiedlichen Ländern und verschiedenen Jahren stammten. Die 77 *E. coli* K1-Stämme umfassten insgesamt 39 Isolate aus an einer Coliseptikämie erkrankten Vögeln, um mit der Sammlung *E. coli* K1-Stämme aus dem aviären Wirt zu berücksichtigen. Die neu erstellte *E. coli* K1-Stammsammlung mit insgesamt 183 Isolaten ermöglichte die Durchführung genotypischer Analysen von *neuO* und CUS-3 in der *E. coli* K1-Population und zudem die Realisierung von Vergleichen zwischen humanen und aviären *E. coli* K1-Isolaten.

#### 6.1.2. Phylogenie der untersuchten *E. coli* K1-Stämme

Bei der MLST handelt es sich um eine phylogenetisch informative, reproduzierbare und universell verwendbare Methode, um die Populationsbiologie verschiedener Spezies zu bestimmen [Übersicht in: (Maiden, 2006)], die zur Typisierung der erstellten *E. coli* K1-Stammsammlung genutzt wurde. Mittels MLST-Analyse konnte ermittelt werden, dass der STC95 die vorherrschende klonale Linie unter den 183 *E. coli* K1-Isolaten darstellt (n=80, 44%). Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da der STC95 bereits als mit der K1-Kapsel assoziiert beschrieben worden ist (Weissman *et al.*, 2006, Wirth *et al.*, 2006). *E. coli* K1-Stämme des STC95 wurden in dieser Studie sowohl in humanen und aviären Erkrankungsisolaten als auch in Trägerstämmen detektiert, und auch in der *E. coli* MLST-Datenbank wurden STC95-Isolate aus Stuhlproben bzw. humanen und aviären Erkrankungen hinterlegt (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). *E. coli* K1-Isolate aus den in dieser Studie am zweit- und dritthäufigsten gefundenen MLST-Linien ST141 bzw. STC59 zeigten eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der verschiedenen klinischen Bedingungen. Über 80% der STC59-Isolate waren mit intestinalem Trägertum assoziiert, wogegen 70% der ST141-Stämme aus HWI gewonnen wurden. K1-Stämme des STC59 wurden in einer kürzlich veröffentlichten Studie in die phylogenetische Gruppe D eingeordnet (Mora *et al.*, 2009). In dieser Gruppe finden sich neben *E. coli*-Isolaten aus extraintestinalen Infektionen auch Stämme aus asymptomatischem Trägertum (Duriez *et al.*, 2001, Wirth *et al.*, 2006). Die hauptsächlich aus HWI isolierten ST141 K1-Stämme hingegen werden der phylogenetischen Gruppe B2 zugeordnet [(<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) (Leflon-Guibout *et al.*, 2008)], die für ihren Gehalt an ExPEC bekannt ist (Picard *et al.*, 1999, Ewers *et al.*, 2007).

Etwa 60% der untersuchten *E. coli* K1-Stämme wurden in den Jahren 2005 und 2006 am IHM Würzburg isoliert. Zwar wurden *E. coli* K1-Isolate aus Stuhlproben von Studenten verschiedener Kurse, von Mitarbeitern des IHM Würzburg sowie der MHH in Hannover untersucht und Erkrankungsisolat von Patienten unterschiedlicher Krankenhausstationen analysiert, doch ein möglicher geographischer und temporärer Bias, der mit dieser Sammlung einhergeht, ist nicht auszuschließen. Um diesen Bias zu minimieren wurden 77 weitere *E. coli* K1-Isolate aus einem Zeitraum von 1943 bis 2004 aus elf Ländern mit in die Analysen einbezogen. Sowohl mit der Untersuchung des Speziesreichtums als auch mit der Berechnung des Simpson's Diversitätsindex auf Basis der ST der Stämme konnte eine höhere genetische Diversität in der 2005/2006- $\delta$ -Sammlung im Vergleich zu den hinzugezogenen Stämmen gefunden werden. Der Vergleich der ST von Stämmen unseres Datensatzes mit den in der MLST-Datenbank vorhandenen *E. coli* K1-ST ergab eine gute Repräsentation von K1-assoziierten ST in unserer Studie. Diese Analysen implizieren, dass ein Großteil der genetischen Diversität von *E. coli* K1 mit der vorliegenden Stammsammlung abgedeckt ist, eine repräsentative *E. coli* K1-Stammsammlung erstellt wurde und dass lokal und zeitlich begrenzte *E. coli*-Sammlungen phylogenetisch informativ sein können.

### 6.1.3. Assoziation von *neuO/CUS-3* mit dem *E. coli* K1-STC95

Bei *NeuO* handelt es sich um die O-Acetyltransferase, die für die O-Acetylierung der *E. coli* K1-Kapsel verantwortlich ist. Das entsprechende Gen wird von dem Prophagen CUS-3 codiert, der in den *dsdC/argW*-Lokus des *E. coli* K1-Genoms integriert (Deszo *et al.*, 2005). Die Assoziation von *neuO* mit dem Prophagen CUS-3 sowie dessen *siaK1*-vermittelte K1-Spezifität ist ebenso bekannt (Deszo *et al.*, 2005, Stummeyer *et al.*, 2006) wie die *in vitro*-Infektiosität von CUS-3 für *E. coli* K1-Isolate. Unbekapselte *E. coli* K1-Mutanten sind gegen eine CUS-3-Infektion resistent (King *et al.*, 2007b). Daher war anzunehmen, dass *neuO* ausschließlich in K1-bekapselten *E. coli*-Isolaten zu detektieren ist: In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte *neuO* in der vorliegenden Arbeit nur in K1-positiven *E. coli*-Isolaten nachgewiesen werden. In einer Auswahl von 100 K1-negativen *E. coli*-Isolaten aus der in der vorliegenden Arbeit erstellten *E. coli* (MAC)-Stammsammlung wurde kein einziger *neuO*-positiver Stamm identifiziert.

Die Verbreitung von Genen durch lysogene Phagen ist ein bekanntes Phänomen in verschiedenen Bakterienspezies. Einige Prophagen bringen Gene in die Wirtspopulation ein, die, wie im Fall von CUS-3 und *neuO*, für eine Änderung des bakteriellen Phänotyps („lysogene Konversion“) verantwortlich sind [Übersicht in: (Canchaya *et al.*, 2003)]. So



konnte für Gruppe A-Streptokokken kürzlich gezeigt werden, dass die über Phagen-Transduktion erworbene Phospholipase A zu der Verbreitung und Virulenz eines neu auftretenden, hoch-pathogenen Klons beiträgt (Sitkiewicz *et al.*, 2006). Der lambdaoide Phage CDT-1 $\Phi$  codiert das Cyclomodulin CDT (*cytolethal distending toxin*) und spielt wahrscheinlich eine Rolle beim horizontalen Transfer dieses Virulenzgens in enteropathogenen *E. coli* (Asakura *et al.*, 2007). Auch das Shigatoxin, ein Hauptvirulenzfaktor von EHEC-Stämmen, wird von lysogenen Phagen codiert und kann durch Transduktion der Phagen zwischen *E. coli*-Isolaten übertragen werden [(O'Brien *et al.*, 1984); Übersicht in: (Herold *et al.*, 2004)]. Die Verteilung weiterer genetischer Elemente wie Pathogenitätsinseln oder Plasmide in verschiedenen *E. coli*-Pathovaren, die als Virulenz-, Fitness-, oder Kolonisationsfaktoren angesehen werden können, war Gegenstand unterschiedlicher Studien [Übersicht in: (Dobrindt, 2005)]. So konnte gezeigt werden, dass enterotoxische *E. coli* in verschiedenen, mit der MLST definierten phylogenetischen Linien der *E. coli*-Population verbreitet sind (Turner *et al.*, 2006). Da pathogene *E. coli*-Gruppen wie EHEC oder EPEC in nicht verwandten ST auftreten, wird ein von der Phylogenie der Stämme unabhängiger Erwerb der Virulenzeigenschaften angenommen (Reid *et al.*, 2000, Wirth *et al.*, 2006). Das Vorkommen der K1-Kapsel konnte in verschiedenen ST gezeigt werden (Wirth *et al.*, 2006). *NeuO* und CUS-3 konnten zwar in einer 2007 publizierten Arbeit in einer Auswahl von 111 serotypisierten *E. coli* K1-Isolaten in 60% der untersuchten Stämme detektiert und eine Assoziation mit den *E. coli* O-Antigenen O18 und O45 nachgewiesen werden (King *et al.*, 2007b), doch fehlte bislang eine phylogenetische Analyse zur *neuO*/CUS-3-Verbreitung in der *E. coli* K1-Population. Die Verteilung von *neuO* wurde daher in der beschriebenen MLST-typisierten *E. coli* K1-Stammsammlung untersucht. Insgesamt 103 der 183 gesammelten Stämme (56%) enthielten das Gen. Eine sehr deutliche Assoziation von *neuO* mit dem STC95 konnte beobachtet werden ( $p < 5 \times 10^{-7}$ ), indem das Gen in 98% der STC95-Isolate gefunden werden konnte. Dieser Befund war unabhängig davon, ob die STC95-Stämme aus humanem asymptomatischen Trägertum, humanen HWI oder IE bzw. aus aviärer Coliseptikämie stammten. Dagegen war *neuO* nur in 24% der nicht-STC95-Stämme zu detektieren; hier war das Gen aber nicht auf einen bestimmten ST oder STC beschränkt, sondern in unterschiedlichen Linien enthalten. Ein möglicher, der nicht-zufälligen Verteilung von *neuO* und CUS-3 in der *E. coli* K1-Population zugrunde liegender Mechanismus könnte in einer klonalen Expansion des *E. coli* K1-STC95 nach der Aufnahme von *neuO*/CUS-3 begründet sein. Auch ein regelmäßiger Import von CUS-3 in Stämme des STC95 ist denkbar. Ob es dabei neben der K1-Kapsel weitere für eine CUS-3-Infektion essentielle Faktoren gibt,

die der STC95 im Vergleich zu anderen MLST-Linien bietet und die eine erhöhte Transduktionsfrequenz in STC95 erklären könnten, kann aber nur Gegenstand von Spekulationen sein. Eine positive Selektion von *neuO*/CUS-3 in *E. coli* K1 des STC95 ist darüber hinaus denkbar und könnte damit zusammenhängen, dass die K1-Kapsel O-Acetylierung unter bestimmten Umweltbedingungen, die möglicherweise zwischen *E. coli* K1-Stämmen aus verschiedenen ST und STC variieren, nützlich für STC95-Isolate ist. So wurde auch der Erhalt des Phagen YpfΦ in *Yersinia pestis* über mehr als 7500 Jahre, trotz seiner *in vitro*-Instabilität bei mehrmaliger Passagierung der Bakterien, auf einen positiven Einfluss des Phagen auf das Bakterium unter natürlichen Bedingungen zurückgeführt (Derbise *et al.*, 2007).

*NeuO* war in den verschiedenen *E. coli* K1-ST und STC unterschiedlich verteilt und wurde in einigen *E. coli* K1-Linien selten oder nie identifiziert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die Zugänglichkeit des *dsdC/argW*-Lokus liefern, in den CUS-3 integriert. Der *dsdC/argW*-Lokus in *E. coli* ist sogar in verwandten O18:K1:H7-Stämmen in Bezug auf die Insertion von lysogenen Prophagen als auch in Bezug auf die Duplikation bzw. Deletion von *dsd*-Genen relativ flexibel (Rudd, 1999, Clark *et al.*, 2001, Deszo *et al.*, 2005, Moritz & Welch, 2006). Eine Vielzahl von Umordnungsprozessen des *argW*-Lokus mit IS-Insertionen, Deletionen und Rearrangements konnte auch in der vorliegenden Studie für einige ST62-Stämme beobachtet werden. Ob der *dsdC/argW*-Lokus in *neuO*/CUS-3-negativen *E. coli* K1-Stämmen ebenfalls von Umorganisationen oder Insertionen genetischer Elemente betroffen war und dadurch eine Integration von CUS-3 behindert gewesen sein könnte, wurde mittels PCR analysiert. Weder in *neuO*-negativen Stämmen des ST80 noch des ST357 war eine Amplifikation des *dsdC/argW*-Lokus möglich. Der Bereich scheint mit anderen genetischen Elementen besetzt oder umgeordnet zu sein, was eine Infizierbarkeit durch CUS-3 wahrscheinlich ausschließt. In den komplett *neuO*-negativen Linien STC59 und ST141 war der *dsdC/argW*-Lokus allerdings in den für die Analysen herangezogenen Stämmen nicht belegt. Deshalb muss die Hypothese der verminderten Zugänglichkeit des CUS-3-Integrationsortes in nicht-STC95-Stämmen zumindest für einige Linien zurückgewiesen werden. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche klonale Verteilung von *neuO*/CUS-3 in *E. coli* K1 könnte darin bestehen, dass Mutationen in der CUS-3 *att*-Site im *E. coli* K1-Genom eine Integration des Phagen verhindern. Auch wenn es noch keinen experimentellen Beweis für die CUS-3 *att*-Site gibt, wurde bereits eine Nukleotidabfolge für die CUS-3-Integrationsstelle vorgeschlagen (Stummeyer *et al.*, 2006), die Teil der *att*-Site des Coliphagen HK620 ist (Clark *et al.*, 2001). Mittels Sequenzanalyse

konnte kein Basenaustausch in der potenziellen *att-Site* von CUS-3 im *E. coli* K1-Genom detektiert werden. Auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte daher kein Grund ermittelt werden, warum der *dsdC/argW*-Lokus in den Stämmen des ST141 bzw. STC59 nicht mit CUS-3 besetzt ist. *In vitro*-Infektionsexperimente von *E. coli* K1 mit CUS-3 könnten einen Ansatz darstellen, mit dem die generelle Infizierbarkeit von Stämmen des ST141 bzw. STC59 mit CUS-3 überprüft werden könnte.

#### 6.1.4. Koevolution von *E. coli* K1 und CUS-3

Die Genotypisierung von CUS-3 und der anschließende Vergleich der Sequenzen mit den Sequenzen der MLST-Haushaltsgenen, die *E. coli* K1 repräsentieren, ermöglichten die Untersuchung der Koevolution zwischen dem Prophagen und seinem Wirt. ST bzw. CUS-3\_GT wurden für diese Analyse auf der Basis von phylogenetischen Analysen zu MLST- und CUS-3-Gruppen zusammengefasst. Die Assoziation dieser Gruppen erbrachte Hinweise auf eine Koevolution von CUS-3 und *E. coli* K1. Diese Annahme einer Koevolution beruht auf der nicht zufälligen Assoziation von CUS-3-Gruppen mit den MLST-Gruppen. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass CUS-3 von verschiedenen *E. coli* K1-Linien aufgenommen wurde und sich mit ihnen mitentwickelte. Auch wenn es aufgrund von *in vitro*-Daten relativ wahrscheinlich ist, dass eine CUS-3-Transduktion und Infektion zwischen verschiedenen *E. coli* K1-Stämmen auch *in vivo* vorkommen könnte (King *et al.*, 2007b), scheint sich der Einfluss des horizontalen Transfers von CUS-3 auf die Verteilung des Prophagen unseren Ergebnissen zur Folge trotzdem in Grenzen zu halten. Einem Großteil der *neuO*-positiven Stämme (über 70%) konnte ein CUS-3\_GT zugeordnet werden. In diesen Isolaten waren also neben *neuO* auch die CUS-3 Endosialidase (in 97% der *neuO*-positiven Stämme) und das CUS-3-spezifische ORF22 (in 76% der *neuO*-positiven Stämme) vorhanden. In der Studie von King *et al.* lag der Anteil des CUS-3-spezifischen ORF22 in *neuO*-positiven *E. coli* K1-Isolaten bei 89% (King *et al.*, 2007b) und damit ähnlich hoch wie in der vorliegenden Arbeit. Interessanterweise konnte 78% der STC95-Isolate ein CUS-3\_GT zugeordnet werden, wohingegen diese Quote in nicht-STC95-Stämmen nur bei 48% lag. Möglicherweise kommt es außerhalb des STC95 häufig zur Phagendegeneration.

#### 6.1.5. Erhalt von *neuO* mit großen Anzahlen an 5'-Heptanucleotide-Repeats

Die *neuO*-Expression wird von *Heptanucleotide-Repeats* beeinflusst, die am 5'-Ende des Gens lokalisiert sind. Eine Translation des vollständigen, funktionellen NeuO findet nur statt, wenn die Anzahl der *Repeats* durch drei teilbar ist. *Repeats* werden über das sog. „DNA-Slippage und *Mispairing*“ eingefügt bzw. entfernt (Deszo *et al.*, 2005). Die Charakterisierung

von *neuO* in allen Stämmen, die das Gen enthielten, erfolgte durch Sequenzanalysen. Insgesamt lag in 23% der Isolate aus der präsentierten Stammsammlung *neuO* in der *on*-Phase (Anzahl der *Repeats* durch drei teilbar) vor, während 77% das Gen in der *off*-Phase enthielten (Anzahl der *Repeats* kein Vielfaches von drei). Dieser Wert lag nur geringfügig über dem statistisch erwarteten Wert von 66.7%, wenn nur durch drei teilbare *Repeat*-Anzahlen eine Expression von funktionsfähigem Protein zulassen. Longitudinale Daten über die *in vivo*-Variabilität der 5'-*Heptanucleotide-Repeats* in *neuO* sind bisher im Gegensatz zu der *Repeat*-Region des Protein A-Gens (*spa*) von *Staphylococcus aureus* (Kahl *et al.*, 2005) oder verschiedenen VNTR-Loci von *Haemophilus influenzae* (Renders *et al.*, 1999) nicht erhältlich. Der in der vorliegenden Studie ermittelte Median der *Heptanucleotide-Repeat*-Anzahl erscheint aufgrund der Möglichkeit von Deletionsereignissen in dieser Region mit 22 Einheiten relativ hoch. Dieser Befund ist letztlich aber nicht verwunderlich, da die katalytische Effizienz von NeuO linear mit Zunahme der Anzahl der *Heptanucleotide-Repeats* in dem Gen ansteigt (Bergfeld *et al.*, 2007). Zudem ist für poly-CA/TG-*Repeats* beschrieben worden, dass der *Frameshift*, also der Verlust oder Gewinn von einzelnen *Repeats*, mit der Anzahl der *Repeats* ansteigt (Levinson & Gutman, 1987). Dieses Phänomen könnte dem Bakterium eine effizientere und schnellere Anpassung an Umweltbedingungen ermöglichen. Somit kann sowohl durch die Erhöhung der Enzymeffizienz als auch durch die Fähigkeit zur schnelleren An- bzw. Abschaltung des Gens eine Erhaltung bzw. eine positive Selektion von *neuO* mit steigenden Anzahlen an *Heptanucleotide-Repeats* in *E. coli* K1 vermutet werden. Die Anzahl der *Heptanucleotide-Repeats* in *neuO* zeigte in unserer Studie eine beeindruckende Bandbreite (2 bis 93). In 90% der Isolate konnten fast alle möglichen *Repeat*-Anzahlen zwischen 5 und 47 in *neuO* detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich gut mit Literaturdaten, die die Anzahl an *Repeats* mit 3 bis 63 angeben (King *et al.*, 2007b).

## **6.2. Molekulare Analysen von humanen und aviären *E. coli* K1-Stämmen mit ST95 und CUS-3\_GT2**

Von insgesamt 41 humanen und aviären *E. coli* K1-Isolaten mit jeweils gleichen ST und CUS-3\_GT wiesen 27 Stämme die Kombination ST95 und CUS-3\_GT2 auf (Tab. 5-6). Analysen des Gengehaltes sollten eine Diskriminierung aviärer und humaner Isolate ermöglichen. Hierzu wurden die ExPEC Plasmid-assoziierten Gene *etsA* und *hlyF* sowie die ExPEC Chromosom-assoziierten Gene *ibeA*, *hlyD*, *malX* und *fyuA* untersucht, die bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Typisierung von *E. coli*-Isolaten verwendet wurden (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005a, Johnson *et al.*, 2006b, Johnson *et al.*, 2007). In verschiedenen

Studien konnte gezeigt werden, dass aviär pathogene *E. coli* und humane ExPEC-Stämme durchaus differenzierbar sind. Stets wurden jedoch Untergruppen mit „gemischten Clustern“ aus aviären und humanen ExPEC-Isolaten ermittelt die, je nach gewählter Typisierungsmethode, hauptsächlich der phylogenetischen Gruppe B2 bzw. dem STC95 zugeordnet werden konnten (Johnson *et al.*, 2007, Ewers *et al.*, 2007, Moulin-Schouleur *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2008). Auch die in dieser Arbeit identifizierte Untergruppe „ST95/CUS-3\_GT2“ bildet solch ein Cluster, dessen zugeordnete *E. coli* K1-Isolate weder auf Basis der MLST, der CUS-3-Genotypisierung noch ihres Gengehalts entsprechend ihrer Herkunft zu separieren waren. Die hoch-diskriminierende Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurde bereits für die Analyse humaner und aviärer *E. coli* K1-Isolate eingesetzt, eine Auftrennung der Isolate entsprechend ihrer Herkunft mit der PFGE erscheint möglich (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006). Ob die PFGE allerdings eine angemessene Methode für die Ermittlung von Langzeit-Verwandtschaftsbeziehungen darstellt und eine Relevanz bei phylogenetischen Fragestellungen besitzt, ist zumindest fraglich, da sie aufgrund ihres hohen Diskriminierungspotentials eher für die Bewertung von lokalen Ausbrüchen von Infektionskrankheiten geeignet zu sein scheint (Maiden *et al.*, 1998, Johnson & Russo, 2005). Die Hypothese einer engen Verwandtschaft zwischen einigen humanen und aviären *E. coli* K1-Isolaten (des STC95) wird durch die vorliegende Arbeit unterstützt. Die Daten deuten auf ein zoonotisches Potential von *E. coli* K1-Isolaten aus dem STC95 mit dem CUS-3\_GT2 hin und sprechen gegen eine strikte Wirtsspezifität dieser Stämme. Für diesen über Wirtsspeziesgrenzen erfolgenden Bakterienaustausch lässt sich vor allem die häufige Kontamination von Geflügelprodukten mit ExPEC anschulden [Übersicht in: (Johnson & Russo, 2005)].

### **6.3. Relevanz der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung unter unterschiedlichen Umweltbedingungen**

Die Materialien und Lebensbereiche, aus denen *Escherichia coli* K1-Stämme isoliert werden können, sind ausgesprochen vielfältig. Die Bakterien werden in humanen invasiven Erkrankungen und aviärer Coliseptikämie detektiert, kolonisieren aber auch den Darm gesunder Menschen bzw. Tiere und können nach ihrer Ausscheidung zudem in der Umwelt gefunden werden (Hartl & Dykhuizen, 1984). Funktionelle Daten über die Bedeutung der *E. coli* K1-Kapsel als solcher unter verschiedenen Bedingungen liegen vor (vgl. 3.2.1.). Die Relevanz der NeuO-vermittelten Kapselmodifizierung mit O-Acetylgruppen wurde dagegen bisher nur unvollständig beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro*-, *in vivo*-

und *ex vivo*-Experimente durchgeführt, um die Rolle der K1-Kapsel O-Acetylierung näher zu analysieren.

### 6.3.1. Die K1-Kapsel O-Acetylierung hat auf die pathogenetischen Eigenschaften von *E. coli* keinen Einfluss

Eine *E. coli* K1-Infektion des Neugeborenen beginnt mit dem Übertritt des Bakteriums aus dem Darm in das Blut, wo es zu einer massiven Multiplikation der Bakterien kommt. Abhängig von dem Ausmaß der Bakteriämie kann sich eine Meningitis entwickeln [Übersicht in: (Kaper *et al.*, 2004)]. Die Translokation von *E. coli* K1 über die BHS erfolgt nach Daten aus dem HBMEC *in vitro*-Transwell-System über eine Transcytose des Bakteriums durch die Zellen ohne eine offensichtliche Zerstörung des Zellmonolayers (Stins *et al.*, 2001). Die Bakterien befinden sich während der Transcytose in der membranumgebenen ECV (Prasadarao *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2003). Die K1-Kapsel wurde, ebenso wie das strukturell identische Polysaccharid von MenB, als nachteilig für die Adhärenz an HBMEC beschrieben (Kim *et al.*, 2003, Unkmeir *et al.*, 2002). Dagegen konnte aber gezeigt werden, dass die Expression des K1-Antigens einen positiven Einfluss auf das Überleben des *neuO*-positiven NMEC-Stammes RS218 (Variante E44, Rifampicin-Spontanmutante) in HBMEC besitzt, wahrscheinlich bedingt durch die Verhinderung einer lysosomalen Fusion der ECV (Kim *et al.*, 2003). Der O-Acetylierungsstatus des K1-Antigens und damit die Rolle der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung bei der Interaktion mit den Zellen wurden in der Studie von Kim *et al.* aber nicht bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden HBMEC-Zellkulturversuche durchgeführt, um konstitutiv nicht-O-acetylierte und O-acetylierte Mutanten des NMEC-Stammes RS218 sowie des UPEC-Stammes A160 miteinander zu vergleichen. Die O-Acetylierung scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie den negativen Effekt des Polysaccharids allein auf die Adhärenz von *E. coli* K1 an HBMEC weder positiv noch negativ zu beeinflussen. Entsprechend den Ergebnissen aus dem durchgeführten *gentamicin protection assay*, der als eine verlässliche und einfache Technik zur Bestimmung intrazellulärer Bakterien beschrieben ist (Srivastava & Isberg, 2002), konnte kein Effekt der O-Acetylierung auf die Invasion von HBMEC durch *E. coli* K1 ermittelt werden. Es soll an dieser Stelle aber nicht unerwähnt bleiben, dass der *gentamicin protection assay* als problematisch betrachtet wird, da u. a. möglicherweise einige extrazelluläre Bakterien die Gentamicin-Behandlung überleben bzw. das Gentamicin in eukaryotische Zellen eindringen kann und intrazelluläre Bakterien abtötet (Srivastava & Isberg, 2002). Für *E. coli* konnten Burns *et al.* beschreiben, dass eine 2-stündige Inkubation mit 100 µg/ml Gentamicin ein über

99,99%iges Abtöten von Stamm RS218 in Zellkulturmedium zur Folge hatte, allerdings in der Abwesenheit von HBMEC (Burns *et al.*, 2001). Für definitive Aussagen über die Bedeutung der K1-Kapsel O-Acetylierung auf zellulärer Ebene sind weiterführende Analysen mit zellbiologischen Methoden notwendig. Es lässt sich aber festhalten, dass in diesem ersten Vergleich nicht-O-acetylierter und O-acetylierter *E. coli* K1 weder die Adhärenz noch die Invasion der Bakterien durch die K1-Kapselmodifikation beeinträchtigt oder begünstigt war.

Trotz vielfacher Studien über die Rolle der K1-Kapsel in der Pathogenese einer *E. coli* K1-Infektion (Glode *et al.*, 1977, Bortolussi *et al.*, 1978, Kim *et al.*, 1992, Mellata *et al.*, 2003a, Li *et al.*, 2005) gibt es über die Rolle der K1-Kapsel O-Acetylierung bislang nur wenige *in vivo*-Daten, die aus dem neonatalen Ratten- oder Mausmodell stammen. Studien zur Rolle der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung bei der aviären Coliseptikämie liegen nicht vor. In der vorliegenden Arbeit wurden konstitutiv nicht-O-acetylierte bzw. O-acetylierte Varianten der APEC-Stämme IMT5155 und IMT9579 im Hühnerinfektionsmodell verglichen. Zwischen den IMT5155-Mutanten konnten in drei Experimenten keine Unterschiede bezüglich der Keimlast der untersuchten Organe detektiert werden. In dem IMT9579-Mutantenpaar konnten für die nicht-O-acetylierte Mutante höhere Keimlasten in den analysierten Organen ermittelt werden als für die O-acetylierte Variante. Dieser Befund passt zu kürzlich beschriebenen Daten aus dem neonatalen Rattenmodell, nach denen die *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung keinen positiven Effekt auf die bakterielle Invasion von Blut und Meningen besitzt (Zelmer *et al.*, 2008), und unterstützt zudem Daten aus dem neonatalen Mausmodell, die in der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung keinen kritischen Faktor für die Virulenz der Bakterien vermuten lassen (Colino & Outschoorn, 1999). Dagegen ist im Mausmodell der *Staphylococcus aureus*-Infektion eine höhere Keimlast im Blut der Tiere sowie eine effizientere Kolonisierung der Nieren 5 bis 20 min nach Infektion durch die Bakterienvariante beschrieben worden, deren Typ 5-Polysaccharidkapsel O-acetyliert vorlag (Bhasin *et al.*, 1998).

Die Antikörperantwort ist in Mäusen nach der Immunisierung mit O-acetyliertem Kapsel-Polysaccharid der Serogruppe A-Meningokokken wesentlich stärker als in mit nicht-O-acetyliertem Polysaccharid immunogenisierten Mäusen, und die Kapselmodifikation ist wahrscheinlich wesentlich an der Entwicklung einer protektiven Immunantwort beteiligt (Berry *et al.*, 2002). Bei Serogruppe C und Y-Meningokokken dagegen scheint das nicht-O-acetylierte Polysaccharid im Vergleich mit dem jeweiligen O-acetylierten Polysaccharid immunogener zu sein (Fusco *et al.*, 2007). Für *E. coli* K1 ist eher keine Bedeutung der humoralen Immunität zu erwarten, da das K1-Polysaccharid immunogen inert ist.

### 6.3.2. Die *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung hemmt die *in vivo*-Kolonisierung und die *in vitro*-Biofilmbildung, erhöht aber die Austrocknungsresistenz des Bakteriums

Aus den Feces von Säugetieren und Vögeln lassen sich K1-Kapsel exprimierende *E. coli*-Stämme isolieren. Die experimentelle Kolonisierung des Darms neugeborener Ratten mit K1-positiven *E. coli* konnte gezeigt werden (Glode *et al.*, 1977, Martindale *et al.*, 2000). Die K1-Kapsel an sich scheint zwar keinen essentiellen Faktor für die Kolonisierung des GI-Traktes darzustellen, trotzdem konnte für den K1-positiven Stamm RS228 gezeigt werden, dass ihre Expression während der Kolonisierung verschiedener Darmbereiche der Ratte stabil ist (Martindale *et al.*, 2000). Über die Bedeutung der *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung bei der Darmkolonisierung gibt es noch keine Daten. In einer Zusammenarbeit mit Christa Ewers und Lothar Wieler vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen in Berlin konnte ein Protokoll etabliert werden, das es ermöglichte, Hühner mit nicht-O-acetylierten und O-acetylierten Varianten des APEC-Stamm IMT5155 zu inokulieren und deren Besiedlung mit den Stämmen nachzuvollziehen. Eine Ausscheidung der Bakterien durch die Tiere wurde über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen verfolgt. Keines der Tiere zeigte Anzeichen einer intestinalen oder extraintestinalen Erkrankung nach Inokulation. Die Anzahl an Tieren, die die nicht-O-acetylierte IMT5155-Variante ausschieden, war stets höher als die Anzahl an Tieren, die die O-acetylierte IMT5155-Variante ausschieden. Bisher wurde dieses *in vivo*-Kolonisierungsexperiment erst einmal durchgeführt, weshalb die Daten bis zu einer Reproduktion der Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren sind. Der ermittelte negative Effekt der K1-Kapsel O-Acetylierung könnte mit einer geringeren Fähigkeit O-acetylierter Bakterien einhergehen, im statischen *in vitro*-Modell Biofilme zu bilden (s. u.), und zudem Erklärung für die geringe Prävalenz von *neuO* in der *on*-Phase in humanen Stuhlproben sein (s. Tab. 5-4). K1-Kapselpolysaccharid, das mit O-Acetylgruppen modifiziert vorliegt, ist in geringerem Umfang von der Degradation u. a. durch die Neuraminidasen von *C. perfringens* (Orskov *et al.*, 1979, Tomlinson & Taylor, 1985) sowie von *V. cholera* (Tomlinson & Taylor, 1985) betroffen als nicht-modifiziertes K1-Antigen. Da das Vorkommen von Neuraminidasen im GI-Trakt als wahrscheinlich betrachtet wird, wurde über einen Kolonisierungsvorteil von O-acetylierten *E. coli* K1 im Darm spekuliert [Übersicht in: (Vimr & Steenbergen, 2006)]. Mit den bisher vorliegenden Daten kann diese Hypothese hier nicht unterstützt werden. Gegenstand zukünftiger Analysen sollten die Adhärenz bzw. Mikrokoloniebildung nicht-O-acetylierter und O-acetylierter *E. coli* K1 auf der Mukosa des Hühnerdarms sowie die phasenvariable *neuO*-Expression in den einzelnen Darmabschnitten sein. Auch wenn für die nicht-O-acetylierte IMT5155-Variante nachgewiesen werden konnte, dass sie den GI-Trakt



der Tiere einige Tage kolonisieren kann, bleibt unklar, ob dieser Stamm in der Lage ist, sich im Darm der Hühner langfristig zu etablieren. Zur Analyse dieser Fragestellung wären zeitlich ausgedehntere Experimente über Wochen und Monate erforderlich. In Untersuchungen, in denen verschiedene *E. coli* O157-Stämme in *White Leghorn*-Hühner eingebracht wurden, variierte die Ausscheidung (analysiert über sieben Wochen) in Abhängigkeit von den eingesetzten Stämmen und dem Alter der Tiere. In 1-Tag alten Hühnern konnte eine Besiedlung der Tiere, nachgewiesen durch Kloakenabstriche und eine semi-quantitative Auswertung, durch alle eingesetzten *E. coli* O157-Stämme detektiert werden, wogegen der Darm von 6-Wochen alten Hühnern nicht von allen Stämmen kolonisiert wurde (La Ragione *et al.*, 2005). Zur Verlängerung der *E. coli* K1-Ausscheidungsdauer in unseren Experimenten könnte möglicherweise die Verwendung jüngerer Tiere beitragen.

Der Einfluss von Polysaccharid-Kapseln auf die Biofilmbildung verschiedener Spezies war bereits Gegenstand zahlreicher Studien, und die Expression einer Polysaccharidkapsel kann sich sowohl positiv als auch negativ auf die Biofilmbildung auswirken. Für das extrazelluläre Polysaccharid von *Vibrio cholerae* konnte gezeigt werden, dass es die Biofilmbildung fördert (Yildiz & Schoolnik, 1999). In *Klebsiella pneumoniae* führt eine geringere Kapselexpression zu einer verminderten Biofilmproduktion (Boddicker *et al.*, 2006). Dagegen ist für Meningokokken bekannt, dass ausschließlich unkapselte Isolate Biofilme produzieren (Lappann *et al.*, 2006), in *Streptococcus pneumoniae* (Allegrucci & Sauer, 2007) und in *Vibrio vulnificus* (Joseph & Wright, 2004) wirkt das Kapselpolysaccharid ebenfalls der Biofilmbildung entgegen. Es konnten zwar bereits *E. coli* K1-Isolate beschrieben werden, die Biofilme bildeten (Hancock *et al.*, 2007), doch ist in weiteren Studien das K1-Kapselpolysaccharid als nachteilig für die Biofilmbildung beschrieben worden (Schembri *et al.*, 2004, Valle *et al.*, 2006). Der Effekt der K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Biofilm-Produktion von *E. coli* war noch nicht Gegenstand einer Studie. Um solch eine Analyse durchführen zu können, mussten zunächst Biofilm-positive K1-Isolate in unserer Stammsammlung identifiziert werden: Dreizehn von 48 getesteten *E. coli* K1-Stämmen waren Biofilm-positiv. Interessanterweise wurden alle 13 Biofilm-positiven Stämme aus HWI isoliert. Dieser Befund passt zu Daten, nach denen die Biofilmbildung eine wichtige Strategie für die (persistierende) Kolonisierung des Harntrakts darstellt [(Morris *et al.*, 1999, Hancock *et al.*, 2007) Übersicht in: (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009)]. Der Vergleich von nicht-O-acetylierten und O-acetylierten *E. coli* K1-Varianten aus vier Stammpaaren zeigte konsistent eine 30%ige Reduktion der Biofilmbildung in den O-acetylierten Stämmen. Der Einfluss der

K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Biofilmbildung war unabhängig vom phylogenetischen Hintergrund der Stämme. Im Gegensatz zu den hier ermittelten Daten bildete ein von O-acetyliertem Alginat umgebener *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm unter Flussbedingungen effizienter *in vitro*-Biofilme als eine Mutante mit nicht-O-acetyliertem Alginat (Nivens *et al.*, 2001). Es muss jedoch hervorgehoben werden, dass die Daten in der vorliegenden Arbeit unter statischen Bedingungen gewonnen wurden, so dass eine direkte Vergleichbarkeit der Befunde nicht gegeben ist.

Mikrobielle Polysaccharide können das Überleben von Bakterien in der unbelebten Umwelt positiv beeinflussen. Bei *Pseudomonas fluorescens* vermittelt das Kapselpolysaccharid Alginat Toleranz gegen osmotischen Stress und Austrocknung (Schnider-Keel *et al.*, 2001). Von extrazellulären Polysacchariden vermittelter Austrocknungsschutz wurde auch in *Acinetobacter* und *Erwinia* (Ophir & Gutnick, 1994), *Pseudomonas* sp (Roberson & Firestone, 1992), *Salmonella* (Gibson *et al.*, 2006) und dem Cyanobakterium *Nostoc commune* (Tamaru *et al.*, 2005) gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht das K1-Polysaccharid selbst, sondern seine Dekoration mit O-Acetylgruppen auf ihren Einfluss auf die Austrocknungsresistenz hin untersucht. Die beobachtete Erhöhung der Austrocknungstoleranz in allen untersuchten phylogenetischen Linien lässt den Schluss zu, dass es sich bei der K1-Kapsel O-Acetylierung um einen Mechanismus zur Erhöhung der Austrocknungsresistenz von *E. coli* handelt, der unabhängig vom genetischen Hintergrund der Stämme ist und allein auf der Anwesenheit von funktionell aktivem NeuO beruht. Das extrazelluläre Polysaccharid Colaninsäure von *E. coli* wurde mit der Austrocknungstoleranz der Bakterien in Verbindung gebracht (Ophir & Gutnick, 1994, Obadia *et al.*, 2007, Sutherland, 1969). Interessanterweise handelt es sich bei der Colaninsäure um ein O-acetyliertes Molekül (Sutherland, 1969, Garegg *et al.*, 1971). Auch für das Gammaproteobakterium *Azotobacter vinelandii* ist eine Erhöhung der Austrocknungsresistenz durch die O-Acetylierung des extrazellulären Polysaccharids Alginat beschrieben worden (Vazquez *et al.*, 1999). Möglicherweise stellt die O-Acetylierung extrazellulärer Polysaccharide einen Mechanismus verschiedener Bakterien dar, um den Schutz vor Austrocknung zu erhöhen. Die Bedeutung der etwa 10-fach höheren Überlebensrate O-acetylierter *E. coli* K1 nach acht Wochen in HTK für das Überleben des Bakterium in seiner natürlichen Umgebung muss in weiterführenden Experimenten bestimmt werden.

Auf welchen molekularen Eigenschaften der K1-Kapsel O-Acetylierung die beschriebene Inhibition der Kolonisierung und Biofilmbildung sowie die beschriebene Erhöhung der Austrocknungsresistenz von *E. coli* K1 beruht, ist unklar. Bisher liegen keine Vergleiche der

physiko-chemikalischen Eigenschaften von nicht-O-acetyliertem und O-acetyliertem *E. coli* K1-Polysaccharid vor. Bei Alginat von *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine erhöhte Quellungsfähigkeit für die O-acetylierte Form berichtet (Skjåk-Bræk *et al.*, 1989). Inwieweit solch eine erhöhte Quellungsfähigkeit und damit Wasseraufnahme auch für das O-acetylierte *E. coli* K1-Polysaccharid zutrifft und einige der in dieser Arbeit ermittelten Befunde erklären könnte, ist spekulativ und bedarf einer detaillierten Analyse beider K1-Kapselpolysaccharid-Varianten. Die Lactonisierung (intramolekulare Veresterung) von aufgereinigtem K1-Polysaccharid nimmt mit fallendem pH zu (Lifely *et al.*, 1981). Durch eine Lactonisierung wird die negative Ladung der  $\alpha$ -2,8-verknüpften Polysialinsäure reduziert (Zhang & Lee, 1999), was die geringe Löslichkeit von verestertem K1-Polysaccharid in Wasser erklären könnte (Lifely *et al.*, 1981). Für die aus  $\alpha$ -2,9-verknüpften Sialinsäuremonomeren aufgebaute Kapsel der Serogruppe C-Meningokokken wurde beschrieben, dass die O-Acetylierung eine Lactonisierung innerhalb der Kapsel größtenteils verhindert (Lifely *et al.*, 1981). Zukünftige physiko-chemikalische Vergleiche von nicht-O-acetyliertem bzw. O-acetyliertem *E. coli* K1-Polysaccharid könnten möglicherweise einen Schlüssel für das Verständnis der funktionellen Bedeutung der K1-Kapsel O-Acetylierung darstellen.

#### 6.4. Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *neuO* trotz der *in vitro*-Induzierbarkeit und Infektiosität des kodierenden Prophagen CUS-3 (King *et al.*, 2007b) in der *E. coli* K1-Population nicht zufällig in verschiedenen Linien verteilt, sondern eng mit dem STC95 von humanen und aviären *E. coli* K1-Isolaten assoziiert ist. Es wurden Zeichen einer Koevolution von Prophage und Bakterium detektiert. Der STC95 ist sehr wahrscheinlich ein Reservoir für *E. coli* K1-Isolate mit zoonotischem Potential. Die NeuO-vermittelte *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung war weder bei der Interaktion mit kultivierten Zellen noch im Hühnerinfektionsmodell funktionell relevant. In den Kolonisierungs- und Biofillexperimenten zeigte sich ein negativer Effekt der K1-Kapsel O-Acetylierung, die jedoch signifikant die Austrocknungsresistenz von *E. coli* K1 erhöhte. Eine duale Rolle der NeuO-vermittelten *E. coli* K1-Kapsel O-Acetylierung bei der Biofilmbildung bzw. Austrocknungsresistenz wird postuliert. Das Gen stellt damit ein interessantes Beispiel für die Bedeutung der Phasenvariation eines funktionell relevanten Gens bei der Anpassung an verschiedene Lebensräume dar. In zukünftigen Studien sollte der Einfluss der K1-Kapsel O-Acetylierung auf die Darmkolonisierung ebenso im Vordergrund stehen wie die Analyse physiko-chemikalischer Auswirkungen der O-Acetylierung auf das *E. coli* K1-Polysaccharid.

## 7. Literaturverzeichnis

- Achtman, M., M. Heuzenroeder, B. Kusecek, H. Ochman, D. Caugant, R. K. Selander, V. Vaisanen-Rhen, T. K. Korhonen, S. Stuart, F. Orskov & *et al.*, (1986) Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect Immun* **51**: 268-276.
- Achtman, M., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl, M. Heuzenroeder, W. Aaronson, A. Sutton & R. P. Silver, (1983) Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun* **39**: 315-335.
- Adiri, R. S., U. Gophna & E. Z. Ron, (2003) Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol Lett* **222**: 199-203.
- Aguero, M. E. & F. C. Cabello, (1983) Relative contribution of ColV plasmid and K1 antigen to the pathogenicity of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **40**: 359-368.
- Allegrucci, M. & K. Sauer, (2007) Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **189**: 2030-2038.
- Allison, G. E. & N. K. Verma, (2000) Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol* **8**: 17-23.
- Alsam, S., S. R. Jeong, J. Sissons, R. Dudley, K. S. Kim & N. A. Khan, (2006) *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. *J Med Microbiol* **55**: 689-694.
- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser & S. J. Hultgren, (2003) Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**: 105-107.
- Antao, E. M., S. Glodde, G. Li, R. Sharifi, T. Homeier, C. Laturus, I. Diehl, A. Bethe, H. C. Philipp, R. Preisinger, L. H. Wieler & C. Ewers, (2008) The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microb Pathog* **45**: 361-369.
- Asakura, M., A. Hinenoya, M. S. Alam, K. Shima, S. H. Zahid, L. Shi, N. Sugimoto, A. N. Ghosh, T. Ramamurthy, S. M. Faruque, G. B. Nair & S. Yamasaki, (2007) An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14483-14488.
- Baker, L., T. Brown, M. C. Maiden & F. Drobniowski, (2004) Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* **10**: 1568-1577.
- Barry, G. T., (1958) Colominic acid, a polymer of N-acetylneuraminic acid. *J Exp Med* **107**: 507-521.
- Barry, G. T. & W. F. Goebel, (1957) Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid. *Nature* **179**: 206.
- Bergfeld, A. K., H. Claus, U. Vogel & M. Mühlenhoff, (2007) Biochemical characterization of the polysialic acid-specific O-acetyltransferase NeuO of *Escherichia coli* K1. *J Biol Chem* **282**: 22217-22227.
- Berry, D. S., F. Lynn, C. H. Lee, C. E. Frasch & M. C. Bash, (2002) Effect of O acetylation of *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide on development of functional immune responses. *Infect Immun* **70**: 3707-3713.
- Bettelheim, K. A., L. Beutin, K. Gleier, J. L. Pearce, R. K. Luke & S. Zimmermann, (2003) Serotypes of *Escherichia coli* isolated from healthy infants in Berlin, Germany and Melbourne, Australia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**: 55-63.
- Beutin, L., S. Kaulfuss, S. Herold, E. Oswald & H. Schmidt, (2005) Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by

- molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **43**: 1552-1563.
- Bhasin, N., A. Albus, F. Michon, P. J. Livolsi, J. S. Park & J. C. Lee, (1998) Identification of a gene essential for O-acetylation of the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* **27**: 9-21.
- Bhattacharjee, A. K., H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin & I. C. Smith, (1975) Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* **250**: 1926-1932.
- Bingen, E., B. Picard, N. Brahimi, S. Mathy, P. Desjardins, J. Elion & E. Denamur, (1998) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* **177**: 642-650.
- Blanco, M., M. P. Alonso, M. H. Nicolas-Chanoine, G. Dahbi, A. Mora, J. E. Blanco, C. Lopez, P. Cortes, M. Llagostera, V. Leflon-Guibout, B. Puentes, R. Mamani, A. Herrera, M. A. Coira, F. Garcia-Garrote, J. M. Pita & J. Blanco, (2009) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum {beta}-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **63**: 1135-1141.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau & Y. Shao, (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Bliss, J. M. & R. P. Silver, (1996) Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol Microbiol* **21**: 221-231.
- Boddicker, J. D., R. A. Anderson, J. Jagnow & S. Clegg, (2006) Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect Immun* **74**: 4590-4597.
- Bonacorsi, S. & E. Bingen, (2005) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol* **295**: 373-381.
- Bortolussi, R., P. Ferrieri, B. Bjorksten & P. G. Quie, (1979) Capsular K1 polysaccharide of *Escherichia coli*: relationship to virulence in newborn rats and resistance to phagocytosis. *Infect Immun* **25**: 293-298.
- Bortolussi, R., P. Ferrieri & P. G. Quie, (1983) Influence of growth temperature of *Escherichia coli* on K1 capsular antigen production and resistance to opsonization. *Infect Immun* **39**: 1136-1141.
- Bortolussi, R., P. Ferrieri & L. W. Wannamaker, (1978) Dynamics of *Escherichia coli* infection and meningitis in infant rats. *Infect Immun* **22**: 480-485.
- Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam & R. K. Selander, (1996) Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl Environ Microbiol* **62**: 804-808.
- Bryant, D. & V. Moulton, (2004) Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol* **21**: 255-265.
- Burns, J. L., A. Griffith, J. J. Barry, M. Jonas & E. Y. Chi, (2001) Transcytosis of gastrointestinal epithelial cells by *Escherichia coli* K1. *Pediatr Res* **49**: 30-37.
- Canchaya, C., G. Fournous, S. Chibani-Chennoufi, M. L. Dillmann & H. Brussow, (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**: 417-424.
- Chen, S. L., C. S. Hung, J. Xu, C. S. Reigstad, V. Magrini, A. Sabo, D. Blasiar, T. Bieri, R. R. Meyer, P. Ozersky, J. R. Armstrong, R. S. Fulton, J. P. Latreille, J. Spieth, T. M. Hooton, E. R. Mardis, S. J. Hultgren & J. I. Gordon, (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5977-5982.

- Cherniak, R., E. Reiss, M. E. Slodki, R. D. Plattner & S. O. Blumer, (1980) Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Mol Immunol* **17**: 1025-1032.
- Clamp, M., J. Cuff, S. M. Searle & G. J. Barton, (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**: 426-427.
- Clark, A. J., W. Inwood, T. Cloutier & T. S. Dhillon, (2001) Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdoid phages. *J Mol Biol* **311**: 657-679.
- Claus, H., R. Borrow, M. Achtman, G. Morelli, C. Kantelberg, E. Longworth, M. Frosch & U. Vogel, (2004) Genetics of capsule O-acetylation in serogroup C, W-135 and Y meningococci. *Mol Microbiol* **51**: 227-239.
- Clermont, O., S. Bonacorsi & E. Bingen, (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4555-4558.
- Colino, J. & I. Outschoorn, (1999) The form variation of the capsular polysaccharide K1 is not a critical virulence factor of *Escherichia coli* in a neonatal mouse model of infection. *Microb Pathog* **27**: 187-196.
- Coque, T. M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Canton & P. Nordmann, (2008) Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **14**: 195-200.
- Cortes, G. & M. R. Wessels, (2009) Inhibition of dendritic cell maturation by group A Streptococcus. *J Infect Dis* **200**: 1152-1161.
- de Louvois, J., J. Blackbourn, R. Hurley & D. Harvey, (1991) Infantile meningitis in England and Wales: a two year study. *Arch Dis Child* **66**: 603-607.
- Derbise, A., V. Chenal-Francois, F. Pouillot, C. Fayolle, M. C. Prevost, C. Medigue, B. J. Hinnebusch & E. Carniel, (2007) A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol Microbiol* **63**: 1145-1157.
- Deszo, E. L., S. M. Steenbergen, D. I. Freedberg & E. R. Vimr, (2005) *Escherichia coli* K1 polysialic acid O-acetyltransferase gene, *neuO*, and the mechanism of capsule form variation involving a mobile contingency locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5564-5569.
- Devi, S. J., R. Schneerson, W. Egan, W. F. Vann, J. B. Robbins & J. Shiloach, (1991) Identity between polysaccharide antigens of *Moraxella nonliquefaciens*, group B *Neisseria meningitidis*, and *Escherichia coli* K1 (non-O acetylated). *Infect Immun* **59**: 732-736.
- Devine, D. A., L. Robinson & A. P. Roberts, (1989) Occurrence of K1, K5 and O antigens in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections or bacteraemia. *J Med Microbiol* **30**: 295-299.
- Dewitt, C. W. & J. A. Rowe, (1961) Sialic acids (N,7-O-diacetylneuraminic acid and N-acetylneuraminic acid) in *Escherichia coli*. I. Isolation and identification. *J Bacteriol* **82**: 838-848.
- Dho-Moulin, M. & J. M. Fairbrother, (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**: 299-316.
- Dietzman, D. E., G. W. Fischer & F. D. Schoenknecht, (1974) Neonatal *Escherichia coli* septicemia--bacterial counts in blood. *J Pediatr* **85**: 128-130.
- Dobrindt, U., (2005) (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**: 357-371.
- Downie, J. A., (1989) The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by *lacA* and *cysE*. *Mol Microbiol* **3**: 1649-1651.
- Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard & E. Denamur, (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**: 1671-1676.

- Edgar, R. C., (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 113.
- Elhanan, G., R. Raz, S. D. Pitlik, R. Sharir, H. Konisberger, Z. Samra, Y. Kennes, M. Drucker & L. Leibovici, (1995) Bacteraemia in a community and a university hospital. *J Antimicrob Chemother* **36**: 681-695.
- Enright, M. C. & B. G. Spratt, (1998) A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144** ( Pt 11): 3049-3060.
- Enright, M. C. & B. G. Spratt, (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**: 482-487.
- Escherich, T., (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr Med* **3**: 515-522.
- Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp & L. H. Wieler, (2009) Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol* **75**: 184-192.
- Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp & L. H. Wieler, (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* **104**: 91-101.
- Ewers, C., T. Janssen & L. H. Wieler, (2003) [Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **116**: 381-395.
- Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laturnus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp & L. H. Wieler, (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* **297**: 163-176.
- Eykyn, S. J., W. R. Gransden & I. Phillips, (1990) The causative organisms of septicaemia and their epidemiology. *J Antimicrob Chemother* **25 Suppl C**: 41-58.
- Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman & S. Suerbaum, (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**: 1582-1585.
- Fattom, A. I., J. Sarwar, L. Basham, S. Ennifar & R. Naso, (1998) Antigenic determinants of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines. *Infect Immun* **66**: 4588-4592.
- Foxman, B., S. D. Manning, P. Tallman, R. Bauer, L. Zhang, J. S. Koopman, B. Gillespie, J. D. Sobel & C. F. Marrs, (2002) Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. *Am J Epidemiol* **156**: 1133-1140.
- Franklin, M. J. & D. E. Ohman, (1993) Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *J Bacteriol* **175**: 5057-5065.
- Frasa, H., J. Procee, R. Torensma, A. Verbruggen, A. Algra, M. Rozenberg-Arska, K. Kraaijeveld & J. Verhoef, (1993) *Escherichia coli* in bacteremia: O-acetylated K1 strains appear to be more virulent than non-O-acetylated K1 strains. *J Clin Microbiol* **31**: 3174-3178.
- Frosch, M., I. Gorgen, G. J. Boulnois, K. N. Timmis & D. Bitter-Suermann, (1985) NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1194-1198.
- Fusco, P. C., E. K. Farley, C. H. Huang, S. Moore & F. Michon, (2007) Protective meningococcal capsular polysaccharide epitopes and the role of O acetylation. *Clin Vaccine Immunol* **14**: 577-584.

- Garegg, P. J., B. Lindberg, T. Onn & I. W. Sutherland, (1971) Comparative structural studies on the M-antigen from *Salmonella typhimurium*. *Escherichia coli* and *Aerobacter cloacae*. *Acta Chem Scand* **25**: 2103-2108.
- Gemski, P., Jr., D. E. Koeltzow & S. B. Formal, (1975) Phage conversion of *Shigella flexneri* group antigens. *Infect Immun* **11**: 685-691.
- Gibson, D. L., A. P. White, S. D. Snyder, S. Martin, C. Heiss, P. Azadi, M. Surette & W. W. Kay, (2006) *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol* **188**: 7722-7730.
- Glode, M. P., A. Sutton, E. R. Moxon & J. B. Robbins, (1977) Pathogenesis of neonatal *Escherichia coli* meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed *E. coli* K1. *Infect Immun* **16**: 75-80.
- Goebel, W. F., (1963) Colanic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**: 464-471.
- Goldmann, D. A., (1981) Bacterial colonization and infection in the neonate. *Am J Med* **70**: 417-422.
- Gottesman, S. & V. Stout, (1991) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **5**: 1599-1606.
- Gransden, W. R., S. J. Eykyn, I. Phillips & B. Rowe, (1990) Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. *Rev Infect Dis* **12**: 1008-1018.
- Grant, W. D., I. W. Sutherland & J. F. Wilkinson, (1969) Exopolysaccharide colanic acid and its occurrence in the Enterobacteriaceae. *J Bacteriol* **100**: 1187-1193.
- Gudlavalleti, S. K., A. K. Datta, Y. L. Tzeng, C. Noble, R. W. Carlson & D. S. Stephens, (2004) The *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide O-3 and O-4 acetyltransferase. *J Biol Chem* **279**: 42765-42773.
- Gunzer, F., U. Bohn, S. Fuchs, I. Muhldorfer, J. Hacker, S. Tzipori & A. Donohue-Rolfe, (1998) Construction and characterization of an isogenic *slt-ii* deletion mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**: 2337-2341.
- Hacker, J. & G. Blum-Oehler, (2007) In appreciation of Theodor Escherich. *Nature* **5**: 902.
- Hall-Stoodley, L. & P. Stoodley, (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**: 1034-1043.
- Hallenbeck, P. C., E. R. Vimr, F. Yu, B. Bassler & F. A. Troy, (1987) Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. *J Biol Chem* **262**: 3553-3561.
- Hancock, V., L. Ferrieres & P. Klemm, (2007) Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 30-37.
- Hartl, D. L. & D. E. Dykhuizen, (1984) The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **18**: 31-68.
- Herold, S., H. Karch & H. Schmidt, (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol* **294**: 115-121.
- Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye & T. S. Whittam, (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 6175-6181.
- Higa, H. H. & A. Varki, (1988) Acetyl-coenzyme A:polysialic acid O-acetyltransferase from K1-positive *Escherichia coli*. The enzyme responsible for the O-acetyl plus phenotype and for O-acetyl form variation. *J Biol Chem* **263**: 8872-8878.
- Hochhut, B., C. Wilde, G. Balling, B. Middendorf, U. Dobrindt, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, E. Carniel & J. Hacker, (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* **61**: 584-595.



- Houdouin, V., S. Bonacorsi, N. Brahimi, O. Clermont, X. Nassif & E. Bingen, (2002) A uropathogenicity island contributes to the pathogenicity of *Escherichia coli* strains that cause neonatal meningitis. *Infect Immun* **70**: 5865-5869.
- Hughes, C., R. Phillips & A. P. Roberts, (1982) Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect Immun* **35**: 270-275.
- Hunter, P. R. & M. A. Gaston, (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**: 2465-2466.
- Huson, D. H. & D. Bryant, (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**: 254-267.
- Jarvis, G. A. & N. A. Vedros, (1987) Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infect Immun* **55**: 174-180.
- Jenkins, J. & R. Pickersgill, (2001) The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol* **77**: 111-175.
- Jennings, H. J., A. K. Bhattacharjee, D. R. Bundle, C. P. Kenny, A. Martin & I. C. Smith, (1977) Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Infect Dis* **136 Suppl**: S78-83.
- Johnson, J. R., (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**: 80-128.
- Johnson, J. R., J. J. Brown, U. B. Carlino & T. A. Russo, (1998) Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. *J Infect Dis* **177**: 1120-1124.
- Johnson, J. R. & P. Delavari, (2002) Concurrent fecal colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a homosexual man with recurrent urinary tract infection and in his male sex partner. *Clin Infect Dis* **35**: E65-68.
- Johnson, J. R., T. T. O'Bryan, P. Delavari, M. Kuskowski, A. Stapleton, U. Carlino & T. A. Russo, (2001) Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J Infect Dis* **183**: 1508-1517.
- Johnson, J. R., E. Oswald, T. T. O'Bryan, M. A. Kuskowski & L. Spanjaard, (2002) Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* **185**: 774-784.
- Johnson, J. R., K. L. Owens, C. R. Clabots, S. J. Weissman & S. B. Cannon, (2006a) Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis. *Microbes Infect* **8**: 1702-1713.
- Johnson, J. R. & T. A. Russo, (2005) Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**: 383-404.
- Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M. Lynne, J. R. Johnson & L. K. Nolan, (2007) The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**: 3228-3236.
- Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson & L. K. Nolan, (2006b) DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **188**: 745-758.
- Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, K. S. Kim, L. Spanjaard & L. K. Nolan, (2008) Comparison of extraintestinal pathogenic

- Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7043-7050.
- Jolley, K. A., M. S. Chan & M. C. Maiden, (2004) mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**: 86.
- Jolley, K. A., E. J. Feil, M. S. Chan & M. C. Maiden, (2001) Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* **17**: 1230-1231.
- Jolley, K. A., J. Kalmusova, E. J. Feil, S. Gupta, M. Musilek, P. Kriz & M. C. Maiden, (2000) Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* **38**: 4492-4498.
- Joseph, L. A. & A. C. Wright, (2004) Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 889-893.
- Jung, S. Y., A. Matin, K. S. Kim & N. A. Khan, (2007) The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int J Parasitol* **37**: 417-423.
- Kahl, B. C., A. Mellmann, S. Deiwick, G. Peters & D. Harmsen, (2005) Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**: 502-505.
- Kahrs, A. F., S. Odenbreit, W. Schmitt, D. Heuermann, T. F. Meyer & R. Haas, (1995) An improved TnMax mini-transposon system suitable for sequencing, shuttle mutagenesis and gene fusions. *Gene* **167**: 53-57.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro & H. L. Mobley, (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kariyawasam, S., J. A. Scaccianoce & L. K. Nolan, (2007) Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiol* **7**: 81.
- Kasper, D. L., J. L. Winkelhake, W. D. Zollinger, B. L. Brandt & M. S. Artenstein, (1973) Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* 07: K1(L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* **110**: 262-268.
- Kim, K. J., S. J. Elliott, F. Di Cello, M. F. Stins & K. S. Kim, (2003) The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **5**: 245-252.
- Kim, K. S., (2001) *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect Immun* **69**: 5217-5222.
- Kim, K. S., H. Itabashi, P. Gemski, J. Sadoff, R. L. Warren & A. S. Cross, (1992) The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J Clin Invest* **90**: 897-905.
- King, M. R., S. M. Steenbergen & E. R. Vimr, (2007a) Going for baroque at the *Escherichia coli* K1 cell surface. *Trends Microbiol* **15**: 196-202.
- King, M. R., R. P. Vimr, S. M. Steenbergen, L. Spanjaard, G. Plunkett, 3rd, F. R. Blattner & E. R. Vimr, (2007b) *Escherichia coli* K1-specific bacteriophage CUS-3 distribution and function in phase-variable capsular polysialic acid O acetylation. *J Bacteriol* **189**: 6447-6456.
- Korhonen, T. K., M. V. Valtonen, J. Parkkinen, V. Vaisanen-Rhen, J. Finne, F. Orskov, I. Orskov, S. B. Svenson & P. H. Makela, (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**: 486-491.
- Kroncke, K. D., J. R. Golecki & K. Jann, (1990) Further electron microscopic studies on the expression of *Escherichia coli* group II capsules. *J Bacteriol* **172**: 3469-3472.
- Kundig, J. D., D. Aminoff & S. Roseman, (1971) The sialic acids. XII. Synthesis of colominic acid by a sialyltransferase from *Escherichia coli* K-235. *J Biol Chem* **246**: 2543-2550.

- La Ragione, R. M., A. Best, K. Sprigings, E. Liebana, G. R. Woodward, A. R. Sayers & M. J. Woodward, (2005) Variable and strain dependent colonisation of chickens by *Escherichia coli* O157. *Vet Microbiol* **107**: 103-113.
- Lacher, D. W., H. Steinsland, T. E. Blank, M. S. Donnenberg & T. S. Whittam, (2007) Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol* **189**: 342-350.
- Lappann, M., J. A. Haagensen, H. Claus, U. Vogel & S. Molin, (2006) Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Mol Microbiol* **62**: 1292-1309.
- Leflon-Guibout, V., J. Blanco, K. Amaqdouf, A. Mora, L. Guize & M. H. Nicolas-Chanoine, (2008) Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol* **46**: 3900-3905.
- Lemercinier, X. & C. Jones, (1996) Full 1H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr Res* **296**: 83-96.
- Levinson, G. & G. A. Gutman, (1987) High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **15**: 5323-5338.
- Lewis, A. L., V. Nizet & A. Varki, (2004) Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11123-11128.
- Leying, H., S. Suerbaum, H. P. Kroll, D. Stahl & W. Opferkuch, (1990) The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **58**: 222-227.
- Li, G., C. LTURNUS, C. Ewers & L. H. Wieler, (2005) Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **73**: 2818-2827.
- Lifely, M. R., A. S. Gilbert & C. Moreno, (1981) Sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*: esterification between adjacent residues. *Carbohydr Res* **94**: 193-203.
- Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum & M. Achtman, (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**: 915-918.
- Liu, T. Y., E. C. Gotschlich, F. T. Dunne & E. K. Jonssen, (1971) Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharide. *J Biol Chem* **246**: 4703-4712.
- Long, S. S. & R. M. Swenson, (1977) Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr* **91**: 298-301.
- Maiden, M. C., (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 561-588.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman & B. G. Spratt, (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-3145.
- Martindale, J., D. Stroud, E. R. Moxon & C. M. Tang, (2000) Genetic analysis of *Escherichia coli* K1 gastrointestinal colonization. *Mol Microbiol* **37**: 1293-1305.
- McBean, M. & S. Rajamani, (2001) Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986-1997. *J Infect Dis* **183**: 596-603.

- McCracken, G. H., Jr., L. D. Sarff, M. P. Glode, S. G. Mize, M. S. Schiffer, J. B. Robbins, E. C. Gotschlich, I. Orskov & F. Orskov, (1974) Relation between *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide antigen and clinical outcome in neonatal meningitis. *Lancet* **2**: 246-250.
- McNulty, C., J. Thompson, B. Barrett, L. Lord, C. Andersen & I. S. Roberts, (2006) The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell. *Mol Microbiol* **59**: 907-922.
- McPeake, S. J., J. A. Smyth & H. J. Ball, (2005) Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Microbiol* **110**: 245-253.
- Meier, C., T. A. Oelschlaeger, H. Merkert, T. K. Korhonen & J. Hacker, (1996) Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun* **64**: 2391-2399.
- Melin, M., H. Jarva, L. Siira, S. Meri, H. Kayhty & M. Vakevainen, (2009) *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype 19F is more resistant to C3 deposition and less sensitive to opsonophagocytosis than serotype 6B. *Infect Immun* **77**: 676-684.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels & J. M. Fairbrother, (2003a) Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**: 536-540.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux & J. M. Fairbrother, (2003b) Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**: 494-503.
- Merker, R. I. & F. A. Troy, (1990) Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. Cold inactivation of sialic acid synthase regulates capsule expression below 20 degrees C. *Glycobiology* **1**: 93-100.
- Mora, A., C. Lopez, G. Dabhi, M. Blanco, J. E. Blanco, M. P. Alonso, A. Herrera, R. Mamani, S. Bonacorsi, M. Moulin-Schouleur & J. Blanco, (2009) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol* **9**: 132.
- Moreno, C., M. R. Lively & J. Esdaile, (1985) Immunity and protection of mice against *Neisseria meningitidis* group B by vaccination, using polysaccharide complexed with outer membrane proteins: a comparison with purified B polysaccharide. *Infect Immun* **47**: 527-533.
- Moritz, R. L. & R. A. Welch, (2006) The *Escherichia coli* *argW-dsdCXA* genetic island is highly variable, and *E. coli* K1 strains commonly possess two copies of *dsdCXA*. *J Clin Microbiol* **44**: 4038-4048.
- Morris, N. S., D. J. Stickler & R. J. McLean, (1999) The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World J Urol* **17**: 345-350.
- Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, S. Laurent, A. Bree, S. Mignon-Grasteau, P. Germon, D. Rasschaert & C. Schouler, (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* **45**: 3366-3376.
- Moulin-Schouleur, M., C. Schouler, P. Tailliez, M. R. Kao, A. Bree, P. Germon, E. Oswald, J. Mainil, M. Blanco & J. Blanco, (2006) Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol* **44**: 3484-3492.
- Mühlenhoff, M., M. Eckhardt & R. Gerardy-Schahn, (1998) Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 558-564.

- Mulder, C. J., L. van Alphen & H. C. Zanen, (1984) Neonatal meningitis caused by *Escherichia coli* in The Netherlands. *J Infect Dis* **150**: 935-940.
- Nataro, J. P. & J. B. Kaper, (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Nemoy, L. L., M. Kotetishvili, J. Tigno, A. Keefer-Norris, A. D. Harris, E. N. Perencevich, J. A. Johnson, D. Torpey, A. Sulakvelidze, J. G. Morris, Jr. & O. C. Stine, (2005) Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **43**: 1776-1781.
- Ngeleka, M., J. K. Kwaga, D. G. White, T. S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A. A. Potter & B. Allan, (1996) *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun* **64**: 3118-3126.
- Nicolas-Chanoine, M. H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Canica, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout & J. R. Johnson, (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**: 273-281.
- Nivens, D. E., D. E. Ohman, J. Williams & M. J. Franklin, (2001) Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* **183**: 1047-1057.
- Noller, A. C., M. C. McEllistrem, O. C. Stine, J. G. Morris, Jr., D. J. Boxrud, B. Dixon & L. H. Harrison, (2003) Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **41**: 675-679.
- O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith & S. B. Formal, (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**: 694-696.
- O'Toole, G. A. & R. Kolter, (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- Obadia, B., S. Lacour, P. Doublet, H. Baubichon-Cortay, A. J. Cozzone & C. Grangeasse, (2007) Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *J Mol Biol* **367**: 42-53.
- Ochman, H. & R. K. Selander, (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**: 690-693.
- Ophir, T. & D. L. Gutnick, (1994) A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation. *Appl Environ Microbiol* **60**: 740-745.
- Orskov, F., I. Orskov, A. Sutton, R. Schneerson, W. Lin, W. Egan, G. E. Hoff & J. B. Robbins, (1979) Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med* **149**: 669-685.
- Orskov, F., V. Sharma & I. Orskov, (1984) Influence of growth temperature on the development of *Escherichia coli* polysaccharide K antigens. *J Gen Microbiol* **130**: 2681-2684.
- Orskov, I., F. Orskov, B. Jann & K. Jann, (1977) Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **41**: 667-710.
- Ott, M., L. Bender, G. Blum, M. Schmittroth, M. Achtman, H. Tschape & J. Hacker, (1991) Virulence patterns and long-range genetic mapping of extraintestinal *Escherichia coli* K1, K5, and K100 isolates: use of pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Immun* **59**: 2664-2672.
- Parreira, V. R., C. W. Arns & T. Yano, (1998) Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Pathol* **27**: 148-154.

- Parreira, V. R. & C. L. Gyles, (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* **71**: 5087-5096.
- Pelkonen, S., J. Pelkonen & J. Finne, (1989) Common cleavage pattern of polysialic acid by bacteriophage endosialidases of different properties and origins. *J Virol* **63**: 4409-4416.
- Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion & E. Denamur, (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* **67**: 546-553.
- Pier, G. B., F. Coleman, M. Grout, M. Franklin & D. E. Ohman, (2001) Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* **69**: 1895-1901.
- Pitt, J., (1978) K-1 antigen of *Escherichia coli*: epidemiology and serum sensitivity of pathogenic strains. *Infect Immun* **22**: 219-224.
- Pitt, J., (1979) Virulence of *Escherichia coli* K1 in adults. *J Infect Dis* **139**: 106-108.
- Pluschke, G. & M. Achtman, (1984) Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 *Escherichia coli* differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns. *Infect Immun* **43**: 684-692.
- Pluschke, G., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl & M. Achtman, (1983) Induction of bacteremia in newborn rats by *Escherichia coli* K1 is correlated with only certain O (lipopolysaccharide) antigen types. *Infect Immun* **39**: 599-608.
- Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, C. M. Dozois, C. Desautels & J. M. Fairbrother, (1997a) Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis* **41**: 221-233.
- Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize & J. M. Fairbrother, (1997b) Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* **58**: 195-213.
- Prasadarao, N. V., C. A. Wass, M. F. Stins, H. Shimada & K. S. Kim, (1999) Outer membrane protein A-promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for *Escherichia coli* invasion. *Infect Immun* **67**: 5775-5783.
- Priest, F. G., M. Barker, L. W. Baillie, E. C. Holmes & M. C. Maiden, (2004) Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **186**: 7959-7970.
- Reid, S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander & T. S. Whittam, (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-67.
- Renders, N., L. Licciardello, I. J. C. M. Sijmons, L. van Alphen, H. Verbrugh & A. van Belkum, (1999) Variable numbers of tandem repeat loci in genetically homogeneous *Haemophilus influenzae* strains alter during persistent colonisation of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* **173**: 95-102.
- Reyrat, J. M., V. Pelicic, B. Gicquel & R. Rappuoli, (1998) Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun* **66**: 4011-4017.
- Roberson, E. B. & M. K. Firestone, (1992) Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1284-1291.
- Robins-Browne, R. M. & E. L. Hartland, (2002) *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* **17**: 467-475.
- Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, M. K. Fakhr & L. K. Nolan, (2005a) Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**: 2097-2110.
- Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson & L. K. Nolan, (2005b) Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* **36**: 241-256.

- Rosen, D. A., T. M. Hooton, W. E. Stamm, P. A. Humphrey & S. J. Hultgren, (2007) Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* **4**: e329.
- Rowe, S., N. Hodson, G. Griffiths & I. S. Roberts, (2000) Regulation of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster: evidence for the roles of H-NS, BipA, and integration host factor in regulation of group 2 capsule gene clusters in pathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* **182**: 2741-2745.
- Rudd, K. E., (1999) Novel intergenic repeats of *Escherichia coli* K-12. *Res Microbiol* **150**: 653-664.
- Russo, T. A. & J. R. Johnson, (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* **5**: 449-456.
- Russo, T. A., A. Stapleton, S. Wenderoth, T. M. Hooton & W. E. Stamm, (1995) Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis* **172**: 440-445.
- Sader, H. S., R. N. Jones, S. Andrade-Baiocchi & D. J. Biedenbach, (2002) Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* **44**: 273-280.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sarff, L. D., G. H. McCracken, M. S. Schiffer, M. P. Glode, J. B. Robbins, I. Orskov & F. Orskov, (1975) Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. *Lancet* **1**: 1099-1104.
- Schembri, M. A., D. Dalsgaard & P. Klemm, (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol* **186**: 1249-1257.
- Schnider-Keel, U., K. B. Lejbolle, E. Baehler, D. Haas & C. Keel, (2001) The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5683-5693.
- Scholl, D., S. Adhya & C. Merrill, (2005) *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4872-4874.
- Sheppard, S. K., N. D. McCarthy, D. Falush & M. C. Maiden, (2008) Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Science* **320**: 237-239.
- Silver, R. P., W. Aaronson, A. Sutton & R. Schneerson, (1980) Comparative analysis of plasmids and some metabolic characteristics of *Escherichia coli* K1 from diseased and healthy individuals. *Infect Immun* **29**: 200-206.
- Silver, R. P., C. W. Finn, W. F. Vann, W. Aaronson, R. Schneerson, P. J. Kretschmer & C. F. Garon, (1981) Molecular cloning of the K1 capsular polysaccharide genes of *E. coli*. *Nature* **289**: 696-698.
- Simpson, D. A., T. C. Hammarton & I. S. Roberts, (1996) Transcriptional organization and regulation of expression of region 1 of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster. *J Bacteriol* **178**: 6466-6474.
- Sitkiewicz, I., M. J. Nagiec, P. Sumby, S. D. Butler, C. Cywes-Bentley & J. M. Musser, (2006) Emergence of a bacterial clone with enhanced virulence by acquisition of a phage encoding a secreted phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16009-16014.
- Skjåk-Bræk, G., F. Zanetti & S. Paoletti, (1989) Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydrate Research* **185**: 131-138.

- Smith, J. M., N. H. Smith, M. O'Rourke & B. G. Spratt, (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4384-4388.
- Srivastava, A. & R. R. Isberg, (2002) Measurement of Bacterial Uptake by Cultured Cells. In: *Methods in Microbiology*. P. J. Sansonetti & A. Zychlinsky (eds). Academic Press, pp. 179-206.
- Steenbergen, S. M., Y. C. Lee, W. F. Vann, J. Vionnet, L. F. Wright & E. R. Vimr, (2006) Separate pathways for O acetylation of polymeric and monomeric sialic acids and identification of sialyl O-acetyl esterase in *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* **188**: 6195-6206.
- Steenbergen, S. M. & E. R. Vimr, (1990) Mechanism of polysialic acid chain elongation in *Escherichia coli* K1. *Mol Microbiol* **4**: 603-611.
- Steenbergen, S. M. & E. R. Vimr, (2008) Biosynthesis of the *Escherichia coli* K1 group 2 polysialic acid capsule occurs within a protected cytoplasmic compartment. *Mol Microbiol* **68**: 1252-1267.
- Steenbergen, S. M., T. J. Wrona & E. R. Vimr, (1992) Functional analysis of the sialyltransferase complexes in *Escherichia coli* K1 and K92. *J Bacteriol* **174**: 1099-1108.
- Stenutz, R., A. Weintraub & G. Widmalm, (2006) The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 382-403.
- Stevens, P., C. L. Chu & L. S. Young, (1980) K-1 antigen content and the presence of an additional sialic acid-containing antigen among bacteremic K-1 *Escherichia coli*: correlation with susceptibility to opsonophagocytosis. *Infect Immun* **29**: 1055-1061.
- Stins, M. F., J. Badger & K. Sik Kim, (2001) Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* **30**: 19-28.
- Stins, M. F., F. Gilles & K. S. Kim, (1997) Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* **76**: 81-90.
- Stummeyer, K., D. Schwarzer, H. Claus, U. Vogel, R. Gerardy-Schahn & M. Mühlenhoff, (2006) Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Mol Microbiol* **60**: 1123-1135.
- Sutherland, I. W., (1969) Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the enterobacteriaceae, by partial acid hydrolysis. Oligosaccharides from colanic acid. *Biochem J* **115**: 935-945.
- Tamaru, Y., Y. Takani, T. Yoshida & T. Sakamoto, (2005) Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7327-7333.
- Tartof, S. Y., O. D. Solberg, A. R. Manges & L. W. Riley, (2005) Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **43**: 5860-5864.
- Tomlinson, S. & P. W. Taylor, (1985) Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide. *J Virol* **55**: 374-378.
- Turner, S. M., R. R. Chaudhuri, Z. D. Jiang, H. DuPont, C. Gyles, C. W. Penn, M. J. Pallen & I. R. Henderson, (2006) Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol* **44**: 4528-4536.
- Unhanand, M., M. M. Mustafa, G. H. McCracken, Jr. & J. D. Nelson, (1993) Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. *J Pediatr* **122**: 15-21.
- Unkmeir, A., U. Kammerer, A. Stade, C. Hubner, S. Haller, A. Kolb-Maurer, M. Frosch & G. Dietrich, (2002) Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* **70**: 2454-2462.



- Urwin, R. & M. C. Maiden, (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**: 479-487.
- Vaara, M., (1992) Eight bacterial proteins, including UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase (LpxA) and three other transferases of *Escherichia coli*, consist of a six-residue periodicity theme. *FEMS Microbiol Lett* **76**: 249-254.
- Valle, J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert & J. M. Ghigo, (2006) Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12558-12563.
- van Belkum, A., S. Scherer, L. van Alphen & H. Verbrugh, (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 275-293.
- Van Dijk, W. C., H. A. Verbrugh, R. Peters, M. E. Van Der Tol, P. K. Peterson & J. Verhoef, (1979a) *Escherichia coli* K antigen in relation to serum-induced lysis and phagocytosis. *J Med Microbiol* **12**: 123-130.
- Van Dijk, W. C., H. A. Verbrugh, M. E. van der Tol, R. Peters & J. Verhoef, (1979b) Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infect Immun* **25**: 603-609.
- Vazquez, A., S. Moreno, J. Guzman, A. Alvarado & G. Espin, (1999) Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* algGXLVIFA genes: characterization of algF mutants. *Gene* **232**: 217-222.
- Vermeulen, C., A. Cross, W. R. Byrne & W. Zollinger, (1988) Quantitative relationship between capsular content and killing of K1-encapsulated *Escherichia coli*. *Infect Immun* **56**: 2723-2730.
- Vimr, E. R. & S. M. Steenbergen, (2006) Mobile contingency locus controlling *Escherichia coli* K1 polysialic acid capsule acetylation. *Mol Microbiol* **60**: 828-837.
- Vimr, E. R. & S. M. Steenbergen, (2009) Early molecular-recognition events in the synthesis and export of group 2 capsular polysaccharides. *Microbiology* **155**: 9-15.
- Vogel, U., A. Weinberger, R. Frank, A. Muller, J. Kohl, J. P. Atkinson & M. Frosch, (1997) Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **65**: 4022-4029.
- Weinstein, R. & L. S. Young, (1978) Phagocytic resistance of *Escherichia coli* K-1 isolates and relationship to virulence. *J Clin Microbiol* **8**: 748-755.
- Weissman, S. J., S. Chattopadhyay, P. Aprikian, M. Obata-Yasuoka, Y. Yarova-Yarovaya, A. Stapleton, W. Ba-Thein, D. Dykhuizen, J. R. Johnson & E. V. Sokurenko, (2006) Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**: 975-988.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg & F. R. Blattner, (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 17020-17024.
- Whitfield, C., (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* **75**: 39-68.
- Whitfield, C. & I. S. Roberts, (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1307-1319.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman & M. Achtman, (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**: 1136-1151.
- Wolberg, G. & C. W. DeWitt, (1969) Mouse virulence of K(L) antigen-containing strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **100**: 730-737.

- Wollin, R., B. A. Stocker & A. A. Lindberg, (1987) Lysogenic conversion of *Salmonella typhimurium* bacteriophages A3 and A4 consists of O-acetylation of rhamnose of the repeating unit of the O-antigenic polysaccharide chain. *J Bacteriol* **169**: 1003-1009.
- Wood, T. K., A. F. Gonzalez Barrios, M. Herzberg & J. Lee, (2006) Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 361-367.
- Wullenweber, M., L. Beutin, S. Zimmermann & C. Jonas, (1993) Influence of some bacterial and host factors on colonization and invasiveness of *Escherichia coli* K1 in neonatal rats. *Infect Immun* **61**: 2138-2144.
- Wyle, F. A., M. S. Artenstein, B. L. Brandt, E. C. Tramont, D. L. Kasper, P. L. Altieri, S. L. Berman & J. P. Lowenthal, (1972) Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. *J Infect Dis* **126**: 514-521.
- Xie, Y., V. Kolisnychenko, M. Paul-Satyaseela, S. Elliott, G. Parthasarathy, Y. Yao, G. Plunkett, 3rd, F. R. Blattner & K. S. Kim, (2006) Identification and characterization of *Escherichia coli* RS218-derived islands in the pathogenesis of *E. coli* meningitis. *J Infect Dis* **194**: 358-364.
- Yazdankhah, S. P., P. Kriz, G. Tzanakaki, J. Kremastinou, J. Kalmusova, M. Musilek, T. Alvestad, K. A. Jolley, D. J. Wilson, N. D. McCarthy, D. A. Caugant & M. C. Maiden, (2004) Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol* **42**: 5146-5153.
- Yeh, J. Y. & J. Chen, (2004) Production of slime polysaccharide by EHEC and STEC as well as the influence of culture conditions on slime production in *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* **38**: 488-492.
- Yildiz, F. H. & G. K. Schoolnik, (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4028-4033.
- Yumuk, Z., G. Afacan, M. H. Nicolas-Chanoine, A. Sotto & J. P. Lavigne, (2008) Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **62**: 284-288.
- Zelmer, A., M. Bowen, A. Jokilampi, J. Finne, J. P. Luzio & P. W. Taylor, (2008) Differential expression of the polysialyl capsule during blood-to-brain transit of neuropathogenic *Escherichia coli* K1. *Microbiology* **154**: 2522-2532.
- Zhang, Y. & Y. C. Lee, (1999) Acid-catalyzed lactonization of alpha2,8-linked oligo/polysialic acids studied by high performance anion-exchange chromatography. *J Biol Chem* **274**: 6183-6189.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP- <i>binding-cassette</i> -Transporter
Acc. Nr.	Accession number (EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank)
ad	auffüllen bis
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APEC	aviär pathogene <i>E. coli</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>att-Site</i>	<i>Attachment-Site</i>
BHI-Medium	<i>brain heart infusion</i> -Medium
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CFU	<i>colony forming units</i> , koloniebildende Einheiten
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CM	Chloramphenicol
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CUS-3_GT	CUS-3-Genotyp
d	Tag(e)
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECV	<i>E. coli</i> K1 <i>containing vacuole</i> , <i>E. coli</i> K1-enthaltende Vakuole
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ExPEC	extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i>
g	Gramm
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt
h	Stunde
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cells</i> , humane mikrovaskuläre Gehirndothelzellen
HTK	Hühnertrockenkot
HWI	Harnwegsinfekt
IE	invasive Erkrankungen

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IS	Insertionselement
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
l	Liter
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	mikromolar
M	molar (mol/l)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MenB	Serogruppe B-Meningokokken
mg	Milligramm
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
MLEE	<i>multilocus enzyme electrophoresis</i> , Multilokus-Enzymelektrophorese
MLST	<i>multilocus sequence typing</i> , Multilokus-Sequenztypisierung
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMEC	neonatale Meningitis-assoziierte <i>E. coli</i>
$\Omega$	Ohm
oac <sup>-</sup>	nicht-O-acetyliert
oac <sup>+</sup>	O-acetyliert
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannt
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
POX	Meerrettich-Peroxidase
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
SEPEC	Sepsis-assoziierte <i>E. coli</i>
SF	<i>subtractive fragment</i> , Genomfragment
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
ST	<i>sequence type</i> , Sequenztyp
START	<i>Sequence Type Analysis and Recombinational Tests</i>

---

STC	<i>sequence type complex</i> , Sequenztyp/ST-Komplex
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> , Masse/Volumen

## 8.2. Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### Originalarbeiten

**Ines L. Mordhorst**, Heike Claus, Christa Ewers, Martin Lappann, Christoph Schoen, Johannes Elias, Julia Batzilla, Ulrich Dobrindt, Lothar H. Wieler, Anne K. Bergfeld, Martina Mühlenhoff, and Ulrich Vogel (2009) O-acetyltransferase gene *neuO* is segregated according to phylogenetic background and contributes to environmental desiccation resistance in *Escherichia coli* K1. *Environ Microbiol* **11**: 3154-3165.

### Kongreßbeiträge

#### Vorträge

**Ines L. Mordhorst**, Julia Batzilla, Martina Mühlenhoff, Lothar Wieler, Christa Ewers, Heike Claus, Ulrich Vogel. 2008. Studies on the phylogeny of *Escherichia coli* K1 strains from human and avian sources and on the role of the phase variable *neuO* gene for environmental survival. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Dresden. 21.-24. September 2008.

**Ines L. Mordhorst**, Julia Batzilla, Martina Mühlenhoff, Lothar Wieler, Christa Ewers, Heike Claus, Ulrich Vogel. Phylogeny of human and avian *E. coli* K1 strains and the role of the capsule O-acetyltransferase NeuO on the environmental survival of the bacterium. 4. Studententreffen der Network of Excellence EuroPathoGenomics-Graduiertenschule. Palma de Mallorca, Spanien. 27.-29. April 2009.

#### Poster

**Ines L. Mordhorst**, Julia Pagels, Martina Mühlenhoff, Lothar Wieler, Christa Ewers, Ulrich Vogel, Heike Claus. 2006. Population biology of capsule O-acetylation in *Escherichia coli* K1. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Würzburg. 1.-4. Oktober 2006.

**Ines L. Mordhorst**, Julia Batzilla, Martina Mühlenhoff, Lothar Wieler, Ulrich Vogel, Heike Claus. 2007. Distribution of *neuO* and CUS-3 among clonal complexes of *E. coli* K1. Young Investigator Meeting ZIBI Berlin/ZINF Würzburg. Würzburg. 2.-3. März 2007.

**Ines L. Mordhorst**, Julia Batzilla, Martina Mühlenhoff, Lothar Wieler, Ulrich Vogel, Heike Claus. 2007. Distribution of the capsule O-acetyltransferase gene *neuO* among clonal lineages of *Escherichia coli* K1. 3. PolySia-Tagung. Bad Lauterberg, Harz. 10.-13. März 2007.

**Ines L. Mordhorst**, Julia Batzilla, Martina Mühlenhoff, Heike Claus, Ulrich Vogel. Distribution of the bacteriophage CUS-3 encoded capsular acetyltransferase *neuO* in a multilocus sequence typed *Escherichia coli* K1 population. EMBO-FEMS-LEOPOLDINA Symposium "Escherichia coli 2007". Kloster Banz, Bad Staffelstein. 9.-12. Oktober 2007.

#### 8.4. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Vogel herzlich für die Vergabe dieser Doktorarbeit und für die tollen Arbeitsbedingungen, die ich in der Arbeitsgruppe vorfinden durfte. Vielen Dank für die stetige Unterstützung, auf die ich mich im Verlauf der Arbeit immer verlassen konnte.

Frau PD Dr. Heike Claus danke ich herzlich für ihre Bereitschaft, mich stets an ihrem umfassenden Wissen über Stammmnummern, Sequenzauswertungen und Klonierungsstrategien teilhaben zu lassen sowie für die nicht ermüdende Bereitschaft, bereitwillig Auskunft und Hilfestellungen zu geben.

Herrn Prof. Dr. Joachim Morschhäuser möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch danke ich für die Möglichkeit, am IHM Würzburg promovieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Mark Achtman, Herrn PD Dr. Lothar Beutin, Herrn PD Dr. Ulrich Dobrindt, Frau Dr. Christa Ewers und Herrn Prof. Dr. Lothar Wieler danke ich für die Bereitstellung von *E. coli* K1-Stämmen.

Frau Dr. Christa Ewers und Herrn Prof. Dr. Lothar Wieler danke ich für die Möglichkeit, Tierversuche am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen in Berlin durchführen zu können und dafür, dass ich mich willkommen gefühlt habe.

Frau Dr. Martina Mühlenhoff und Frau Dr. Anne K. Bergfeld danke ich herzlich für die tolle Kooperation und für die Bereitstellung der NeuO-Kinetik-Daten.

Herrn Dr. Johannes Elias danke ich für die Bereitstellung des Programms Konkat-Meister.

Der Anton Knoll GmbH danke ich für die Bereitstellung des Hühnertrockenkots.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Bereitstellung der Mittel (Vo 718/4-1) zur Finanzierung meiner Doktorarbeit.

Dem Network of Excellence „EuroPathoGenomics“ danke ich für die Bereitstellung von Reisemitteln. In diesem Zusammenhang danke ich Gabi Blum-Oehler für die tolle Organisation der Reisen und erinnere mich gerne an unseren gemeinsamen Palma-Aufenthalt!

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Vogel für ein stets angenehmes Arbeitsklima und dafür, dass ich mich in der AG immer sehr wohl gefühlt habe. Julia danke ich für ihre Geduld bei der Einarbeitung in die *E. coli*-Sammlung. Christine und Evelyn werden mir stets in guter Erinnerung bleiben-schade, dass ihr gegangen seid. Johannes und Isabell danke ich dafür, in Würzburg nicht nur eine Doktorarbeit, sondern auch Freunde gefunden zu haben.

Auch bei vielen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des IHM möchte ich mich herzlich für die Unterstützung und schnelle Hilfe in technischen Angelegenheiten und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner gesamten Familie danke ich für die vorbehaltlose Unterstützung, die ich im Verlaufe der vier Würzburger Jahre erfahren habe.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für so unglaublich vieles, vor allem aber für ihr Vertrauen in mich, dass mich schon mein ganzes Leben lang begleitet und mir immer das Gefühl gibt, nicht alleine zu sein. Danke, dass es nie Vorwürfe gab ob der 500 km, die mittlerweile zwischen uns liegen!

Martin, ich weiß nicht, wie ich in Worte fassen soll, was Du für mich getan hast, wie sehr Du mich unterstützt und motiviert hast. Oder wie ich beschreiben könnte, was Du mir bedeutest. Danke für jeden Tag!!!



## 8.5. Tabellen

Tabelle 8-1: *E. coli* (MAC)-Stammsammlung des IHM Würzburg.

<i>E. coli</i> - Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC34	BK	IE	-		19.07.2005
MAC41	BK	IE	-		22.07.2005
MAC65	BK	IE	-		27.07.2005
MAC66	BK	IE	-		27.07.2005
MAC74	BK	IE	-		29.07.2005
MAC89	BK	IE	-		11.08.2005
MAC99	BK	IE	-		16.08.2005
MAC100	BK	IE	-		16.08.2005
MAC113	BK	IE	-		22.08.2005
MAC119	BK	IE	-		24.08.2005
MAC127	BK	IE	-		26.08.2005
MAC128	BK	IE	-		26.08.2005
MAC129	BK	IE	+	δ23	26.08.2005
MAC154	BK	IE	+	δ27	02.09.2005
MAC163	BK	IE	-		07.09.2005
MAC168	BK	IE	+	δ29	08.09.2005
MAC196	BK	IE	-		25.09.2005
MAC223	BK	IE	+	δ39	23.10.2005
MAC329	BK	IE	-		25.11.2005
MAC387	BK	IE	+	δ70	03.01.2006
MAC529	BK	IE	-		22.03.2006
MAC530	BK	IE	-		22.03.2006
MAC549	BK	IE	-		12.04.2006
MAC67	C	unbekannt	-		27.07.2005
MAC68	C	unbekannt	-		27.07.2005
MAC76	C	unbekannt	-		29.07.2005
MAC83	C	unbekannt	-		01.08.2005
MAC84	C	unbekannt	+	δ16	03.08.2005

<i>E. coli</i> - Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC318	C	unbekannt	-		18.11.2005
MAC1	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ1	06.07.2005
MAC2	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC3	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ2	06.07.2005
MAC4	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ3	06.07.2005
MAC5	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC6	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC7	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC8	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC9	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ4	06.07.2005
MAC10	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC11	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ5	06.07.2005
MAC12	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ6	06.07.2005
MAC13	Faeces	TR (M/SS05)	+	δ7	06.07.2005
MAC14	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC15	Faeces	TR (M/SS05)	-		06.07.2005
MAC16	Faeces	TR (MWUE)	-		13.07.2005
MAC17	Faeces	TR (MWUE)	+	δ8	13.07.2005
MAC18	Faeces	TR (MWUE)	-		13.07.2005
MAC19	Faeces	TR (MWUE)	+	δ9	13.07.2005
MAC20	Faeces	TR (MWUE)	-		13.07.2005
MAC24	Faeces	TR (MWUE)	-		14.07.2005
MAC25	Faeces	TR (MWUE)	-		14.07.2005
MAC27	Faeces	TR (MWUE)	+	δ13	15.07.2005
MAC28	Faeces	TR (MWUE)	-		15.07.2005
MAC33	Faeces	TR (MWUE)	-		19.07.2005
MAC85	Faeces	TR (MWUE)	+	δ17	04.08.2005
MAC86	Faeces	TR (MWUE)	-		05.08.2005

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC87	Faeces	TR (MWUE)	-		05.08.2005
MAC88	Faeces	TR (MWUE)	-		08.08.2005
MAC90	Faeces	TR (MWUE)	-		13.08.2005
MAC91	Faeces	TR (MWUE)	-		15.08.2005
MAC106	Faeces	TR (MWUE)	-		18.08.2005
MAC107	Faeces	TR (MWUE)	+	δ18	19.08.2005
MAC122	Faeces	TR (MWUE)	-		25.08.2005
MAC167	Faeces	TR (MWUE)	-		07.09.2005
MAC179	Faeces	TR (MWUE)	-		13.09.2005
MAC182	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC183	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC184	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC185	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC186	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC187	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC188	Faeces	TR (BM/WS05)	+	δ33	16.09.2005
MAC189	Faeces	TR (BM/WS05)	+	δ34	16.09.2005
MAC190	Faeces	TR (BM/WS05)	-		16.09.2005
MAC241	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC242	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC243	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC244	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC245	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC246	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC247	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC248	Faeces	TR (M/WS05)	+	δ43	02.11.2005
MAC249	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC250	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC251	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC252	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC253	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC254	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC255	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC256	Faeces	TR (M/WS05)	+	δ44	02.11.2005
MAC257	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC258	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC259	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC260	Faeces	TR (M/WS05)	+	δ45	02.11.2005
MAC261	Faeces	TR (M/WS05)	+	δ46	02.11.2005
MAC262	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC263	Faeces	TR (M/WS05)	+	δ47	02.11.2005
MAC264	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC265	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC266	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC267	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC268	Faeces	TR (M/WS05)	-		02.11.2005
MAC284	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC285	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC286	Faeces	TR (Ph/WS05)	+	δ48	11.11.2005
MAC287	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC288	Faeces	TR (Ph/WS05)	+	δ49	11.11.2005
MAC289	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC290	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC291	Faeces	TR (Ph/WS05)	+	δ50	11.11.2005
MAC292	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC293	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC294	Faeces	TR (Ph/WS05)	+	δ51	11.11.2005
MAC295	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC296	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC297	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC298	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC299	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC300	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC301	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC302	Faeces	TR (Ph/WS05)	+	δ52	11.11.2005
MAC303	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC304	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		11.11.2005
MAC307	Faeces	TR (Ph/WS05)	-		16.11.2005
MAC308	Faeces	TR (MWUE)	+	δ55	16.11.2005
MAC359	Faeces	TR (MH)	+	δ58	16.12.2005
MAC360	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC361	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC362	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC363	Faeces	TR (MH)	+	δ59	16.12.2005
MAC364	Faeces	TR (MH)	+	δ60	16.12.2005
MAC365	Faeces	TR (MH)	+	δ61	16.12.2005
MAC366	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC367	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC368	Faeces	TR (MH)	+	δ62	16.12.2005
MAC369	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC370	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC371	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC374	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC375	Faeces	TR (MH)	+	δ63	16.12.2005
MAC376	Faeces	TR (MH)	+	δ64	16.12.2005
MAC377	Faeces	TR (MH)	-		16.12.2005
MAC378	Faeces	TR (MH)	+	δ65	16.12.2005
MAC511	Faeces	TR (LC/WS05)	-		16.03.2006
MAC512	Faeces	TR (LC/WS05)	-		16.03.2006
MAC513	Faeces	TR (LC/WS05)	-		16.03.2006
MAC514	Faeces	TR (LC/WS05)	-		16.03.2006
MAC519	Faeces	TR (LC/WS05)	-		17.03.2006
MAC520	Faeces	TR (LC/WS05)	-		17.03.2006
MAC521	Faeces	TR (LC/WS05)	-		17.03.2006
MAC522	Faeces	TR (LC/WS05)	+	δ84	17.03.2006
MAC604	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC605	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC606	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC607	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC608	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ98	29.05.2006
MAC609	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ99	29.05.2006
MAC610	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ100	29.05.2006
MAC611	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ101	29.05.2006
MAC612	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC613	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC614	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ102	29.05.2006
MAC615	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC616	Faeces	TR (M/SS06)	-		29.05.2006
MAC617	Faeces	TR (M/SS06)	-		30.05.2006
MAC618	Faeces	TR (M/SS06)	-		30.05.2006
MAC619	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ103	30.05.2006
MAC620	Faeces	TR (M/SS06)	-		30.05.2006
MAC621	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ104	30.05.2006
MAC622	Faeces	TR (M/SS06)	+	δ105	30.05.2006
MAC623	Faeces	TR (M/SS06)	-		30.05.2006
MAC624	Faeces	TR (M/SS06)	-		30.05.2006
MAC625	Faeces	TR (M/SS06)	-		30.05.2006
MAC629	Faeces	TR (M/SS06)	-		31.05.2006
MAC630	Faeces	TR (M/SS06)	-		31.05.2006
MAC639	Faeces	TR (M/SS06)	-		14.06.2006
MAC21	UR	HWI	+	δ10	14.07.2005
MAC22	UR	HWI	-		14.07.2005
MAC23	UR	HWI	+	δ11	14.07.2005
MAC26	UR	HWI	+	δ12	14.07.2005
MAC29	UR	HWI	-		15.07.2005
MAC30	UR	HWI	-		15.07.2005
MAC31	UR	HWI	-		15.07.2005
MAC32	UR	HWI	-		15.07.2005

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC35	UR	HWI	-		20.07.2005
MAC36	UR	HWI	-		20.07.2005
MAC37	UR	HWI	-		20.07.2005
MAC38	UR	HWI	-		20.07.2005
MAC39	UR	HWI	-		20.07.2005
MAC40	UR	HWI	-		20.07.2005
MAC42	UR	HWI	+	δ14	22.07.2005
MAC43	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC44	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC45	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC46	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC47	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC48	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC49	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC50	UR	HWI	-		22.07.2005
MAC51	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC52	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC53	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC54	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC55	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC56	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC57	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC58	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC59	UR	HWI	-		25.07.2005
MAC60	UR	HWI	-		27.07.2005
MAC61	UR	HWI	-		27.07.2005
MAC62	UR	HWI	-		27.07.2005
MAC63	UR	HWI	-		27.07.2005
MAC64	UR	HWI	-		27.07.2005
MAC69	UR	HWI	-		28.07.2005
MAC70	UR	HWI	-		28.07.2005
MAC71	UR	HWI	-		28.07.2005

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC72	UR	HWI	-		28.07.2005
MAC73	UR	HWI	-		28.07.2005
MAC75	UR	HWI	-		29.07.2005
MAC77	UR	HWI	-		01.08.2005
MAC78	UR	HWI	-		01.08.2005
MAC79	UR	HWI	-		01.08.2005
MAC80	UR	HWI	-		01.08.2005
MAC81	UR	HWI	+	δ15	01.08.2005
MAC82	UR	HWI	-		01.08.2005
MAC92	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC93	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC94	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC95	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC96	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC97	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC98	UR	HWI	-		16.08.2005
MAC101	UR	HWI	-		18.08.2005
MAC102	UR	HWI	-		18.08.2005
MAC103	UR	HWI	-		18.08.2005
MAC104	UR	HWI	-		18.08.2005
MAC105	UR	HWI	-		18.08.2005
MAC108	UR	HWI	-		19.08.2005
MAC109	UR	HWI	-		19.08.2005
MAC110	UR	HWI	-		19.08.2005
MAC114	UR	HWI	+	δ20	22.08.2005
MAC115	UR	HWI	-		22.08.2005
MAC116	UR	HWI	+	δ21	22.08.2005
MAC117	UR	HWI	-		22.08.2005
MAC118	UR	HWI	-		22.08.2005
MAC120	UR	HWI	-		24.08.2005
MAC121	UR	HWI	-		24.08.2005
MAC123	UR	HWI	-		25.08.2005

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC124	UR	HWI	+	δ22	25.08.2005
MAC125	UR	HWI	-		25.08.2005
MAC126	UR	HWI	-		25.08.2005
MAC130	UR	HWI	-		26.08.2005
MAC131	UR	HWI	-		26.08.2005
MAC132	UR	HWI	+	δ24	26.08.2005
MAC133	UR	HWI	+	δ25	26.08.2005
MAC134	UR	HWI	-		26.08.2005
MAC135	UR	HWI	-		26.08.2005
MAC136	UR	HWI	-		26.08.2005
MAC138	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC139	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC140	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC141	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC142	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC143	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC144	UR	HWI	+	δ26	29.08.2005
MAC145	UR	HWI	-		29.08.2005
MAC146	UR	HWI	-		30.08.2005
MAC148	UR	HWI	-		31.08.2005
MAC149	UR	HWI	-		31.08.2005
MAC150	UR	HWI	-		31.08.2005
MAC151	UR	HWI	-		01.09.2005
MAC152	UR	HWI	-		01.09.2005
MAC153	UR	HWI	-		01.09.2005
MAC155	UR	HWI	-		02.09.2005
MAC156	UR	HWI	-		02.09.2005
MAC157	UR	HWI	+	δ28	02.09.2005
MAC158	UR	HWI	-		02.09.2005
MAC159	UR	HWI	-		05.09.2005
MAC160	UR	HWI	-		06.09.2005
MAC161	UR	HWI	-		06.09.2005

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC162	UR	HWI	-		06.09.2005
MAC164	UR	HWI	-		07.09.2005
MAC165	UR	HWI	-		07.09.2005
MAC166	UR	HWI	-		07.09.2005
MAC169	UR	HWI	+	δ30	08.09.2005
MAC170	UR	HWI	-		08.09.2005
MAC171	UR	HWI	+	δ31	08.09.2005
MAC172	UR	HWI	-		08.09.2005
MAC173	UR	HWI	-		09.09.2005
MAC174	UR	HWI	+	δ32	09.09.2005
MAC175	UR	HWI	-		09.09.2005
MAC176	UR	HWI	-		09.09.2005
MAC177	UR	HWI	-		12.09.2005
MAC178	UR	HWI	-		12.09.2005
MAC180	UR	HWI	-		14.09.2005
MAC181	UR	HWI	-		14.09.2005
MAC191	UR	HWI	-		25.09.2005
MAC192	UR	HWI	-		25.09.2005
MAC193	UR	HWI	-		25.09.2005
MAC194	UR	HWI	-		25.09.2005
MAC195	UR	HWI	-		25.09.2005
MAC197	UR	HWI	-		04.10.2005
MAC198	UR	HWI	-		04.10.2005
MAC199	UR	HWI	+	δ35	06.10.2005
MAC200	UR	HWI	-		06.10.2005
MAC201	UR	HWI	-		13.10.2005
MAC202	UR	HWI	-		13.10.2005
MAC203	UR	HWI	-		14.10.2005
MAC204	UR	HWI	-		14.10.2005
MAC205	UR	HWI	-		14.10.2005
MAC206	UR	HWI	-		14.10.2005
MAC207	UR	HWI	-		14.10.2005

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC208	UR	HWI	-		14.10.2005
MAC209	UR	HWI	+	δ36	14.10.2005
MAC210	UR	HWI	+	δ37	17.10.2005
MAC211	UR	HWI	-		17.10.2005
MAC212	UR	HWI	-		17.10.2005
MAC213	UR	HWI	-		17.10.2005
MAC214	UR	HWI	-		17.10.2005
MAC215	UR	HWI	-		17.10.2005
MAC216	UR	HWI	-		19.10.2005
MAC217	UR	HWI	-		19.10.2005
MAC218	UR	HWI	-		19.10.2005
MAC219	UR	HWI	-		20.10.2005
MAC220	UR	HWI	-		21.10.2005
MAC221	UR	HWI	+	δ38	21.10.2005
MAC222	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC224	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC225	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC226	UR	HWI	+	δ40	23.10.2005
MAC227	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC228	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC229	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC230	UR	HWI	+	δ41	23.10.2005
MAC231	UR	HWI	-		23.10.2005
MAC232	UR	HWI	-		25.10.2005
MAC233	UR	HWI	-		25.10.2005
MAC234	UR	HWI	-		25.10.2005
MAC235	UR	HWI	-		25.10.2005
MAC236	UR	HWI	-		25.10.2005
MAC237	UR	HWI	+	δ42	31.10.2005
MAC238	UR	HWI	-		31.10.2005
MAC239	UR	HWI	-		02.11.2005
MAC240	UR	HWI	-		02.11.2005

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC269	UR	HWI	-		09.11.2005
MAC270	UR	HWI	-		09.11.2005
MAC271	UR	HWI	-		09.11.2005
MAC272	UR	HWI	-		09.11.2005
MAC273	UR	HWI	-		09.11.2005
MAC274	UR	HWI	-		09.11.2005
MAC275	UR	HWI	-		10.11.2005
MAC276	UR	HWI	-		10.11.2005
MAC277	UR	HWI	+	δ53	10.11.2005
MAC278	UR	HWI	-		10.11.2005
MAC279	UR	HWI	-		11.11.2005
MAC280	UR	HWI	-		11.11.2005
MAC281	UR	HWI	-		11.11.2005
MAC282	UR	HWI	+	δ54	11.11.2005
MAC283	UR	HWI	-		14.11.2005
MAC305	UR	HWI	-		15.11.2005
MAC306	UR	HWI	-		15.11.2005
MAC309	UR	HWI	-		16.11.2005
MAC310	UR	HWI	-		16.11.2005
MAC311	UR	HWI	-		17.11.2005
MAC312	UR	HWI	-		17.11.2005
MAC313	UR	HWI	-		17.11.2005
MAC314	UR	HWI	-		17.11.2005
MAC315	UR	HWI	-		18.11.2005
MAC316	UR	HWI	+	δ56	18.11.2005
MAC317	UR	HWI	-		18.11.2005
MAC319	UR	HWI	-		22.11.2005
MAC320	UR	HWI	-		22.11.2005
MAC321	UR	HWI	-		22.11.2005
MAC322	UR	HWI	-		22.11.2005
MAC323	UR	HWI	-		22.11.2005
MAC324	UR	HWI	-		23.11.2005

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC325	UR	HWI	+	δ57	23.11.2005
MAC326	UR	HWI	-		23.11.2005
MAC327	UR	HWI	-		23.11.2005
MAC328	UR	HWI	-		23.11.2005
MAC330	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC331	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC332	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC333	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC334	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC335	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC336	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC337	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC338	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC339	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC340	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC341	UR	HWI	-		25.11.2005
MAC342	UR	HWI	-		06.12.2005
MAC343	UR	HWI	-		08.12.2005
MAC344	UR	HWI	-		08.12.2005
MAC345	UR	HWI	-		08.12.2005
MAC346	UR	HWI	-		09.12.2005
MAC347	UR	HWI	-		09.12.2005
MAC348	UR	HWI	-		13.12.2005
MAC349	UR	HWI	-		13.12.2005
MAC350	UR	HWI	-		13.12.2005
MAC351	UR	HWI	-		13.12.2005
MAC352	UR	HWI	-		13.12.2005
MAC353	UR	HWI	-		14.12.2005
MAC354	UR	HWI	-		14.12.2005
MAC355	UR	HWI	-		15.12.2005
MAC356	UR	HWI	-		15.12.2005
MAC357	UR	HWI	-		15.12.2005

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC358	UR	HWI	-		15.12.2005
MAC379	UR	HWI	+	δ66	17.12.2005
MAC380	UR	HWI	+	δ67	17.12.2005
MAC381	UR	HWI	-		17.12.2005
MAC382	UR	HWI	-		20.12.2005
MAC383	UR	HWI	-		27.12.2005
MAC384	UR	HWI	+	δ68	27.12.2005
MAC385	UR	HWI	+	δ69	27.12.2005
MAC386	UR	HWI	-		03.01.2006
MAC388	UR	HWI	-		04.01.2006
MAC389	UR	HWI	-		04.01.2006
MAC390	UR	HWI	-		04.01.2006
MAC391	UR	HWI	-		05.01.2006
MAC392	UR	HWI	-		09.01.2006
MAC393	UR	HWI	-		09.01.2006
MAC394	UR	HWI	-		10.01.2006
MAC395	UR	HWI	-		10.01.2006
MAC396	UR	HWI	-		10.01.2006
MAC397	UR	HWI	-		12.02.2006
MAC398	UR	HWI	-		12.02.2006
MAC399	UR	HWI	-		12.02.2006
MAC400	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC401	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC402	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC403	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC404	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC405	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC406	UR	HWI	-		13.01.2006
MAC407	UR	HWI	+	δ71	16.01.2006
MAC408	UR	HWI	-		16.01.2006
MAC409	UR	HWI	-		16.01.2006
MAC410	UR	HWI	-		16.01.2006

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC411	UR	HWI	-		16.01.2006
MAC412	UR	HWI	-		16.01.2006
MAC413	UR	HWI	-		16.01.2006
MAC414	UR	HWI	-		16.01.2006
MAC415	UR	HWI	-		18.01.2006
MAC416	UR	HWI	-		18.01.2006
MAC417	UR	HWI	-		18.01.2006
MAC418	UR	HWI	-		18.01.2006
MAC419	UR	HWI	-		18.01.2006
MAC420	UR	HWI	-		18.01.2006
MAC421	UR	HWI	-		19.01.2006
MAC422	UR	HWI	-		19.01.2006
MAC423	UR	HWI	-		19.01.2006
MAC424	UR	HWI	-		19.01.2006
MAC425	UR	HWI	-		20.01.2006
MAC426	UR	HWI	-		20.01.2006
MAC427	UR	HWI	-		20.01.2006
MAC428	UR	HWI	-		20.01.2006
MAC429	UR	HWI	-		23.01.2006
MAC430	UR	HWI	-		26.01.2006
MAC431	UR	HWI	-		26.01.2006
MAC432	UR	HWI	-		27.01.2006
MAC433	UR	HWI	-		27.01.2006
MAC434	UR	HWI	+	δ72	30.01.2006
MAC435	UR	HWI	+	δ73	30.01.2006
MAC436	UR	HWI	+	δ74	30.01.2006
MAC437	UR	HWI	-		30.01.2006
MAC438	UR	HWI	-		30.01.2006
MAC439	UR	HWI	+	δ75	30.01.2006
MAC440	UR	HWI	+	δ76	30.01.2006
MAC441	UR	HWI	-		30.01.2006
MAC442	UR	HWI	-		30.01.2006

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC443	UR	HWI	-		31.01.2006
MAC444	UR	HWI	+	δ77	31.01.2006
MAC445	UR	HWI	-		31.01.2006
MAC446	UR	HWI	-		31.01.2006
MAC447	UR	HWI	-		01.02.2006
MAC448	UR	HWI	-		01.02.2006
MAC449	UR	HWI	-		01.02.2006
MAC450	UR	HWI	-		02.02.2006
MAC451	UR	HWI	-		02.02.2006
MAC452	UR	HWI	-		03.02.2006
MAC453	UR	HWI	-		03.02.2006
MAC454	UR	HWI	-		03.02.2006
MAC455	UR	HWI	-		15.02.2006
MAC456	UR	HWI	-		16.02.2006
MAC457	UR	HWI	+	δ78	16.02.2006
MAC458	UR	HWI	-		16.02.2006
MAC459	UR	HWI	-		17.02.2006
MAC460	UR	HWI	-		17.02.2006
MAC461	UR	HWI	-		17.02.2006
MAC462	UR	HWI	-		17.02.2006
MAC463	UR	HWI	-		17.02.2006
MAC464	UR	HWI	-		17.02.2006
MAC465	UR	HWI	+	δ79	17.02.2006
MAC466	UR	HWI	-		20.02.2006
MAC467	UR	HWI	-		20.02.2006
MAC468	UR	HWI	-		20.02.2006
MAC469	UR	HWI	-		20.02.2006
MAC470	UR	HWI	-		20.02.2006
MAC471	UR	HWI	-		20.02.2006
MAC472	UR	HWI	-		22.02.2006
MAC473	UR	HWI	-		22.02.2006
MAC474	UR	HWI	-		23.02.2006



Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC475	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC476	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC477	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC478	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC479	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC480	UR	HWI	+	δ80	23.02.2006
MAC481	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC482	UR	HWI	-		23.02.2006
MAC483	UR	HWI	+	δ81	23.02.2006
MAC484	UR	HWI	-		24.02.2006
MAC485	UR	HWI	-		24.02.2006
MAC486	UR	HWI	-		24.02.2006
MAC487	UR	HWI	-		26.02.2006
MAC488	UR	HWI	-		26.02.2006
MAC489	UR	HWI	-		26.02.2006
MAC490	UR	HWI	-		26.02.2006
MAC491	UR	HWI	-		28.02.2006
MAC492	UR	HWI	-		28.02.2006
MAC493	UR	HWI	-		01.03.2006
MAC494	UR	HWI	-		02.03.2006
MAC495	UR	HWI	-		02.03.2006
MAC496	UR	HWI	-		03.03.2006
MAC497	UR	HWI	-		03.03.2006
MAC498	UR	HWI	-		03.03.2006
MAC499	UR	HWI	-		07.03.2006
MAC500	UR	HWI	-		07.03.2006
MAC501	UR	HWI	-		08.03.2006
MAC502	UR	HWI	-		10.03.2006
MAC503	UR	HWI	-		10.03.2006
MAC504	UR	HWI	-		10.03.2006
MAC505	UR	HWI	-		10.03.2006
MAC506	UR	HWI	-		10.03.2006

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC507	UR	HWI	-		10.03.2006
MAC508	UR	HWI	-		13.03.2006
MAC509	UR	HWI	+	δ82	13.03.2006
MAC510	UR	HWI	-		15.03.2006
MAC515	UR	HWI	-		16.03.2006
MAC516	UR	HWI	+	δ83	16.03.2006
MAC517	UR	HWI	-		16.03.2006
MAC518	UR	HWI	-		16.03.2006
MAC523	UR	HWI	-		17.03.2006
MAC524	UR	HWI	-		21.03.2006
MAC525	UR	HWI	-		21.03.2006
MAC526	UR	HWI	-		21.03.2006
MAC527	UR	HWI	-		21.03.2006
MAC528	UR	HWI	-		22.03.2006
MAC531	UR	HWI	-		22.03.2006
MAC532	UR	HWI	-		27.03.2006
MAC533	UR	HWI	-		30.03.2006
MAC534	UR	HWI	+	δ85	31.03.2006
MAC535	UR	HWI	-		31.03.2006
MAC536	UR	HWI	+	δ86	03.04.2006
MAC537	UR	HWI	+	δ87	04.04.2006
MAC538	UR	HWI	+	δ88	05.04.2006
MAC539	UR	HWI	-		06.04.2006
MAC540	UR	HWI	-		07.04.2006
MAC541	UR	HWI	-		07.04.2006
MAC542	UR	HWI	-		07.04.2006
MAC543	UR	HWI	+	δ89	07.04.2006
MAC544	UR	HWI	-		10.04.2006
MAC545	UR	HWI	-		12.04.2006
MAC546	UR	HWI	-		12.04.2006
MAC547	UR	HWI	+	δ90	12.04.2006
MAC548	UR	HWI	-		12.04.2006

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC550	UR	HWI	+	δ91	13.04.2006
MAC551	UR	HWI	-		13.04.2006
MAC552	UR	HWI	-		13.04.2006
MAC553	UR	HWI	-		18.04.2006
MAC554	UR	HWI	-		18.04.2006
MAC555	UR	HWI	-		19.04.2006
MAC556	UR	HWI	-		20.04.2006
MAC557	UR	HWI	-		21.04.2006
MAC558	UR	HWI	+	δ92	24.04.2006
MAC559	UR	HWI	-		24.04.2006
MAC560	UR	HWI	-		25.04.2006
MAC561	UR	HWI	+	δ93	25.04.2006
MAC562	UR	HWI	-		26.04.2006
MAC563	UR	HWI	-		26.04.2006
MAC564	UR	HWI	-		26.04.2006
MAC565	UR	HWI	-		27.04.2006
MAC566	UR	HWI	-		27.04.2006
MAC567	UR	HWI	-		27.04.2006
MAC568	UR	HWI	-		27.04.2006
MAC569	UR	HWI	-		27.04.2006
MAC570	UR	HWI	-		10.05.2006
MAC571	UR	HWI	+	δ94	10.05.2006
MAC572	UR	HWI	-		12.05.2006
MAC573	UR	HWI	-		12.05.2006
MAC574	UR	HWI	-		12.05.2006
MAC575	UR	HWI	-		12.05.2006
MAC576	UR	HWI	-		12.05.2006
MAC577	UR	HWI	-		17.05.2006
MAC578	UR	HWI	-		17.05.2006
MAC579	UR	HWI	-		18.05.2006
MAC580	UR	HWI	-		18.05.2006
MAC581	UR	HWI	-		18.05.2006

<i>E. coli-</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC582	UR	HWI	-		18.05.2006
MAC583	UR	HWI	-		18.05.2006
MAC584	UR	HWI	-		18.05.2006
MAC585	UR	HWI	+	δ95	25.05.2006
MAC586	UR	HWI	-		25.05.2006
MAC587	UR	HWI	-		25.05.2006
MAC588	UR	HWI	-		25.05.2006
MAC589	UR	HWI	-		25.05.2006
MAC590	UR	HWI	-		25.05.2006
MAC591	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC592	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC593	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC594	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC595	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC596	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC597	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC598	UR	HWI	+	δ96	26.05.2006
MAC599	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC600	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC601	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC602	UR	HWI	+	δ97	26.05.2006
MAC603	UR	HWI	-		26.05.2006
MAC626	UR	HWI	-		30.05.2006
MAC627	UR	HWI	-		30.05.2006
MAC628	UR	HWI	-		30.05.2006
MAC631	UR	HWI	-		31.05.2006
MAC632	UR	HWI	-		31.05.2006
MAC633	UR	HWI	+	δ106	02.06.2006
MAC634	UR	HWI	-		02.06.2006
MAC635	UR	HWI	-		02.06.2006
MAC636	UR	HWI	+	δ107	02.06.2006
MAC637	UR	HWI	-		02.06.2006

Fortsetzung Tabelle 8-1.

<i>E. coli</i>					
Isolat	Material*	Epidemiologie**	K1***	δ-Nr.	Eingang
MAC638	UR	HWI	-		02.06.2006

\*BK: Blutkultur; C: Cervixabstrich; UR: Urinkultur. \*\*IE: invasive Erkrankung (adulte Bakteriämie); TR: asymptomatisches Trägertum; M/SS05: Medizinstudenten Sommersemester 2005; MWUE: Mitarbeiter IHM Würzburg; BM/WS05: Biomedizinstudenten Wintersemester 2005; M/WS05: Medizinstudenten Wintersemester 2005/2006; Ph/WS05: Pharmaziestudenten Wintersemester 2005/2006; MH: Mitarbeiter MH Hannover; LC/WS05: Lebensmittelchemiestudenten Wintersemester 2005/2006; M/SS06: Medizinstudenten Sommersemester 2006; HWI: Harnwegsinfekt. \*\*\*- : Stamm exprimiert keine K1-Kapsel; + : Stamm exprimiert K1-Kapsel. δ-Nr.: Nummer entsprechend der Stammsammlung des IHM Würzburg.

Tabelle 8-2: *E. coli* K1-Stammsammlung des IHM Würzburg.

Original-ID	WUE-ID/ δ-Nr.	ST	STC	CUS- 3_GT	Serotyp	Bereitgestellt von	Wirt	Epidemiologie*	Land**	Jahr	neuO	poly(ψ)-Motiv	neuO- Allel
A247	3223	95	95		O18:H7:K1	M. Achtman	Mensch	Appendizitis	SE	1943	+	10	neuO-1
A23	3225	59	59		O1:H:K1	M. Achtman	Mensch	TR	BE	1948			
RS179	3984	62			K1	L. Wieler	Mensch	IE	USA	1974	+	23	neuO-5
RS167	3985	144			K1	L. Wieler	Mensch	IE	USA	1974			
RS176	3799	62			O2:K1:H7	U. Dobrindt	Mensch	IE	USA	1974	+	23	neuO-5
IHE3033 (A53)	3788	95	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	FI	1976	+	17	neuO-1
IHE3034 (A54)	3789	95	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	FI	1976	+	13	neuO-1
A21 (C94)	3804	62			K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	USA	1976	+	15	neuO-5
IHE3036 (A56)	3791	390	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	FI	1977	+	22	neuO-1
IHE3035 (A148)***	3790	95	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	FI	1977	+	13	neuO-1
A50	3983	62			K1	L. Wieler	Mensch	IE	USA	1977	+	34	neuO-5
A152	3229	142	95	2	O18:H7:K1	M. Achtman	Mensch	TR	UK	1977	+	33	neuO-1
RS226 (78015)***	3800	95	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	TR	USA	1978	+	8	neuO-1
A198	3224	139		7	O1:K1	M. Achtman	Mensch	TR	UK	1979	+	14	neuO-2
IMT9698	3835	95	95	5	O2:K1	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	DE	1980	+	34	neuO-1
IMT4517	3823	95	95		O2:K1:H7	L. Wieler	Truthahn	Coliseptikämie	DE	1990	+	46	neuO-1
MT78 (IMT9294)	3832	95	95	5	O2:K1:H+	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	FR	1993	+	20	neuO-1
TK3 (IMT9579)	3834	95	95		O1:K1:H7	L. Wieler	Truthahn	Coliseptikämie	KA	1993			
IMT2121	3973	357			K1	L. Wieler	Truthahn	Coliseptikämie	DE	1994	+	38	neuO-3
IMT2097	3812	95	95	8	O1:K1:H7	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	1997	+	31	neuO-3
IMT2108	3814	95	95	2	Osp.:H7:K1	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	1997	+	8	neuO-1
IMT2099***	3813	95	95	2	O18:H7:K1	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	1997	+	31	neuO-1
IMT2288	3817	140	95	10	O2:K1:H5	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	1999	+	17	neuO-3
IMT2297	3818	95	95	10	O2:K1:H5	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	DE	1999	+	15	neuO-3
IMT2251	3815	95	95	2	On.t.:K1:H7	L. Wieler	Truthahn	Coliseptikämie	DE	1999	+	44	neuO-1
IMT2254***	3816	126			On.t.:H:K1	L. Wieler	Ente	Coliseptikämie	unknown	1999			
IMT2294	3975	115			O2:K1	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	DE	1999			
IMT2248	3974	358			K1	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	1999			
IMT2470	3820	95	95	11	O2:K1:H5	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2000	+	5	neuO-3

Fortsetzung Tabelle 8-2.

Original-ID	WUE-ID/ δ-Nr.	ST	STC	CUS- 3_GT	Serotyp	Bereitgestellt von	Wirt	Epidemiologie*	Land**	Jahr	neuO	poly(ψ)-Motiv	neuO- Allel
IMT4534	3826	140	95	10	O2:K1:Hsp	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2000	+	46	neuO-3
IMT2491	3821	95	95		O2:H6:K1	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	JO	2000	+	21	neuO-1
IMT2469	3819	140	95	10	O2:K1:H5	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	DE	2000	+	14	neuO-3
IMT2532	3822	95	95	4	O18:K1:H7	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2000	+	19	neuO-1
IMT2477	3976	141			K1	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2000			
IMT4525	3825	95	95	8	O1:K1:H7	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2000	+	26	neuO-3
IMT4518	3824	95	95	8	O1:K1:H7	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2000	+	27	neuO-3
IMT5155	3827	140	95	10	O2:K1:H5	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2001	+	18	neuO-3
IMT5119	3977	363			K1	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2001			
IMT5144	3978	141			K1	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2001			
IMT8894	3828	368	95	1	O2:K1:H7	L. Wieler	Flamingo	Coliseptikämie	NL	2003	+	25	neuO-1
IMT8899	3829	95	95		O1:K1	L. Wieler	Strauß	Coliseptikämie	NL	2003	+	10 and 62	neuO-1
IMT8897	3979	141			K1	L. Wieler	Vogel	Coliseptikämie	NL	2003			
IMT9241	3831	95	95	2	O2:K1:H4	L. Wieler	Legehennen	Coliseptikämie	DE	2004	+	16	neuO-1
IMT9232	3830	95	95		O1:K1:H7	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	DE	2004	+	14	neuO-1
	δ58	95	95	8	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	35	neuO-3
	δ5	357			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	18	neuO-3
	δ60	420			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ61	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ62	95	95		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	8	neuO-1
	δ63	10	10		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ64	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	16	neuO-1
	δ65	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ16	80	568		K1	diese Studie	Mensch	Cervix-Abstrich	DE	2005			
	δ1	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	16	neuO-1
	δ2	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ3	141			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ4	419			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ5	357			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ6	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ7	357			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ8	416	95	2	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	2	neuO-1
	δ9	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	29	neuO-1
	δ13	141			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ17	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ18	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	40	neuO-1

Fortsetzung Tabelle 8-2.

Original-ID	WUE-ID/ δ-Nr.	ST	STC	CUS- 3_GT	Serotyp	Bereitgestellt von	Wirt	Epidemiologie*	Land**	Jahr	neuO	poly(ψ)-Motiv	neuO- Allel
	δ33	62			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	41	neuO-5
	δ34	95	95		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	32	neuO-1
	δ43	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ44	357			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ45	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ46	427			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ47	358		13	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	19	neuO-3
	δ48	399	399		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ49	144		18	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005	+	10	neuO-4
	δ50	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ51	131			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ52	59	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ55	429			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2005			
	δ23	420			K1	diese Studie	Mensch	IE	DE	2005			
	δ27	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	IE	DE	2005	+	49	neuO-1
	δ29	95	95		K1	diese Studie	Mensch	IE	DE	2005	+	24	neuO-1
	δ39	95	95		K1	diese Studie	Mensch	IE	DE	2005	+	31	neuO-1
	δ10	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ11	95	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	4	neuO-1
	δ12	357			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	36	neuO-2
	δ14	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ15	421	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ20	417	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	23	neuO-1
	δ21	418	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	41	neuO-1
	δ22	390	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	16	neuO-1
	δ24	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ25	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ26	420			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ28	144			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ30	95	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	24	neuO-1
	δ31	415	59		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ32	390	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	3	neuO-1
	δ35	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ36	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ37	95	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	42	neuO-1
	δ38	80	568		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ40	80	568		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	51	neuO-3
	δ41	59	59		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			

Fortsetzung Tabelle 8-2.

Original-ID	WUE-ID/ δ-Nr.	ST	STC	CUS- 3_GT	Serotyp	Bereitgestellt von	Wirt	Epidemiologie*	Land**	Jahr	neuO	poly(ψ)-Motiv	neuO- Allel
	δ42	430			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ53	357			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	8	neuO-3
	δ54	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	5	neuO-1
	δ56	428		6	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	22	neuO-1
	δ57	428			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ66	357			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005			
	δ67	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	22	neuO-1
	δ68	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2005	+	10	neuO-1
	δ84	95	95	8	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006	+	13	neuO-3
	δ98	141			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006			
	δ99	379	59		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006			
	δ100	141			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006			
	δ101	80	568		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006			
	δ102	80	568		K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006			
	δ103	357			K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006			
	δ104	357		12	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006	+	25	neuO-3
	δ105	428		9	K1	diese Studie	Mensch	TR	DE	2006	+	9	neuO-3
	δ70	357			K1	diese Studie	Mensch	IE	DE	2006	+	19	neuO-3
	δ69	568	568		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ71	569			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ72	80	568		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ73	80	568		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ74	144		18	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	30	neuO-4
	δ75	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	4	neuO-1
	δ76	357		14	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	49	neuO-3
	δ77	573			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ78	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ79	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ80	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ81	10	10		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ82	80	568		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ83	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ85	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ86	95	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	32	neuO-1
	δ87	567			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ88	95	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	32	neuO-1
	δ89	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	93	neuO-1
	δ90	95	95		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	30	neuO-1

Fortsetzung Tabelle 8-2.

Original-ID	WUE-ID/ δ-Nr.	ST	STC	CUS- 3_GT	Serotyp	Bereitgestellt von	Wirt	Epidemiologie*	Land**	Jahr	neuO	poly(ψ)-Motiv	neuO- Allel
	δ91	95	95	3	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	20	neuO-1
	δ92	59	59		K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ93	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ94	358		15	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	18	neuO-3
	δ95	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ96	567			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
	δ97	95	95	2	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	34	neuO-1
	δ106	95	95	16	K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006	+	25	neuO-3
	δ107	141			K1	diese Studie	Mensch	HWI	DE	2006			
IHE3080	3792	390	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	FI	unbekannt	+	16	neuO-1
A160	3227	141			O2:H6:K1	M. Achtman	Mensch	HWI	FI	unbekannt			
BEN79	3793	95	95	2	O18:K1:H7	U. Dobrindt	Geflügel	Coliseptikämie	FR	unbekannt	+	30	neuO-1
BEN374	3794	95	95	2	O18:K1:H7	U. Dobrindt	Geflügel	Coliseptikämie	FR	unbekannt	+	2	neuO-1
BEN2908	3795	95	95	5	O2:K1:H7	U. Dobrindt	Geflügel	Coliseptikämie	FR	unbekannt	+	20	neuO-1
W1827	3803	95	95		O2:K1:H-	U. Dobrindt	Geflügel	Coliseptikämie	DE	unbekannt	+	27	neuO-1
4405/1	3808	95	95	2	O12:K1:H7	U. Dobrindt	Mensch	IE	DE	unbekannt	+	19	neuO-1
1772***	3807	577			O2:K1	U. Dobrindt	Vogel	Coliseptikämie	IL	unbekannt			
RB11	3796	95	95	10	O2:K1	U. Dobrindt	Vogel	Coliseptikämie	IL	unbekannt	+	15	neuO-3
RB12	3797	95	95	10	O2:K1	U. Dobrindt	Vogel	Coliseptikämie	IL	unbekannt	+	47	neuO-3
RB14	3798	579		2	O2:K1	U. Dobrindt	Vogel	Coliseptikämie	IL	unbekannt	+	28	neuO-1
F18	3801	95	95	10	K1	U. Dobrindt	Mensch	TR	unbekannt	unbekannt	+	22	neuO-3
VE239/94	3805	62			K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	unbekannt	unbekannt	+	6	neuO-5
VE1140/94	3806	95	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	unbekannt	unbekannt	+	11	neuO-1
VE8793/95	3809	390	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	unbekannt	unbekannt	+	25	neuO-1
B13155	3811	390	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	unbekannt	unbekannt	+	19	neuO-1
B616/96	3802	390	95	2	K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	unbekannt	unbekannt	+	18	neuO-1
B10363	3810	95	95		K1	U. Dobrindt	Mensch	IE	unbekannt	unbekannt	+	33	neuO-1
A285	3231	144		17	O16:H6:K1	M. Achtman	Mensch	HWI	SE	unbekannt	+	20	neuO-4
A211	3226	140	95	10	O2:H5:K1	M. Achtman	Mensch	TR	UK	unbekannt	+	43	neuO-3
248	3833	370	95	10	O35:K1	L. Wieler	Huhn	Coliseptikämie	USA	unbekannt	+	25	neuO-3
A173	3228	62		8	O7:K1	M. Achtman	Mensch	TR	USA	unbekannt	+	31	neuO-3
IMT9090	3980	141			K1	L. Wieler	Mensch	HWI	unbekannt	unbekannt			
KK3/2	3430	62			O7:K1:NM	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt			
KK4/2	3431	95	95	2	O2:K1:H7	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt	+	32	neuO-1



Fortsetzung Tabelle 8-2.

Original-ID	WUE-ID/ δ-Nr.	ST	STC	CUS- 3_GT	Serotyp	Bereitgestellt von	Wirt	Epidemiologie*	Land**	Jahr	neuO	poly(ψ)-Motiv	neuO- Allel
KK5/14	3432	10	10		O2:K1:NM	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt	+	16	neuO-1
KK7/1	3433	95	95	2	O2:K1:H4	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt	+	31	neuO-1
KK9/10	3434	363			O46:K1:H31	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt			
KK11/6	3435	364			O1:K1:NM	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt			
KK15/1	3436	59	59		O1:K1:NM	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt			
KK18/10	3437	95	95	2	O2:K1:H7	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt	+	28	neuO-1
KK20/2	3438	379	59		O1:K1:NM	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt			
KK27/1	3439	95	95	2	Orough:K1:H4	L. Beutin	Mensch	TR	DE	unbekannt	+	31	neuO-1

Original-ID: Originalbezeichnung; WUE-ID/δ-Nr.: Nummern entsprechend der Stammsammlung des IHM Würzburg; ST: Sequenztyp; STC: Sequenztyp-Komplex; CUS-3\_GT: CUS-3-Genotyp; Serotyp wie auf MLST-Datenbank angegeben; Poly(ψ)-Motiv: Anzahl der *Heptanucleotide-Repeats* vor *neuO*. \*TR: asymptomatisches Trägertum; IE: Invasive Erkrankung (Neugeborenen-Meningitis und/oder Bakteriämie); HWI: Harnwegsinfekt. \*\*BE: Belgien; DE: Deutschland; FI: Finnland; FR: Frankreich; IL: Israel; JO: Jordanien; KA: Kanada; NL: Niederlande; SE: Schweden; UK: Großbritannien; USA: Vereinigte Staaten von Amerika. \*\*\* Diese Stämme waren im Kolonie-Immunoblot mit mAb735 für die K1-Kapsel negativ, das Vorhandensein des K1-spezifischen Polysialyltransferasegens *neuS* konnte aber mittels DNA-Hybridisierung (JP5/JP6-Sonde) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 8-3: Allelkombinationen der CUS-3\_GT.

<b>CUS-3_GT*</b>	<b>ORF22-Allel</b>	<b>siaK1_1-Allel</b>	<b>siaK1_2-Allel</b>	<b>neuO-Allel</b>	<b>Acc. Nr.**</b>
CUS-3_GT_1	1	4	12	1	FN394218
CUS-3_GT_2	1	7	12	1	FN394986
CUS-3_GT_3	1	7	5	1	FN394987
CUS-3_GT_4	1	7	2	1	FN394988
CUS-3_GT_5	2	7	12	1	FN394989
CUS-3_GT_6	3	7	12	1	FN394990
CUS-3_GT_7	6	6	15	2	FN394991
CUS-3_GT_8	2	7	9	3	FN394992
CUS-3_GT_9	2	7	2	3	FN394993
CUS-3_GT_10	2	7	4	3	FN394994
CUS-3_GT_11	2	7	5	3	FN394995
CUS-3_GT_12	4	1	1	3	FN394996
CUS-3_GT_13	5	1	7	3	FN394997
CUS-3_GT_14	5	7	2	3	FN394998
CUS-3_GT_15	5	7	14	3	FN394999
CUS-3_GT_16	5	7	9	3	FN395000
CUS-3_GT_17	2	5	5	4	FN395001
CUS-3_GT_18	2	6	5	4	FN395002

\*CUS-3\_GT: CUS-3-Genotyp. \*\*Acc Nr.: Accession number (EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank).