

## V. Diskussion

### 1. Charakterisierung eines putativen phagenkodierten *stx*<sub>2</sub>-regulatorischen Faktors

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Mechanismus, der dem bereits in der Einleitung erläuterten, von Mühldorfer *et al.* (1996) beschriebenen phagenvermittelten Toxinregulationsprozeß zugrundeliegt. Einen weiteren Hinweis auf die Existenz eines phagenkodierten Toxinregulators hatten Studien von Yee *et al.* (1993) geliefert, die zeigten, daß bei der Induktion eines nicht-toxinkonvertierenden Phagen ein phagenkodierter Faktor vermehrt gebildet wird, der *in trans* die Expression eines chromosomal kodierten *Stx2va*-Gens verstärkt.

Zunächst sollte das Gen für den postulierten regulatorischen Faktor lokalisiert, isoliert und näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde mit dem *Stx2*-konvertierenden Bakteriophagen 933W aus dem EHEC-Wildstamm O157:H7 EDL933 eine Transposonmutagenese durchgeführt. Der *E. coli* K-12-Stamm C600(pADR-28), der das Plasmid pADR-28 mit der *stx*<sub>2</sub>-*phoA*-Reporterfusion enthält, wurde mit den resultierenden mutierten Phagen lysogenisiert. Die lysogenen Stämme wurden daraufhin auf ihre Fähigkeit zur Expression des Reportergens in An- und Abwesenheit von Bakteriophageninduktion untersucht und mit *E. coli* C600(933W/pADR-28), der den nichtmutierten 933W-Phagen enthält, verglichen. Dabei konnten zwei unterschiedliche Gruppen von Transposonmutanten identifiziert werden: In der einen Gruppe, die die sechs *E. coli*-Stämme umfaßte, waren die PhoA-Aktivitäten der Stämme nach Phageninduktion reduziert, während die Werte für die PhoA-Aktivitäten der beiden Stämme der anderen Gruppe erhöht waren.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich diese Transposonmutanten neben den Veränderungen in der Toxinexpression auch in ihren zellytischen Eigenschaften vom Ausgangsphagen 933W unterscheiden. Hierfür wurden die zell- und überstandsassoziierten PhoA-Aktivitäten eines jeden Stammes verglichen, wobei ein höherer Anteil PhoA-Aktivität im Bakterienkulturüberstand einer stärkeren Lysis der Zellen entspricht. Es wurde festgestellt, daß eine Korrelation zwischen der Fähigkeit der Stämme zur PhoA-Induktion und dem jeweiligen Anteil an überstandsassoziiertem PhoA-Aktivität nach Induktion der Bakteriophagen besteht: Stämme mit starker PhoA-Induktion zeigten eine starke Lysis nach Induktion ihrer lysogenen Phagen und umgekehrt. Aus der Korrelation dieser Veränderungen in Zellysis und PhoA-Expression wurde geschlossen, daß von den Transposoninsertionen Gene betroffen sein könnten, die sowohl einen Einfluß auf die Regulation des *stx*<sub>2</sub>-Genclusters ausüben als auch die

Fähigkeit zur Induktion der lysogenen Phagen beeinflussen, oder daß beide Prozesse gekoppelt ablaufen könnten.

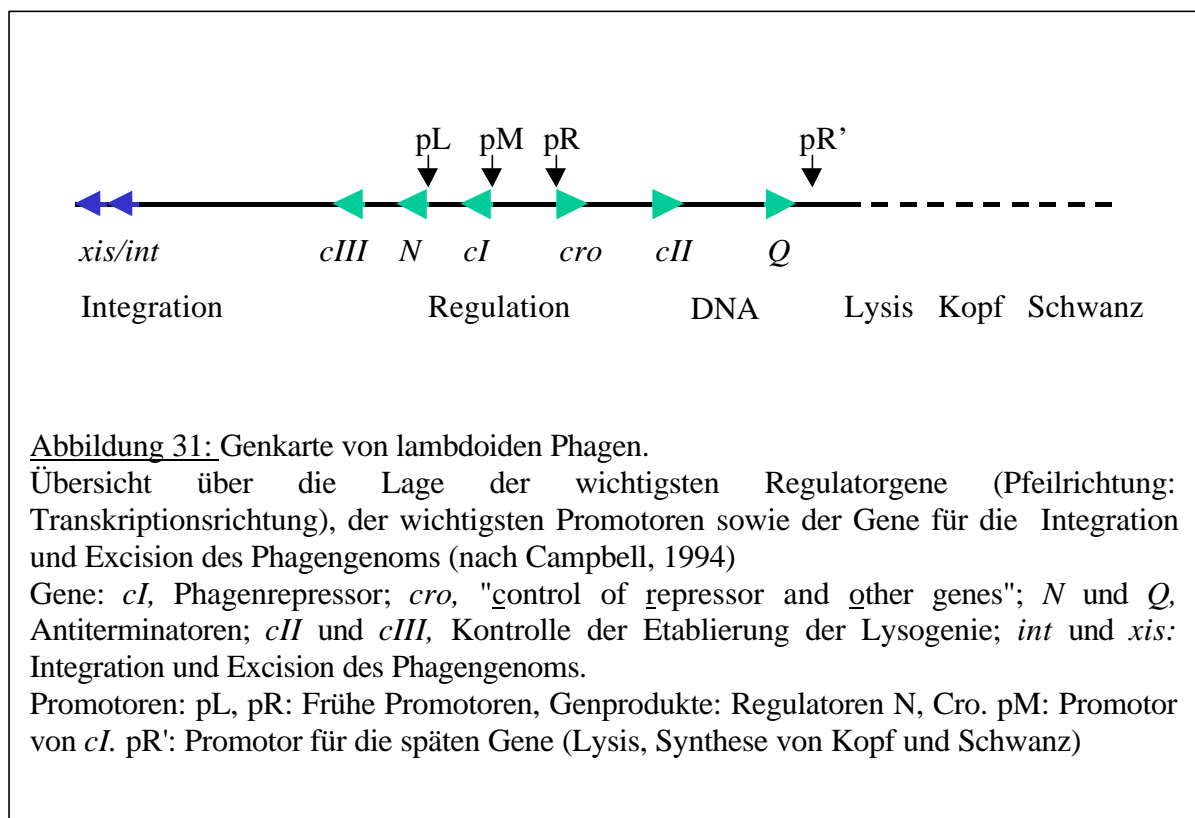
Um zu klären, ob die Veränderungen in der Expression des *stx<sub>2</sub>-phoA*-Reportergens auch mit Veränderungen in der Stx2-Produktion einhergehen, wurden im Westernblot zell- und überstandsassoziierte Toxinproduktion der Transposonmutanten mit der des Positivkontrollstamms *E. coli* K-12 C600(933W/pADR-28) verglichen. Es wurden drei Gruppen mit erhöhter, unveränderter und reduzierter Toxinproduktion identifiziert, die jedoch nicht mit den Expressionsphänotypen des *stx<sub>2</sub>*-Reportergens korrelierten.

Wegen dieser mangelnden Korrelation von PhoA-Expression und Zellysis einerseits und der Toxinproduktion andererseits sollte geklärt werden, ob sich die Korrelation von Zellysis und PhoA-Expression auf der Ebene der Produktion von Phagenpartikeln widerspiegelt. Die detektierten Phagenmengen wurden mit der des nichtmutierten *E. coli*-Ausgangsstamms C600(933W/pADR-28) verglichen. Auch hier wurden drei verschiedene Mutantengruppen identifiziert, in denen die Phagenpartikelproduktion im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöht, reduziert oder unverändert waren. In einem Teil der Stämme korrelierte die Phagenpartikelproduktion mit der Zellyse und der PhoA-Produktion.

Beim Vergleich der Phagenpartikelproduktion mit den beiden Faktoren PhoA-Induktion/Zellysis und Toxininduktion zeigte sich jedoch, daß all diese Eigenschaften kaum Korrelationen aufweisen (s. Tabelle 16).

Nur in zwei *E. coli*-Stämmen korrelieren alle Eigenschaften, d.h. sowohl die PhoA-Synthese als auch Zellysis, Phagenpartikel- und Toxinproduktion sind entweder alle erhöht (SF106) oder alle reduziert (SF53). Hierbei ist zu beachten, daß in *E. coli* SF53 zwei Transposons inseriert sind. In diesen Stämmen könnten Gene von den Transposoninsertionen betroffen sein, die die Toxinproduktion über eine generelle Veränderung der Phagen in ihrer Fähigkeit zu Lyse und Vermehrung beeinflussen. Dies könnte nach einem ähnlichen Prinzip geschehen wie bei der Hemmung der Toxinsynthese durch die Inhibition der Phageninduktion aufgrund einer Mutation des hierfür essentiellen Wirtsgens *recA*, wie später noch genauer erläutert wird. Im vorliegenden Fall mit den *E. coli*-Stämmen SF53 und SF106 wäre jedoch eine Mutation von Phagengenen, die für die Etablierung des lytischen Vermehrungszyklus verantwortlich sind, für die beschriebenen Veränderungen in Toxin- und Reportergenexpression sowie Zellyse und PhoA-Produktion verantwortlich. Eine Reduktion der Phageninduktion würde in *E. coli* SF53 zu einer Verringerung der Zellyse und der Produktion von Toxin, PhoA und Phagenpartikeln führen, während in *E. coli* SF106 die

Mutation auf allen Ebenen genau den gegenteiligen Effekt hätte (s. Tabelle 16). Mögliche Kandidaten für die von den Mutationen direkt oder über polare Effekte betroffenen Gene könnten z. B. zentrale Phagenregulatoren wie der Phagenrepressor *CI* und das Cro-Protein oder Antiterminatoren wie die Proteine *N* und *Q* sein (siehe Abbildung 31) (Campbell, 1996, Campbell, 1994, Friedman, 1988, Ptashne, 1986). Die Mutationen könnten einen kompletten Expressionsausfall oder einen Aktivitätsverlust durch eine Minderung der Affinität für die Bindung der betreffenden Regulatoren an die entsprechenden regulatorisch wirksamen Sequenzen bewirken. Theoretisch wäre auch eine Aktivitätssteigerung durch eine Affinitätserhöhung möglich, dies wäre jedoch unwahrscheinlich, weil die Mutationen durch Transposoninsertionen bedingt sind.



Weiterhin kann eine Gruppe von Stämmen identifiziert werden, in der die Phagenpartikelproduktion und die PhoA-Induktion/Zellysis reduzierte Werte aufweisen, die Toxinproduktion hingegen auf mindestens wildtypischem Niveau liegt. Zu dieser Gruppe gehören die *E. coli*-Stämme SF59, SF75 sowie SF158. Die drei verbleibenden *E. coli*-Stämme SF25, SF67 und SF156 zeigen jeweils eigenständige Gesamtphänotypen, deren einzelne Eigenschaften ebenfalls keine konsequente Korrelation zueinander zeigen.

Die Ursache für diese mangelnden Korrelationen liegt aller Wahrscheinlichkeit nach darin, daß durch die Transposoninsertionen neben Genen, die in den Induktionsprozeß des Phagen involviert sind, auch weitere Regulatorgene oder an regulatorischen Prozessen beteiligte Sequenzen inaktiviert wurden, die über verschiedene Mechanismen direkt auf die Toxinexpression Einfluß nehmen. Dies könnten z. B. Gene oder regulatorische Sequenzen sein, die speziell die Toxinregulation im lysogenen Phagen unabhängig von dessen Induktion beeinflussen.

So könnte in der Gruppe der *E. coli*-Stämme SF59, SF75 und SF158 beispielsweise ein Toxinrepressor inaktiviert sein, so daß es trotz der durch die Mutation verringerten Phagenproduktion zu keiner Verringerung der Toxinproduktion kommt. Dieser Faktor wäre dann jedoch nicht *trans*-aktiv, da die PhoA-Produktion in diesen Stämmen wie die Phagenpartikelproduktion reduziert ist.

In *E. coli* SF25 könnte es durch den Verlust eines spezifischen *trans*-aktiven Toxinaktivators zu einem Abfall der Toxinproduktion kommen. Für diese Hypothese spricht, daß hier sowohl die Expression des Toxingens als auch die des Reportergens durch die Deletion reduziert werden, die Phagenpartikelproduktion jedoch nicht beeinträchtigt wird.

Im *E. coli*-Stamm SF156 könnte zusätzlich zur Desaktivierung eines Toxinrepressors (Reportergenexpressionssteigerung) die Toxinexpression an sich blockiert sein. Dies könnte möglicherweise durch einen polaren Effekt der Transposoninsertion auf die Toxingene geschehen sein, zumal das Transposon wahrscheinlich nicht allzu weit von den Toxingenen entfernt ins Phagenom inseriert ist, wie später noch beschrieben wird.

Der Aktivitätsverlust eines Toxinaktivators könnte in der *E. coli*-Mutante SF67 wiederum für eine Expressionsverminderung des Reportergens verantwortlich sein. Die Mutation müßte jedoch gleichzeitig z. B. durch einen polaren Effekt die Phagenproduktion steigern, was die durch die Mutation erfolgte Reduktion der Toxinexpression wiederum kompensieren würde, da dieser Stamm Stx2 auf wildtypischem Niveau produziert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die bewirkten Effekte der in die Phagen Genome inserierten Transposons sehr vielschichtig sind und daß multiple Prozesse in den Phagen davon betroffen sind, wobei die bewirkten Funktionsausfälle und -veränderungen den bekannten Phagenprozessen nicht unbedingt eindeutig zugeordnet werden können.

Zusätzlich zu den phänotypischen Tests wurden für die Eingrenzung der Lage der Transposons in den Genomen der Mutanten Southern Hybridisierungen durchgeführt. Beim Vergleich der Gruppen mit unterschiedlichen Hybridisierungsmustern mit den Stammgruppen

nach phänotypischen Mustern ergab sich als einziges eine Korrelation zwischen stark reduzierter Toxinproduktion und der Kolokalisation des Transposons mit den Toxingenen auf einem ca. 20 kb großen *HindIII*-DNA-Fragment (*E. coli* SF25, SF53 und SF156). Da sich alle anderen getesteten Phänotypen der betroffenen Stämme stark unterschieden, wurde daraus geschlossen, daß wahrscheinlich trotz der Kolokalisation unterschiedliche Gene von den Insertionen betroffen sind und daß eine Reduktion der Toxinproduktion durch polare Effekte der Transposons auf die Expression der Toxingene bewirkt werden könnte.

Weiterhin war es das Ziel dieses Teilprojektes, in den Transposonmutanten des Phagen 933W die durch die Insertion inaktivierten Gene zu identifizieren. Für diesbezügliche Untersuchungen wurde die *E. coli*-Mutante SF158 ausgewählt, da in dieser die PhoA-Aktivität nach Induktion des Bakteriophagen am stärksten reduziert ist und diese Mutante nur ein einziges Transposon in ihrem Genom enthält.

Nach der Herstellung von Reinfektanten des mutierten Phagen aus *E. coli* SF158 im *E. coli* K-12 Wirtstamm C600(pADR-28) wurden die resultierenden Stämme ohne und mit Induktion der Phagen auf ihre PhoA-Aktivität getestet. Diese Stämme unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Reporterexpression vom ursprünglichen Mutantenstamm. Daher ist anzunehmen, daß die Reduktion der PhoA-Expression in der Mutante auf Veränderungen im Phagen genom zurückzuführen ist und nicht durch einen Effekt der Wirtsumgebung auf die Expression von Phagenen (Positionseffekt) bewirkt wird.

Als nächstes wurde das ca. 7 kb große Phagen-DNA-Fragment mit dem inserierten Transposon subkloniert und die Insertionsstelle sequenziert. In den sechs Leserahmen wurden vier mögliche ORFs identifiziert, die von der Insertion betroffen waren und von denen lediglich ORF A eine typische Ribosomenbindungsstelle aufwies (s. Abbildung 12). Ein Vergleich mit der kürzlich von Plunkett *et al.* (1999) publizierten kompletten Sequenz des EHEC O157:H7-Phagen 933W zeigt 100 % Homologie des 624 bp langen ORF A mit dem ORF L0065, der in der Nähe des linken Phagenendes ca. 700 bp "upstream" von den Genen *xis* (ORF L0062) und *int* (ORF L0061) und von *attL* lokalisiert ist und dessen Funktion unbekannt ist. Eine hohe Homologie wurde auch im *orf4* des Stx2-konvertierenden Phagen VT2-Sa gefunden (99 % Homologie von ORF A zu den N-terminalen 68 % von *orf4*, Miyamoto *et al.*, 1999). Diese beiden ORFs weisen jeweils am N-Terminus eine weitere, geringfügigere Homologie zu dem ORF o101 aus der kompletten Sequenz von *E. coli* K-12 MG1655 auf, welcher wiederum eine schwache Homologie über einen kurzen Bereich zu einer postulierten Helicase aus

*Caenorhabditis elegans* besitzt. Diese schwache Homologie spiegelt sich auch in einer Ähnlichkeit der Helicase zu ORF A über eine kurze Strecke wieder. "Downstream" von der Transposoninsertion treten weitere kurze Homologien zu Genen aus den Shiga-Toxin-konvertierenden Phagen 933W (ORF L0140), VT2-Sa (orf76) und H19J (orf558) sowie zu den Genen *eaA* und *orf87* aus dem *Salmonella typhimurium*-Phagen P22 auf. Für keines dieser homologen Proteine war bisher eine Funktion identifiziert oder postuliert worden. Die Funktion des mutierten Proteins und seine Rolle während der Induktion des Reportergens ist demnach unbekannt.

Weiterhin sollte durch eine *trans*-Komplementation untersucht werden, ob die Transposoninsertion in der Tat für den veränderten Expressionsphänotyp des Reportergens im *E. coli* Mutantenstamm SF158 verantwortlich ist. Die "Überexpression" des postulierten regulatorischen Faktors durch die Induktion des Bakteriophagen sollte durch die Hyperexpression der wildtypischen ORFs A-D in einem Expressionsvektor imitiert werden.

Für die Komplementation wurden zwei verschiedene Testsysteme gewählt. Zum einen wurde der Expressionsvektor mit den ORFs in die Phagentransposonmutante *E. coli* SF158 überführt. Hier sollte getestet werden, ob durch einen der klonierten ORFs der Effekt der Transposonmutation im Phagen auf die Expression des Reportergens komplementiert werden kann. Für das zweite Testsystem wurde der Expressionsvektor mit den ORFs in den *E. coli* K-12-Stamm C600(pADR-28) eingebracht. In diesem System sollte überprüft werden, ob das Produkt eines der hyperexprimierten ORFs einen direkten Effekt auf die Expression des Reportergens im Plasmid pADR-28 ausübt, was bei einem möglichen Aktivatorprotein der Fall sein könnte.

In keinem der Testsysteme konnte eine Steigerung der *stx<sub>2</sub>-phoA*- Reporterogenaktivität erzielt werden. So wurde weder eine direkte Erhöhung der Reporterexpression durch Induktion der klonierten ORFs in C600(pADR-28) erzielt, noch konnte eine Komplementation der reduzierten Reporterexpression bedingt durch die Mutation im Phagen im Stamm SF158 erzielt werden, weder ohne noch mit Induktion der Phagen und der klonierten ORFs. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß die klonierten ORFs zum einen keinen direkten Einfluß auf die Reporterexpression besitzen. Zum anderen scheidet ein möglicher indirekter Einfluß der ORFs durch die Vermittlung anderer essentieller Phagenfunktionen ebenfalls aus, weil auch in Anwesenheit des mutierten Phagen keine Expressionssteigerung erzielt werden kann. Die einzige Erklärung, warum die Transposoninsertion die Reporterexpression in *E. coli* SF158 beeinflusst, könnte ein polarer Effekt des Transposons auf die Expression von essentiellen

Phagengen sein. Da das Transposon in ORF L0065 lokalisiert ist und fast unmittelbar "downstream" dieses postulierten Gens in Transkriptionsrichtung der gemeinsamen mRNA die Gene für das Ausschneiden des Phagengenoms beim Übergang in den lytischen Vermehrungszyklus (*xis* und *int*) liegen, ist anzunehmen, daß ein polarer Effekt des Transposons auf diese für die Induktion des Phagen essentiellen Gene den Phagen in seiner Induktionsfähigkeit hemmt. Dies bestätigt sich in den Befunden, daß es neben einer verminderten *PhoA*-Expression in dieser Mutante auch zu einer Reduktion in Zellyse und Phagenpartikelproduktion kommt. Auch Untersuchungen zum Einfluß von *RecA* auf die Expression des *stx<sub>2</sub>-phoA*-Reportergens hatten gezeigt, daß durch die Hemmung der Phageninduktion aufgrund der Deletion von *recA* die Expression des Reportergens nach MMC-Behandlung gehemmt wird (Mühldorfer *et al.*, 1996). Warum es allerdings in *E. coli* SF158 zu keiner signifikanten Verringerung der Toxinproduktion kommt, verbleibt unklar.

Während des Verlaufs dieses Projekts wurde die Regulation der Shiga-Toxin-Expression durch den toxinkonvertierenden Phagen auch von anderen Arbeitsgruppen bearbeitet. So gelang es Neely und Friedman (1998a), ein 17 kb großes Fragment des Genoms des *Stx1*-konvertierenden Phagen H19B zu sequenzieren und die Lage der Gene für Immunität, frühe und späte Regulation sowie der Toxingene innerhalb des Phagengenoms zu bestimmen. Diesen Untersuchungen zu Folge sind die Toxingene unmittelbar "downstream" des späten Phagenpromotors  $p_R'$  als Teil der sog. "späten" Phagengene vor den Lysisgenen lokalisiert. In weiteren Untersuchungen (Neely und Friedman, 1998b) waren die Autoren in der Lage, die Regulation von frühen und späten Phagengen durch die Antiterminatoren N und Q näher zu spezifizieren. In diesem Zusammenhang wurde klar, daß die Lage der *stx<sub>1</sub>*-Gene in derselben Leserichtung wie die umgebenden Phagengene unmittelbar "downstream" von dem Antiterminatorgen *Q* und dessen Zielsequenz *qut* im späten Promotor  $p_R'$  eine maßgebliche Rolle für die Regulation der Toxingene spielt. Funktionelle Studien zeigten, daß das H19B Q-Protein assoziiert mit seiner Zielsequenz *qut* als Transkriptionsantiterminator am Promotor  $p_R'$  dient. Dieser Antiterminator fördert das Durchlesen von Transkriptionsterminatoren in  $p_R'$  unmittelbar "upstream" der Toxingene, an denen die Transkription zunächst gestoppt wird. Derselbe Effekt konnte auch für den *Stx2*-konvertierenden Phagen 933W, der ein identisches *Q*-Gen und die zugehörigen *qut*-Sequenzen besitzt, demonstriert werden. Die Autoren diskutieren das Q-Protein als einen möglichen Kandidaten für den von Mühldorfer *et al.* (1996) postulierten phagenkodierte toxinregulatorischen Faktor, der nach Induktion des Phagen das *stx<sub>2</sub>-phoA*-Reportergen in pADR-28 anschalten könnte, da in den im Plasmid vorhandenen 2,4

kb "upstream"-Sequenzen des *stx*<sub>2</sub>-Gens auch der Promotor p<sub>R</sub>' enthalten sein müßte. Ein weiteres Indiz für das Q-Protein als der gesuchte Faktor ist die Tatsache, daß trotz der unterschiedlichen beschriebenen Promotoren für *stx*<sub>1</sub> und *stx*<sub>2</sub> (Calderwood und Mekalanos, 1987, de Grandis *et al.*, 1987, Sung *et al.*, 1990) sowohl der Phage 933W als auch der Phage H19B das Reportergen aktivieren kann - dies funktioniert nur, weil die Q-Proteine beider Phagen gleich sind.

Zum selben Schluß sind auch Plunkett *et al.* (1999) gekommen. Sie konnten die *stx*<sub>2</sub>-Gene des Phagen 933W als Teil eines Q-abhängigen späten Transkripts identifizieren und diskutierten das Q-Protein ebenfalls als einen möglichen Kandidaten für den von Mühldorfer *et al.* postulierten phagenkodierten Toxinregulator: Nach der Induktion des Phagen würde es verstärkt exprimiert, könnte dadurch *in trans* die p<sub>R</sub>'-Transkripte auf dem Reporterplasmid pADR-28 antiterminieren und damit die Expression des Reportergens hochregulieren. Nach diesem Modell würde dem von Sung *et al.* (1990) postulierten *stx*<sub>2</sub>-Promotor 118 bp "upstream" von *stxA*<sub>2</sub> nur eine Rolle für die schwache konstitutive Expression der Toxingene während des lysogenen Zustands des Phagen zukommen, bis die Toxinproduktion durch die Phageninduktion und die Verfügbarkeit des stärkeren Promotors p<sub>R</sub>' signifikant gesteigert würde.

Die Kopplung der Produktion von phagenkodierten Genprodukten an die Induktion der betreffenden Bakteriophagen könnte für pathogene Bakterien generell eine Möglichkeit darstellen, die Expression von Virulenzfaktoren zu steigern. Es wurde gezeigt, daß es in einer natürlichen Umgebung bei der Freisetzung von toxinkonvertierenden Phagen zu einer Infektion von bereits vorhandenen, nichtlysogenen Organismen kommen kann (Lazar und Waldor, 1998, Faruque *et al.*, 1998, Acheson *et al.*, 1998), was eine zusätzliche Phagen- und Toxinproduktion und damit eine Virulenzsteigerung des lysogenen Ausgangspathogens zur Folge haben könnte. Demnach sollte es auch möglich sein, durch die "Attenuierung" toxinkonvertierender Phagen, insbesondere von EHEC-Phagen, gleichzeitig einen Virulenzverlust und damit eine Attenuation seiner Trägerstämme zu bewirken. Dies könnte beispielsweise durch das Ausschalten von essentiellen Phagenregulatoren wie das Q-Gen oder von Genen für weiter oben in der Regulationskaskade liegende Regulatoren (N, Cro) geschehen, was die Produktion von Toxin verhindern sollte.



## 2. Attenuierung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli*

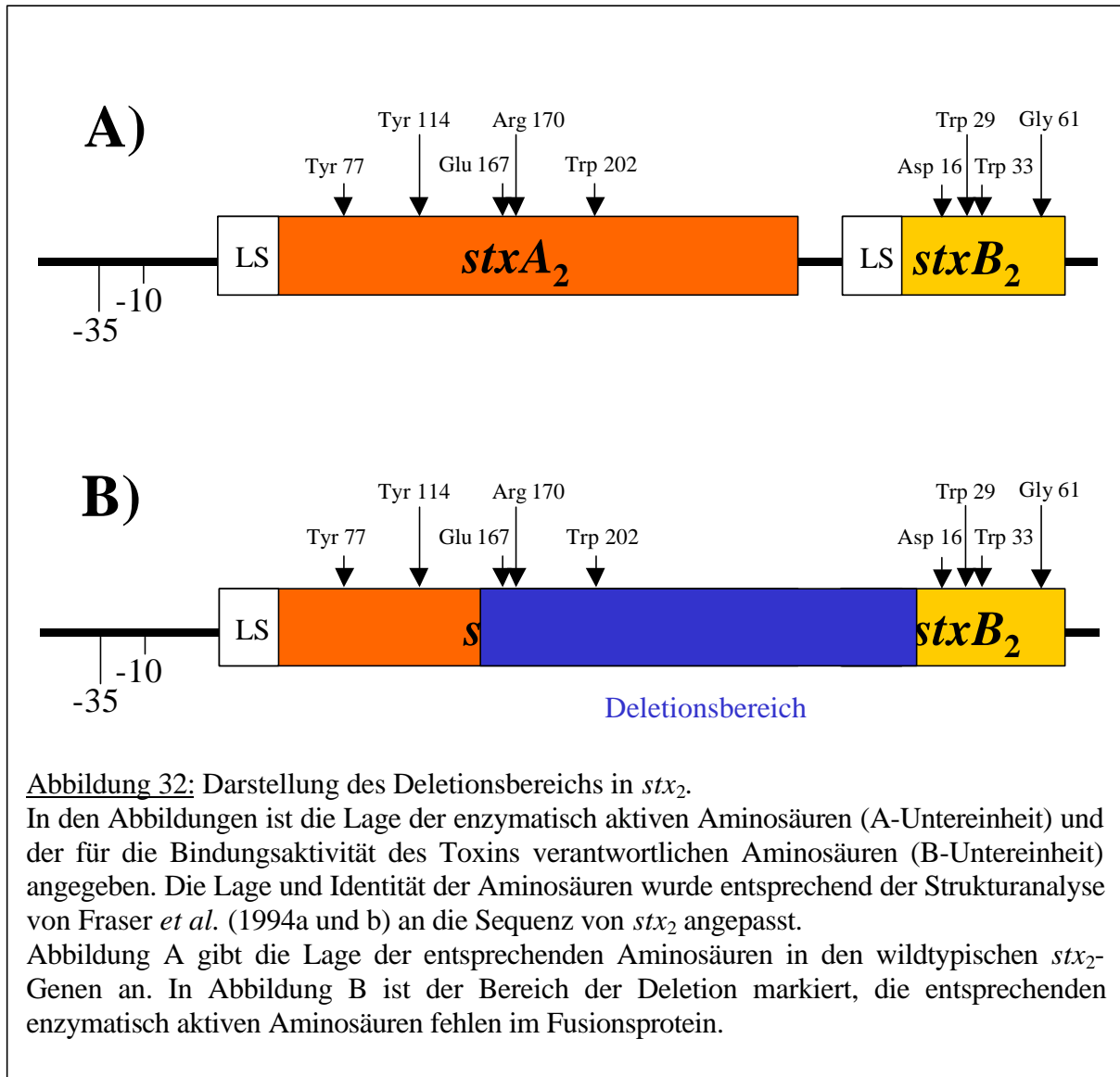
Das Ausschalten phagenkodierter Regulatoren wäre demnach ein wichtiger Schritt im Sicherheitsmanagement von EHEC-Lebendvakzinen, weil es trotz einer Deletion der Toxingene aufgrund der genetischen Promiskuität innerhalb der Gruppe der lambdoiden Phagen jederzeit zu einer Wiederaufnahme der entsprechenden Gene durch Rekombination mit anderen toxinkonvertierenden Phagen kommen kann. Zu einer weiteren Attenuierung könnten auch andere Regulatoren und Virulenzfaktoren ausgeschaltet werden.

### 2.1 Attenuierung von EHEC durch die Deletion des Virulenzfaktors *stx*<sub>2</sub>

Ein wichtiger Schritt für die Attenuierung von EHEC wäre demnach die Deletion der Gene für Shiga-Toxine. In der vorliegenden Arbeit wurde eine isogene *stx*<sub>2</sub>-Mutante im Stx2-produzierenden EHEC-Stamm O157:H7 86-24 hergestellt, die als Ausgangsstamm für die Untersuchung der Rolle von Stx2 in der EHEC-Pathogenese in gnotobiotischen Schweinen und für die Konstruktion eines attenuierten EHEC-Lebendvazins verwendet werden sollte.

Eine isogene Mutante hat im Vergleich zu nicht isogenen Systemen den Vorteil, daß unkontrollierbare Nebeneffekte, die in nicht isogenen Systemen auftreten können, bereits von Grund auf ausgeschlossen sind und gleichzeitig ein im Vergleich zum Wildstamm genetisch weitgehend gleichwertiges System entsteht. Dies würde die Sicherheit eines potentiellen Impfstammes erhöhen. Zum Zeitpunkt des Beginns dieses Projekts lagen für EHEC keinerlei Daten über isogene EHEC-Toxinmutanten vor. Untersuchungen zur Pathogenese von Stx1 waren mit REPEC ("rabbit enteropathogenic *E. coli*"), die mit Stx1-konvertierenden EHEC-Phagen lysogenisiert waren, im Kaninchenmodell durchgeführt worden, was zur Ausprägung einer EHEC-Infektion ähnlichen Krankheit führte (Sjogren *et al.*, 1994). Dieses System ist jedoch nicht mit EHEC vergleichbar, weil die Stämme unterschiedlichen Grundpathotypen angehören (Gunzer *et al.*, 1998). Mehrfach wurde auch der spontane Verlust von Genen für Shiga-Toxine in EHEC beschrieben (Murase *et al.*, 1999, Karch *et al.*, 1992, Schmidt *et al.*, 1994, Reida *et al.*, 1994b, Blanco *et al.*, 1996, Tzipori *et al.*, 1987), der zum Teil direkt auf den Verlust der toxinkonvertierenden Bakteriophagen zurückgeführt werden konnte (O'Brien *et al.*, 1989, Gunzer *et al.*, 1998). Wegen der mangelnden genetischen Identität dieser Toxin-negativen Stämme zu EHEC-Vergleichsstämmen kamen diese Systeme jedoch weder für einen Pathogenitätsvergleich im Schweinmodell noch für eine Attenuierung in Betracht.

Das Ausschalten der *stx<sub>2</sub>*-Gene im vorliegenden Projekt erfolgte über die Deletion eines internen Fragments des *stx<sub>2</sub>*-Genclusters, das 589 bp umfaßt, durch Allelaustausch mit Hilfe eines Suizidvektors. Die Deletion bewirkte die Verkürzung eines *stx<sub>2</sub>*-spezifischen DNA-Fragments um 0,6 kb. Die Deletion umfaßte die C-terminalen 165 Aminosäuren (AS) ab der AS 155 im nichtprozessierten StxA2 (entsprechend der AS 132 im reifen Protein) und beinhaltet die dem enzymatisch aktiven Zentrum angehörigen AS Glu 167, Arg 170 und Trp 202 (Zählung lt. reifem StxA2), was einen kompletten Funktionsverlust der A-Untereinheit zur Folge haben sollte (Fraser *et al.*, 1994a und b, Deresiewicz *et al.*, 1992, Deresiewicz *et al.*, 1993, Hovde *et al.*, 1988, Yamasaki *et al.*, 1991, Skinner und Jackson, 1997, Jackson *et al.*, 1990, Cao *et al.*, 1994). In StxB2 wurde der N-Terminus bis einschließlich der AS 27 (30,3 %) (entsprechend der AS 8 im prozessierten Protein) deletiert, was einen kompletten Verlust der Signalsequenz und acht weiterer AS bewirkte. Die AS Asp 16, Trp 29, Trp 33 und Gly 61, die den für die Rezeptorbindung in Stx1 essentiellen AS Asp 17, Phe 30, Trp 34 und Gly 62 (jeweils im prozessierten Protein) entsprechen, blieben dabei erhalten (Bast *et al.*, 1999, Clark *et al.*, 1996, Stein *et al.*, 1992, Richardson *et al.*, 1997, Perera *et al.*, 1991a). Auf diese Weise wurden 154 AS des N-Terminus der A-Untereinheit inklusive Signalsequenz (48,3 % des Gesamtproteins) mit 62 AS des C-Terminus der B-Untereinheit (69,7 % des Gesamtproteins) fusioniert. Die beiden verkürzten Untereinheiten waren durch einen 5 AS langen Proteinlinker miteinander verbunden, was eine Gesamtgröße des Fusionsproteins von 221 AS ergab, die einem rechnerischen Molekulargewicht von 24,31 kDa entsprachen. Der Deletionsbereich ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



Im Westernblot konnte das Fusionsprotein mit Hilfe eines polyklonalen Stx2-spezifischen Schweineantikörpers nachgewiesen werden, seine detektierte Größe von ca. 24 kDa stimmte mit dem errechneten Molekulargewicht überein. Periplasmaextrakt und Zellkulturüberstand des mutierten EHEC-Stamms, die das Fusionsprotein enthielten, zeigten im [<sup>3</sup>H]Leucin-Inkorporationsassay keinerlei Cytotoxizität auf HeLa-Zellen mehr, was dem Fusionsprotein den Charakter eines Toxoids verleiht.

Die Extrakte wurden auch im Toxin-Sandwich ELISA mit dem für die B-Untereinheit spezifischen monoklonalen Mäuseantikörper 4D1 in Kombination mit polyklonalem Stx2-spezifischem Kaninchenantiserum getestet. In diesem Versuch konnten keine Stx2-spezifischen Strukturen mehr nachgewiesen werden. Der Antikörper 4D1 ist in der Lage, Stx2 zu

neutralisieren, und bindet wahrscheinlich im Bereich der Stx2B-Rezeptorbindungsstelle an das Toxin (Donohue-Rolfe *et al.*, 1989). Der fehlende Nachweis von Stx2-spezifischen Strukturen im ELISA könnte zudem auf eine generelle Strukturveränderung von StxB2 im Fusionsprotein hindeuten, die dessen Bindung an 4D1 verhindert. Die B-Untereinheit ist im Fusionsprotein aller Wahrscheinlichkeit nach nicht mehr in der Lage, sich zu einer Pentamerstruktur wie im nativen Toxin zusammenzulagern. Dies hätte den Verlust der intakten Rezeptorbindungsstellen, die sich innerhalb des intakten Pentamers in den Spalten zwischen den Monomeren befinden (Stein *et al.*, 1992, Richardson *et al.*, 1997), und damit wahrscheinlich auch den Verlust der Bindungsepitope für 4D1 zur Folge. Diese Vermutung wird gestützt von der Tatsache, daß ein Überschuß von Stx2A-B die Intoxikation von HeLa-Zellen durch Stx2 im [<sup>3</sup>H]Leucin-Inkorporationsassay nicht kompetitiv hemmen kann (Oswald, 1997), was auf eine fehlende Bindung des Fusionsproteins an Stx2-spezifische Zelloberflächenrezeptoren schließen läßt. Zum anderen könnte für die negativen Resultate im ELISA jedoch auch der Verlust von Epitopen im Fusionsprotein, die von Kaninchenantiserum erkannt werden, verantwortlich sein, zumal nachfolgende Untersuchungen gezeigt haben, daß Stx2A-B auch im Westernblot nicht mit Stx2-spezifischem polyklonalem Kaninchenantiserum reagiert (S. Oswald, pers. Mitteilung).

Die Reaktion von Stx2A-B mit dem Stx2-spezifischen Schweineantiserum läßt jedoch darauf schließen, daß im Fusionsprotein noch Stx2-spezifische Epitope vorhanden sind, die zumindest vom Schweineimmunsystem erkannt werden können. Ob das Fusionsprotein jedoch wirklich Toxoidcharakter hat, d. h. ob es im Tiermodell selbst immunogen ist und die Bildung von Antikörpern, die natives Stx2 neutralisieren können, induzieren kann, muß noch im Tiermodell getestet werden.

Nicht nur die Charakterisierung des Fusionsproteins, sondern auch des Produzentenstammes *E. coli* TUV86-1 war Ziel dieser Arbeit. So wurden in späteren Untersuchungen der EHEC-Wildstamm O157:H7 86-24 Sm<sup>R</sup> und der Mutantenstamm *E. coli* TUV 86-1 in gnotobiotischen Schweinen miteinander verglichen. Es zeigte sich jedoch, daß der Streptomycin-resistente EHEC-Ausgangsstamm im Schweinmodell nicht mehr pathogen war (A. Donohue-Rolfe, pers. Mitteilung). Dies wurde auf die Einführung der Streptomycinresistenz in den Stamm zurückgeführt. Ähnliche attenuierende Effekte wurden auch für spontan gegen verschiedene Antibiotika resistente *Salmonella*-Stämme beschrieben (Linde, 1981).

Von Gunzer *et al.* (1998) wurden analog zur beschriebenen Methode in einem Streptomycin-sensitiven Vertreter des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 die *stx*<sub>2</sub>-Gene ausgeschaltet, was im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit zu einem kompletten Ausfall der

Produktion Stx2-verwandter Strukturen führte. Auch diese Mutante war weder für HeLa-Zellen noch für Mäuse toxisch (Gunzer *et al.*, 1998). Die Untersuchung dieser Mutante in gnotobiotischen Schweinen demonstrierte, daß die Deletion des Toxins zwar nur einen geringfügigen Einfluß auf die Entwicklung von Durchfall hatte, jedoch die toxinvermittelten extraintestinalen Komplikationen nicht mehr auftraten (Donohue-Rolfe *et al.*, 1999). Dies stünde im Einklang mit früheren Publikationen zur Pathogenese von EHEC in Schweinen, in denen zum einen die Wirkung von intravenös gegebenem Stx2 in erster Linie extraintestinal war (Gannon *et al.*, 1989). Zum anderen war bereits mit Shiga-Toxin-Spontanmutanten festgestellt worden, daß das Toxin für die Entwicklung des Durchfalls nicht essentiell ist (Tzipori *et al.*, 1987, Schmidt *et al.*, 1999). Eine von Fontaine *et al.* (1988) hergestellte *Shigella dysenteriae* *stx*-Mutante wurde durch die Toxindeletion ebenfalls nicht attenuiert. In EHEC war vor allem die Fähigkeit zur Ausprägung von A/E-Läsionen in gnotobiotischen Schweinen für den Durchfall verantwortlich, während toxinbedingte extraintestinale Symptome unabhängig vom Durchfall auftraten (Tzipori *et al.*, 1995). Schließlich konnte von Donohue-Rolfe *et al.* (1999) nachgewiesen werden, daß die Gabe von Stx2-spezifischem Antiserum die Ausprägung extraintestinaler Stx2-Symptome in EHEC-infizierten Schweinen verhindern konnte, was die Wichtigkeit der Entwicklung toxinneutralisierender Antikörper bei einer Vakzinierung gegen EHEC unterstreicht.

Obwohl die Fähigkeit von EHEC-Stämmen zur Ausprägung von Durchfall anscheinend durch die Deletion von Shiga-Toxin 2 nicht vermindert wird, spielt die Deletion der Toxingene für die Entwicklung eines attenuierten EHEC-Stamms eine wichtige Rolle, da auf diese Weise die Ausprägung toxinbedingter extraintestinaler Symptome durch den Impfstamm verhindert wird. Um trotz des Ausschaltens des Toxingens einen Schutz vor toxinbedingten Schädigungen bei einer EHEC-Infektion zu erzielen, ist es von Vorteil, in den Impfstamm ein Shiga-Toxin-Toxoid einzuführen, welches die Produktion von Toxin-neutralisierenden Antikörpern induziert. Das in diesem Projekt hergestellte Stx2A-B-Fusionsprotein könnte der Entwicklung eines derartigen Toxoids dienen.

## **2.2 Attenuierung von EHEC durch die Deletion des Regulators *recA***

Eine weitere Möglichkeit zur Attenuierung von EHEC besteht in der Deletion des Regulatorgens *recA*. RecA nimmt eine zentrale Rolle bei der Induktion lysogener Bakteriophagen ein. Mühldorfer *et al.* (1996) hatten gezeigt, daß die Stx2-Produktion in

Stämmen, die Shiga-Toxin-konvertierende lysogene Phagen tragen, beim Fehlen von *recA* drastisch zurückgeht, was auf die fehlende Phageninduktion zurückgeführt wurde.

Im vorliegenden Projekt wurde der Effekt der Deletion des *recA*-Gens in verschiedenen *E. coli*-Pathotypen auf die *in vivo* Virulenz der betreffenden Stämme demonstriert. Dabei bestätigte sich die Reduktion der Stx2-Produktion in Abwesenheit von RecA auch in EHEC-Wildstämmen. Die *in vivo*-Virulenzpotentiale der Wildtyp-EHEC-Stämme O157:H7 EDL933 und 86-24 und des UPEC-Stamms 536 sowie von deren *recA*<sup>-</sup> Mutanten und der mit *recA in trans* komplementierten Mutanten wurden in sog. „Carworth Farm Lane Petter (CFLP) specific-pathogen-free (SPF) hygienic category outbred mice“ in ihrer intravenösen Letalität und ihrer Lungentoxizität verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die Einführung von *recA*-Mutationen in die EHEC-Stämme nicht nur zu einer Reduktion der Toxinproduktion, sondern auch zu einem Virulenzverlust führte, der durch eine Komplementation mit dem klonierten *E. coli recA*-Gen wieder aufgehoben werden konnte. Die *stx*<sub>2</sub>-EHEC-Mutante TUV86-2 und deren *recA*-Mutante waren in beiden Modellen völlig avirulent. Daraus wurde geschlossen, daß die beobachtete Letalität bei den EHEC-Wildstämmen hauptsächlich auf die Produktion von Shiga-Toxinen zurückzuführen ist, die in den *recA*-Mutanten als Resultat der fehlenden spontanen Phageninduktion stark herabreguliert ist. Das Mäusemodell ist ein Versuchssystem, in dem der neurotoxische Effekt von Shiga-Toxinen beobachtet werden kann und spiegelt Virulenzveränderungen wider, die auf Veränderungen der Toxinproduktion zurückzuführen sind. Es ist jedoch kein geeignetes Modell für eine Reproduktion von Symptomen, die von EHEC-Stämmen bei oraler Aufnahme im Menschen verursacht werden. Die Rolle von RecA in der Pathogenese von EHEC sollte deshalb zusätzlich in Tiermodellen wie dem gnotobiotischen Schweinemodell untersucht werden, in dem spezifischere Aspekte der EHEC-Infektion wie die intestinale Kolonisation reproduziert werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Virulenz von EHEC mit der Stx2-Synthese korreliert ist, die wiederum von der RecA-kontrollierten Phageninduktion abhängig ist. In Übereinstimmung mit den oben genannten Daten wurde die Virulenz des uropathogenen *E. coli*-Stamms 536 durch die *recA*-Deletion nicht beeinflusst. Da der Stamm keine induzierbaren Bakteriophagen enthält, die Virulenzfaktoren oder Virulenzgenregulatoren tragen, ist anzunehmen, daß dessen Virulenzpotential bei einer Deletion von RecA im Vergleich zum Wildstamm nicht beeinträchtigt wird, solange die Lebensfähigkeit des Stamms durch die Mutation unbeeinflusst bleibt. Die präsentierten Daten demonstrieren, daß die Deletion des *recA*-Gens EHEC-Stämme durch eine signifikante Herabregulation der *stx*<sub>2</sub>-Expression, eines ihrer Hauptvirulenzfaktoren, im Mäusemodell

attenuiert. Außerdem ist die Deletion von *recA* in potentiellen Vakzinstämmen als eine wichtige Sicherheitsmaßnahme zu sehen, da durch sie in den attenuierten Stämmen eine Rekombination mit Virulenzgenen von Fremdpathogenen und damit die Reversion der Stämme zu pathogenen Varianten verhindert wird. (Fuchs *et al.*, 1999).

### 2.3 Attenuierung von EHEC durch das Ausschalten der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>

Auch durch das Ausschalten der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>, die in die Regulation von Genen involviert ist und vom *leuX*-Gen kodiert wird, konnte im uropathogenen *E. coli*-Stamm O6:K15:H31 536 eine Attenuierung erzielt werden. Durch die Deletion von *leuX* kam es in diesem Stamm zu einem massiven Rückgang der Produktion von Virulenzfaktoren, der durch den Rückgang der Translation der betreffenden Gene bedingt war.

Zusätzlich zur Transkriptionsregulation kann die Expression von Virulenzfaktoren translational durch die Verfügbarkeit von einzelnen tRNA-Isoakzeptoren, die synonyme Codons für bestimmte Aminosäuren erkennen, beeinflusst werden. Da die Codonzusammensetzung des Genoms nicht uniform ist und sich einzelne Gene oder Gengruppen in ihrem Codongebrauch zum Teil wesentlich vom restlichen Genom unterscheiden, könnte durch kontrollierte Veränderungen im tRNA-Isoakzeptor-Pool die Anwesenheit bestimmter tRNA-Isoakzeptoren auf den Codongebrauch der gerade zu translatierenden Gene optimal abgestimmt werden. Auf diese Weise käme es über das Zusammenspiel zwischen der Verfügbarkeit von tRNA-Isoakzeptoren und dem Vorhandensein der passenden Codons zu einer optimalen Translation der gerade benötigten Proteine, und eine optimale Wachstumsrate wäre gewährleistet (Andersson und Kurland, 1990, Emilsson und Kurland, 1990, Emilsson *et al.*, 1993, Dong *et al.*, 1996, Berg und Kurland, 1997, Kanaya *et al.*, 1999, Pavesi, 1999).

Diese Isoakzeptor-tRNAs werden je nach ihrem Anteil im Isoakzeptorpool als sog. „major“ und „minor“ tRNAs bezeichnet, die einer unterschiedlichen Regulation unterliegen. „Major“ tRNAs erkennen häufig auftretende Codons, während „minor“ tRNAs wie die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> für die Translation seltenerer Codons verantwortlich sind. Der differentielle Codongebrauch wird von der „minor codon usage“-Theorie als genereller Mechanismus beschrieben, der die korrekte Expression spezialisierter Gene durch die selektive Verfügbarkeit von „minor“ tRNAs reguliert (Leskiw *et al.*, 1991, Saier, 1995).

Besonders intensiv wurde der Einfluß der "minor" tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> auf die Virulenz des UPEC-Stammes 536 untersucht (zusammengefaßt in Hacker, 1996). Im Vergleich zu allen anderen Leucyl-tRNAs stellt die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> quantitativ den zweithäufigsten Leucyl-tRNA-Isoakzeptor dar (Dong *et al.*, 1996). Bereits in früheren Arbeiten hatte sich gezeigt, daß die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> für das *E. coli*-Wachstum nicht essentiell ist, weil das entsprechende Codon UUG durch „wobble“-Basenpaarung auch von der tRNA<sub>4</sub><sup>Leu</sup> translatiert wird (Thorbjarnardóttir *et al.*, 1985, Emilsson und Kurland, 1990). Im *leuX*-Gen des UPEC-Stammes 536 ist im wildtypischen Zustand eine von vier Pathogenitätsinseln des Stamms, die Pai II<sub>536</sub>, integriert, auf der die Gene für  $\alpha$ -Hämolyisin (*hly*) und P-verwandte Fimbrien (*prf*) liegen (Blum *et al.*, 1994). Gehen die Pais verloren, so verliert der Organismus die inselkodierte Pathogenitätsfaktoren und seine *in vivo* Virulenz (Knapp *et al.*, 1986).

Jedoch auch nicht von der Deletion direkt betroffene Virulenzfaktoren werden nicht mehr oder nur noch in vermindertem Ausmaß exprimiert, wie es beispielsweise für S-Fimbrien, Typ 1-Fimbrien, die Produktion von Enterobaktin, die Serumresistenz, die Motilität des Stamms und dessen Flagellierung nachgewiesen wurde (Knapp *et al.*, 1986, Ritter *et al.*, 1995). Nachfolgende Untersuchungen haben belegt, daß die Reduktion der S-Fimbrien-Expression direkt mit dem Verlust der *prf*-Regulatorgene durch die Deletion der Pai II<sub>536</sub> zusammenhängt, da diese im Wildstamm die S-Fimbrien-Expression stimulieren (Morschhäuser *et al.*, 1994).

Weiterhin wurde gezeigt, daß bei der Deletion der Pais die Gene für die tRNAs, in die sie inseriert sind, zerstört werden und der Stamm die entsprechenden intakten tRNAs nicht mehr produzieren kann (Blum *et al.*, 1994). Im UPEC-Stamm 536 wurde nachgewiesen, daß der Verlust aller weiteren nicht-inselkodierte Virulenzfaktoren auf den Verlust dieser tRNAs zurückzuführen ist (Ritter *et al.*, 1995). Die Leucin-spezifische tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> ist beispielsweise in der Lage, die Expression von Typ 1-Fimbrien, Enterobaktin und Flagellen sowie die Serumresistenz in den genannten Komplementationsversuchen wieder auf wildtypisches Niveau anzuheben. Auch die *in vivo*-Virulenz konnte auf diese Weise wieder restauriert werden, und zwar sowohl bei intravenöser Injektion in Mäuse als auch in einem Ratten-Pyelonephritis-Modell (Ritter *et al.*, 1995, Susa *et al.*, 1996). Die Fähigkeit der Komplementantenstämme zur Adhärenz an primäre Human-Nierentubulusepithelzellen unterlag einem ähnlichen tRNA-abhängigen Einfluß (Susa *et al.*, 1996). Diese Adhärenz wurde auf die Expression von Typ 1-Fimbrien zurückgeführt, die in den Komplementanten als einzige Fimbrien exprimiert werden können und die nachweislich einer *leuX*-abhängigen Regulation unterliegen (Ritter *et al.*,



1997). Ein ähnlicher Effekt der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> auf die Expression von Typ 1-Fimbrien konnte im Humanfäkalisolat *E. coli* F-18 nachgewiesen werden (Burghoff *et al.*, 1993, Newman *et al.*, 1994a). Hier ist diese tRNA auch für eine verstärkte Darmkolonisationsfähigkeit und für das Überleben während der stationären Phase unter Verwertung von Coecum-Mucus-Nährstoffen verantwortlich (Newman *et al.*, 1994b, Burghoff *et al.*, 1993).

Anhand eines Systems mit einer isogenen *leuX*-Mutante des UPEC-Stamms 536 wurde außerdem gezeigt, daß die Anwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> für das kompetitive Überleben in Blasenmucus von Mäusen einen Selektionsvorteil verschafft (Dobrindt *et al.*, 1998). Auch die *in vivo*-Virulenz derselben isogenen Mutante im Mäusemodell (intravesikale Infektion) ist stark reduziert (L. Emödy, pers. Mitteilung). Generell kann gefolgert werden, daß die Deletion von *leuX* eine Attenuierung des UPEC-Stamms 536 bewirkt.

Vor diesem Hintergrund sollte im Stx2-produzierenden EHEC-Wildstamm O157:H7 86-24 untersucht werden, ob die Deletion von *leuX* die Virulenz des Stammes insgesamt sowie die Expression einzelner Pathogenitätsfaktoren im Speziellen beeinflusst. So wurde zunächst die *leuX*<sup>-</sup> Mutante *E. coli* 86-24Δ4.4 des genannten EHEC-Wildstamms hergestellt und nachgewiesen, daß die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> in diesem Stamm nicht mehr produziert wird. Diese Mutante wurde mit dem plasmidkodierten, wildtypischen *leuX*-Gen des UPEC-Stamms 536 (Ritter *et al.*, 1995), das dem des EHEC-Stamms zu 100 % homolog ist, komplementiert und die Komplementante *E. coli* 86-24Δ4.4(pGBB51) benannt. Anhand dieser Stämme und des analog hergestellten Vektorkontrollstamms *E. coli* 86-24Δ4.4(pSU2716) wurde die Expression von Pathogenitätsfaktoren in den *leuX*<sup>+</sup> und *leuX*<sup>-</sup> EHEC-Stämmen untersucht (Tabelle 22). Außerdem wurde der Anteil der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons an den Leucin-Codons in den Genen der EHEC-Virulenzfaktoren ermittelt (siehe Tabelle 21).

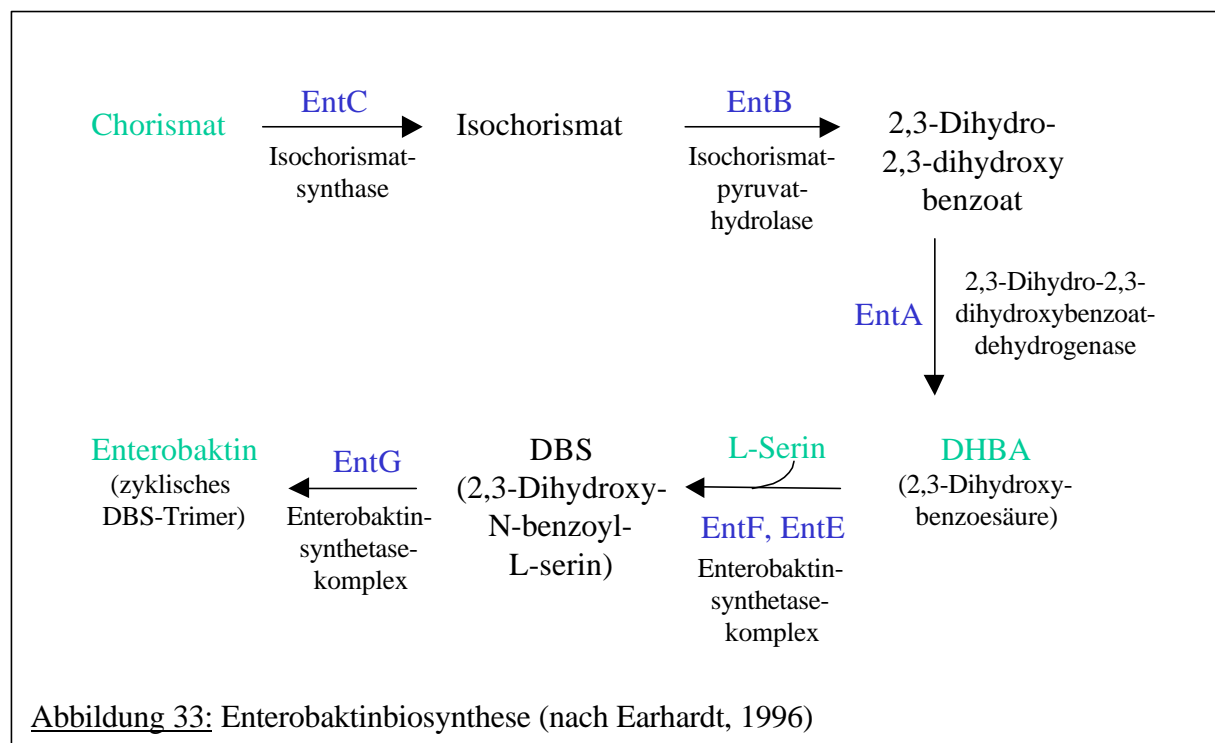
**Tabelle 22:** Einfluß der tRNA<sub>5<sup>Leu</sup></sub> auf die Expression von EHEC-Virulenzfaktoren und von weiteren untersuchten Faktoren und Eigenschaften.

getesteter (Virulenz-)Faktor:	Auswirkung der Deletion von <i>leuX</i> :
Schwärmaktivität, Flagellenproduktion	Reduktion
Enterbaktinproduktion	Reduktion
Mit Typ I-Fimbrien-spezifischem Serum kreuzreaktives Antigen	Reduktion
diverse Membranproteine	Reduktion
Häminverwertung	Reduktion
Stx2-Produktion	Kein Einfluß
<i>in vivo</i> -Virulenz im Mäusemodell	Kein Einfluß
Enterohämolyse	Steigerung
Intiminproduktion	Steigerung

Der Vergleich zwischen den *leuX*<sup>+</sup> und *leuX*<sup>-</sup> Derivaten von EHEC O157:H7 86-24 zeigte einen deutlichen Einfluß der tRNA<sub>5<sup>Leu</sup></sub> auf die Motilität des Stammes auf Schwärmagarplatten. Wie im UPEC-Stamm 536 war auch in den *leuX*<sup>-</sup> EHEC-Derivaten die Motilität der Stämme im Vergleich zu den *leuX*<sup>+</sup> Stämmen stark herabgesetzt. Im Westernblot wurde in den *leuX*<sup>-</sup> Stämmen eine starke Reduzierung der Produktion des H7-Flagellins FliC nachgewiesen. Demnach könnte die herabgesetzte Motilität der *leuX*-Mutante das Resultat einer reduzierten Flagellierung sein. Das Gen für die Hauptstrukturuntereinheit der Flagelle *fliC* enthält nur zwei tRNA<sub>5<sup>Leu</sup></sub>-spezifische TTG-Codons, so daß davon auszugehen ist, daß der drastische Effekt der *leuX*-Deletion auf die Flagellierung nicht allein auf eine verringerte Translation der mRNA zurückzuführen ist, wie es auch für den UPEC-Stamm 536 angenommen wird (Ritter *et al.*, 1995, Macnab, 1992). Im Gegensatz zu *fliC* enthält der positive Regulator für die Flagellenbildung *flhC* 26,3 % tRNA<sub>5<sup>Leu</sup></sub>-spezifische Leucincodons (Ritter *et al.*, 1995, Bartlett *et al.*, 1988). Für das Gen *fimB*, das für einen positiven Regulator der Typ 1-Fimbrien-Expression kodiert und einen ähnlich hohen Anteil an TTG-Codons aufweist wie *flhC*, wurde ein tRNA<sub>5<sup>Leu</sup></sub>-vermittelter Einfluß sowohl auf die Translation der mRNA als auch auf die Transkription des Gens demonstriert, was wiederum Auswirkungen auf die Fimbrienbildung hatte (Ritter *et al.*, 1997). Der tRNA<sub>5<sup>Leu</sup></sub>-abhängige Effekt auf die Regulation der Flagellenexpression könnte auf einen analogen Mechanismus zurückzuführen sein. Die Rolle

der Flagellierung für die Virulenz von EHEC ist jedoch wahrscheinlich nicht von derselben Wichtigkeit wie für UPEC, da auch nichtmotile Vertreter der O157-Serogruppe potente Verursacher von EHEC-Epidemien sind (Paton und Paton, 1998). Außerdem wurde eine Beteiligung von H7-Flagellen an der Adhärenz an Kulturzellen ausgeschlossen (Sherman und Soni, 1988).

Auch die Fähigkeit von *E. coli* zur Beschaffung von Eisen unterliegt einer Kontrolle durch die  $tRNA_5^{Leu}$ . Durch Kreuzfütterungsversuche mit geeigneten Indikatorstämmen für das Katecholatsiderophor Enterobaktin wurde nachgewiesen, daß die  $leuX^+$  EHEC-Stämme Enterobaktin sezernieren und einen Katecholatsiderophor-spezifischen Indikatorstamm zum Wachstum anregen. In  $leuX^-$  Stämmen hingegen ist die Katecholatsiderophor-Sekretion stark eingeschränkt. Stattdessen scheiden diese Stämme DHBA (2,3-Dihydroxybenzoesäure), ein Intermediat der Enterobaktinbiosynthese, aus. In UPEC tritt nachweislich derselbe Effekt auf (Ritter *et al.*, 1995). Für eine Interpretation dieses Effekts muß die Enterobaktinbiosynthese als Ganzes betrachtet werden (siehe Abbildung 33). Der erste Teil der Biosynthese umfaßt die Umwandlung von Chorismat zu DHBA und wird nacheinanderfolgend von den Enzymen EntC, EntB/G und EntA katalysiert. Als zweites erfolgt die Synthese von Enterobaktin aus DHBA und L-Serin. Diese Reaktionen werden in einem membranassoziierten Enterobaktin-Synthetase-Komplex bestehend aus den Enzymen EntD, EntE, EntF und EntB/G durchgeführt, wobei letzteres ein bifunktionales Enzym ist (zusammengefaßt in Earhardt, 1996, Hantash *et al.*, 1997).



Aus der Tatsache, daß *leuX*<sup>-</sup> Stämme DHBA ausscheiden, läßt sich schließen, daß einer der Biosyntheseschritte im Enterobaktin-Synthetase-Komplex von dem Ausfall der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> betroffen ist. Die Gene fast aller an der Bildung dieses Komplexes beteiligten Enzyme weisen erhöhte Anteile an tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons auf: 14,8 % (*entB/G*), 15 % (*entE*) und 13,1 % (*entF*). Diese Codonanteile sind nur leicht erhöht, so daß keine dramatischen Auswirkungen auf die Expression der einzelnen Gene *in vivo* zu erwarten wären, falls dieser Effekt allein auf eine verminderte Translation zurückzuführen sein sollte. Dadurch, daß drei Enzyme gleichzeitig davon betroffen wären, könnte es jedoch zu einem additiven, drastischeren Effekt auf die Enterobaktinbiosynthese kommen. Alternativ dazu wäre es auch möglich, daß über Mechanismen, die der Translation vorgeschaltet sind, eine Herabregulation der Produktion des Synthetase-Komplexes geschieht, was weitere Regulationseffekte nicht ausschließt. Die Gene für die Aufnahme von Fe-Enterobaktin in die Zelle werden teilweise mit denen für die Enterobaktinsynthese koexprimiert (Earhart, 1996) und enthalten zum Teil erhöhte Anteile an tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons (*fepA*: 18,5 %, *fepC*: 18,2 %), so daß es möglich ist, daß sich die *leuX*-Deletion auch auf den Bereich der Eisenaufnahme auswirkt.

Zusätzlich zu Enterobaktin besitzen EHEC ein Häminaufnahmesystem, an dem das eisenregulierte äußere Membranprotein ChuA, der Häminrezeptor, beteiligt ist (Mills und Payne, 1995 und 1997, Torres und Payne, 1997). *leuX*<sup>-</sup> Derivate des EHEC-Stammes O157:H7 86-24 waren im Gegensatz zu den *leuX*<sup>+</sup> Stämmen nicht mehr in der Lage, auf Agar, in dem freies Eisen komplexiert war und dem Hämin als einzige Eisenquelle zugesetzt wurde, unter den gegebenen Bedingungen zu wachsen. Das Gen für den Häminrezeptor *chuA* enthält einen erhöhten Anteil an tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons (15,7 %). Dies könnte die verminderte Häminaufnahmefähigkeit durch eine beeinträchtigte Translation der *chuA*-spezifischen mRNA wegen des Fehlens der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> erklären. Welchen Einfluß dieser Effekt auf die Gesamtpathogenität von EHEC hat, kann noch nicht abgeschätzt werden, weil die Rolle dieses postulierten Pathogenitätsfaktors bisher weder in EHEC noch im verwandten System in *S. dysenteriae* genauer definiert werden konnte (Mills und Payne, 1997). Es wurde auch in UPEC-Stämmen, u. a. im Stamm 536, ein homologes Häminaufnahmesystem entdeckt, für das ein derartiger tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-abhängiger Effekt ebenfalls möglich ist (Wykoff *et al*, 1998, G. Nagy, pers. Mitteilung).

Ferner sollte für den EHEC-Stamm O157:H7 86-24 geklärt werden, ob die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> die Expression von Proteinen der inneren und äußeren Membran, die möglicherweise an der

EHEC-Virulenz beteiligt sind, beeinflusst. So wurde festgestellt, daß bei Abwesenheit der  $tRNA_5^{Leu}$  in der äußeren Membran ein ca. 29 kDa großes Protein nicht mehr gebildet wird. In der inneren Membran kommt es zum Ausfall zweier Proteine, die Größen von 40 kDa und 63 kDa aufweisen. Diesen Proteinen konnten bisher keinen Funktionen zugeordnet werden. In die Virulenz von EHEC involvierte Membranproteine wären jedoch zum Beispiel Transportproteine wie die Aufnahmesysteme für Fe-Enterobaktin oder Hämin. Kürzlich wurde eine Beteiligung von Membranproteinen an der Etablierung von Säureresistenz in *E. coli* O157:H7-Stämmen postuliert (Jordan *et al.*, 1999). Auch Adhäsine, seien es fimbrielle oder nichtfimbrielle wie Intimin, sind in der äußeren Membran lokalisiert oder dort verankert (Soto und Hultgren, 1999, Yu und Kaper, 1992, Louie *et al.*, 1993, McKee und O'Brien, 1995, Sherman und Soni, 1988, Zhao *et al.*, 1996). LPS scheint in EHEC-Stämmen nicht in die Adhärenz involviert zu sein (Sherman und Soni, 1988, Bilge *et al.*, 1996, Cockerill III *et al.*, 1996). Im UPEC-Stamm 536 wurde ein Einfluß der  $tRNA_5^{Leu}$  auf die Expression eines 60 kDa- und eines 100 kDa-OMP unbekannter Funktion beobachtet (Ritter, 1996). Außerdem wird vermutlich die Serumresistenz, die auch unter der Kontrolle der  $tRNA_5^{Leu}$  steht, unter anderem von äußeren Membranproteinen vermittelt (Ritter, 1996). Für den *E. coli* Stamm F-18, ein Humanfäkalisolat, gibt es indirekte Hinweise, daß die  $tRNA_5^{Leu}$  möglicherweise ebenfalls einen Einfluß auf die Expression von OMPs ausübt (Burghoff *et al.*, 1993, Newman *et al.*, 1994).

Auch die Bildung von Fimbrien ist für EHEC mehrfach berichtet worden, wobei diese Adhäsine in EHEC kein so weit verbreitetes Phänomen wie in anderen *E. coli*-Gruppen darstellen (Ashkenazi *et al.*, 1991, Winsor *et al.*, 1992, Sherman *et al.*, 1987, Karch *et al.*, 1987, Borie *et al.*, 1997). Da im EHEC-Stamm O157:H7 Typ I-Fimbrien-spezifische Gene nachgewiesen worden waren und bekannt war, daß im UPEC-Stamm 536 die Typ 1-Fimbrienexpression von der  $tRNA_5^{Leu}$  beeinflusst wird (Ritter *et al.*, 1995, 1997), wurde in Immunodotblots getestet, ob entsprechende Antigene auch auf EHEC nachweisbar waren. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen Typ 1-Fimbrien von *E. coli* IHE3034 wurde ein Antigen detektiert, das in den  $leuX^-$  Stämmen schwächer ausgeprägt war als in den  $leuX^+$  Stämmen. Auf Westernblots mit Gesamtzellysaten war jedoch keine Bande für eine Typ 1-Fimbrien spezifische Hauptuntereinheit, die bei einer Größe von ca. 15 bis 20 kDa zu erwarten gewesen wäre, nachzuweisen. Stattdessen trat bei ca. 70 kDa ein stabiles Antigen in Erscheinung, das  $leuX$ -abhängig exprimiert wurde und nur in den Derivaten des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 vorhanden war. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine mit dem Serum kreuzreaktive Struktur, die mit der äußeren Membran assoziiert ist, da sie auch in Fimbrienextrakten

nachgewiesen wurde. Eine Funktion konnte dieser Struktur jedoch nicht zugeordnet werden. Auch phänotypisch konnten anhand einer Mannose-sensitiven Agglutination von *Saccharomyces cerevisiae* keine Typ 1-Fimbrien nachgewiesen werden, was mit einer erst kürzlich erschienen Publikation übereinstimmt, in der für EHEC des Serotyps O157 im Gegensatz zu anderen Serotypen trotz Anwesenheit der entsprechenden Gene keine Produktion von Typ 1-Pili nachgewiesen werden konnte (Enami *et al.*, 1999).

Ferner wurde der Einfluß der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> auf die Expression des Adhärenzfaktors Intimin exemplarisch für LEE-kodierten Gene untersucht. Das Gen *eae* enthält den hohen Anteil von 20,8 % an tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Leucincodons, und die Gene für die LEE-kodierten sezernierten Proteine EspB und Tir enthalten noch höhere Anteile von 25,9 % und 22,5 %. Aufgrund dieser hohen Anteile an tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons sollte man laut der "minor codon usage"-Theorie eine Reduktion der Expression dieser Gene in der EHEC-*leuX*-Mutante erwarten. Für Intimin ist jedoch das Gegenteil der Fall: In Abwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> wird die Expression dieses Proteins deutlich verstärkt. Dies könnte auf die Beeinflussung eines der *eae*-Translation vorgeschalteten Regulationsmechanismus durch die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> zurückzuführen sein, der sich beispielsweise auf der Ebene von Regulatorproteinen abspielen könnte. Entsprechende Aktivatorproteine (Per, Ler) wurden für EPEC beschrieben, wobei der LEE-kodierte Faktor Ler auch in EHEC für die Regulation der LEE-kodierten Gene verantwortlich ist (Mellies *et al.*, 1999). Weitere neuere Arbeiten liefern Hinweise dafür, daß in EHEC möglicherweise außerdem ein nicht-LEE-kodierter Faktor die Expression der LEE-kodierten Gene aktiviert (Elliott *et al.*, 1999). Im UPEC-Stamm 536 wurde eine Veränderung der Transkription des Typ 1-Fimbrien-spezifischen Regulators *fimB* durch die Deletion von *leuX* beschrieben (Ritter *et al.*, 1997), so daß eine mögliche Beeinflussung weiterer Regulatoren durch die Anwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> nicht ausgeschlossen erscheint. Ob neben der Expression von *eae* auch die der anderen LEE-kodierten Gene von der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> beeinflusst wird, verbleibt abzuklären. Ebenso ist noch unklar, ob sich die Abwesenheit dieser tRNA auch auf die Adhärenz der Stämme an Darmepithelzellen auswirkt.

Die Expression von Enterohämolyisin in den *leuX*<sup>+</sup> und *leuX*<sup>-</sup> Derivaten des EHEC-Stamms O157:H7 86-24 wurde anhand der Größe von Hämolysehöfen auf Schafblutagarplatten abgeschätzt. Hierbei zeigte sich, daß das Fehlen der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> zur Ausbildung größerer Hämolysehöfe führte als bei Anwesenheit der tRNA. Außerdem war in den Komplementantenstämmen, die beide Derivate des Plasmids pSU2716 enthielten, generell eine stärkere Hämolyse zu beobachten als im Vergleichsstammpaar ohne das Plasmid. Der hier

beobachtete Effekt zeigt demnach eine gegenteilige Wirkung der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> auf die Expression von Enterohämolysin im Vergleich zum  $\alpha$ -Hämolysin. Untersuchungen mit dem  $\alpha$ -Hämolysin des UPEC-Stamms 536 haben gezeigt, daß es bei Abwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> zu einer Reduktion der Transkription des *hly*-Operons kommt, was zu einer Verzögerung der HlyA-Sekretion und zu einer Verringerung von dessen extrazellulärer Konzentration führt. Für die verringerte Sekretion wird die reduzierte Expression der Transportproteine HlyB und HlyD infolge der verringerten Transkription des gesamten Operons verantwortlich gemacht (Dobrindt, 1999). Enterohämolysin hingegen wird in Abwesenheit von der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> verstärkt ausgeschieden. Auf dem jetzigen Niveau der Untersuchungen kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Ausprägung größerer Hämolysehöfe bei tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-Mangel auf eine verstärkte Expression der entsprechenden Gene oder auf eine stärkere EHEC-HlyA-Sekretion unter Bildung äquivalenter Hämolysinmengen zurückzuführen ist. Die Gene für die Transportproteine EHEC-HlyB und EHEC-HlyD enthalten beide erhöhte Anteile an tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons (15,7 % bzw. 15,6 %), so daß es unter Abwesenheit dieser tRNA eher zu einer Verminderung der spezifischen Hämolysinsekretion kommen sollte, was im Gegensatz zu den beobachteten Daten steht. Die verstärkte Sekretion könnte auch durch eine mögliche generelle Destabilisierung der Zellmembranen durch die Veränderung der Expression von Proteinen der inneren und äußeren Membran aufgrund der Deletion von *leuX* (s. oben) bedingt sein. Ein ähnliches Phänomen könnte auch für die stärkere Sekretion von Hämolysin in den beiden Komplementantenstämmen, die sich nur in der Anwesenheit des pSU2716-Derivats und dem darauf befindlichen *cat*-Gen vom Vergleichsstammpaar unterscheiden, verantwortlich sein.

Weiterhin könnte die Enterohämolysinproduktion durch tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-abhängige Regulatoren beeinflusst werden. Das Protein Hha ist ein negativer Regulator für die  $\alpha$ -Hämolysinproduktion, dessen Gen in *E. coli* K-12 einen Anteil von ca. 15 % tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons aufweist (Nieto *et al.*, 1991, Mikulskis und Cornelis, 1994, Mouriño *et al.*, 1996). Demnach könnte theoretisch eine Verringerung der *hha*-Expression durch eine verminderte Translation bei Abwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> eine Verstärkung der EHEC-*hly*-Transkription zur Folge haben. Im UPEC-Stamm 536 ist bei Abwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> zwar kein Anstieg der  $\alpha$ -Hämolysin-Produktion zu beobachten (Dobrindt, 1999), jedoch könnte dieser postulierte Effekt für die Expression von Enterohämolysin eine Rolle spielen. Der Antiterminator RfaH bewirkt im  $\alpha$ -Hämolysinoperon normalerweise die Transkription der Gene für die Transportproteine HlyB und HlyD und zusätzlich eine gewisse Erhöhung der Transkriptmenge (Bailey *et al.*, 1996 und 1997, Leeds und Welch, 1996 und 1997). Trotz des Anteils von ca. 20 % tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen

Codons im *rfaH*-Gen wurde im UPEC-Stamm 536 eine verstärkte Expression des Antiterminators in Abwesenheit des *leuX*-Gens beschrieben (Dobrindt, 1999). Falls dies auch für EHEC zutrifft, könnte durch die Erhöhung der *rfaH*-Expression eine verstärkte Transkription des gesamten EHEC-*hly*-Operons, insbesondere aber der Gene für die Transportproteine die Folge sein. Dies könnte die stärkere Enterohämolysinproduktion und/oder -sekretion in den *leuX*-negativen EHEC-Stämmen erklären.

Die Messung der Produktion von Stx2 im EHEC-Stamm O157:H7 86-24 und dessen *leuX*-Mutante ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen. Der erhöhte Anteil von 16,7 % tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-spezifischen Codons in *stxB*<sub>2</sub>, der sich auf ein einziges Codon beschränkt, scheint sich nicht auf die Translationseffizienz auszuwirken, zumal das Codon TTG durch „wobble“-Basenpaarung auch von der tRNA<sub>4</sub><sup>Leu</sup> erkannt und translatiert wird (Emilsson und Kurland, 1990). Bei der Sequenzierung des Stx2-konvertierenden Phagen 933W wurden drei seltene tRNA-Gene im Phagengenom identifiziert (*argN*, *argO* und *ileZ*). Die Analyse des Codongebrauchs in den Genen der phagenkodierte Virulenzfaktoren *stx*<sub>2</sub> und *stk* zeigte, daß in den Genen die entsprechenden Codons in zum Teil hohen Anteilen vorhanden waren, woraus auf eine Rolle dieser tRNAs für die effiziente Expression der Virulenzgene geschlossen wurde (Plunkett III *et al.*, 1999). Die Anwesenheit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> scheint hingegen keinen Einfluß auf die Expression von *stx*<sub>2</sub> auszuüben.

Die Gesamtvirulenz von EHEC O157:H7 86-24 im Mäusemodell, die in erster Linie auf die Wirkung von Shiga-Toxinen zurückzuführen ist, ist in den *leuX*<sup>-</sup> Stämmen weder im Lungentoxizitätsassay, noch bei intravenöser Infektion signifikant beeinträchtigt. Lediglich der Vektorkontrollstamm 86-24Δ4.4(pSU2716) zeigt bei intravenöser Infektion eine leichte Reduktion seiner Virulenz, was auch auf eine eventuelle Destabilisierung des Stammes bei Anwesenheit des Plasmids gekoppelt mit der Abwesenheit von *leuX* zurückzuführen sein könnte. Dies könnte sich möglicherweise auf die Virulenz oder Vitalität des Stammes auswirken. Dazu ist anzumerken, daß das Mäusemodell nur den Aspekt der Neurotoxizität der von EHEC produzierten Shiga-Toxine in Form von Schädigungen des ZNS mit Gliedmaßenlähmung und Todesfolge widerspiegelt (Keusch und Jacewicz, 1975), aber in keinsten Weise ein Modell für den natürlichen Infektionsprozeß bei oraler Infektion darstellt. Um den Einfluß der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> auf die Gesamtpathogenität der EHEC-Stämme abschätzen zu können, müßten die Stämme in einem oralen Infektionsmodell wie beispielsweise in gnotobiotischen Schweinen getestet werden. Für die Kolonisation des Darms spielen normalerweise Adhäsine und möglicherweise auch Flagellen und Eisenaufnahmesysteme, die,



wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>-abhängig exprimiert werden, eine wichtige Rolle. Möglicherweise könnte sich auch die Fähigkeit zum Überleben in Darmmucus, die in *E. coli* Fäkalisolaten von der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> beeinflusst wird (Newman *et al.*, 1994b), auf die Virulenz von EHEC auswirken, so daß im Moment nicht abzuschätzen ist, wie gut die EHEC-*leuX*-Mutante trotz erhöhter Expression von Intimin den Darm besiedeln kann. Erst nach der Durchführung entsprechender Untersuchungen wären definitive Aussagen über eine Veränderung der Stämme in ihrer Virulenz möglich.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die Anwesenheit des *leuX*-Gens durchaus einen Einfluß auf die Expression von Virulenzfaktoren in EHEC ausübt, der dem Einfluß auf UPEC-Virulenzfaktoren zu ähneln scheint. Es sind auch EHEC-spezifische Effekte zu beobachten, wie beispielsweise der Einfluß der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> auf die Häminverwertung, auf die Enterohämolyse oder auf die Expression von Intimin. Wie bereits in den Arbeiten von Dobrindt (1999) gezeigt wurde, ist der Einfluß der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> nicht auf die Optimierung der Translation bei der Expression von Virulenzfaktor-Strukturgenen beschränkt. Im Gegenteil, es treten bei der Expression von Genen mit hohen Anteilen an TTG-Codons auch regulatorische Effekte auf, die nicht durch die „minor codon usage“-Theorie erklärt werden können und dieser zu widersprechen scheinen. Diese Regulationseffekte müssen sich auf Ebenen abspielen, die der Translation der betroffenen Gene vorgeschaltet sind. Bisher sind noch keine Faktoren für eine aktive Regulation des *leuX*-Gens bekannt, was gegen eine aktive regulatorische Funktion der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> spricht (Dobrindt, 1999). Auch eine Korrelation zwischen der zeitlichen Expression von Virulenzfaktoren und der Verfügbarkeit der tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> wurde nicht nachgewiesen. Demnach scheint die Rolle dieser tRNA eher die eines Modulators für korrekte Genexpression als die eines aktiven, zentralen Virulenzgenregulators zu sein (Dobrindt, 1999). Die Ergebnisse für EHEC bestätigen diese Annahme.

Auch die Beeinträchtigung der Pathogenität durch die Deletion von *leuX* ist in EHEC nicht so eindeutig wie in UPEC, da die betroffenen Virulenzfaktoren bei der Etablierung von EHEC-Infektionen nicht denselben Stellenwert einnehmen wie bei UPEC-Infektionen. Die Expression der Hauptvirulenzfaktoren Shiga-Toxin und Intimin werden durch die Deletion von *leuX* nicht vermindert, was der Deletion von *leuX* für die Entwicklung eines EHEC-Lebendvakzins wahrscheinlich nicht dieselbe Wichtigkeit verleiht wie beispielsweise die Deletion des Shiga-Toxin-Gens oder von LEE-kodierten Genen. Letztlich kann die Frage nach der Auswirkung einer *leuX*-Deletion auf die Gesamtpathogenität von EHEC nur durch den

Vergleich von *leuX*-negativen und wildtypischen EHEC-Stämmen in einem oralen Infektionsmodell geklärt werden.

### 3. Ausblick

Zum Abschluß der Arbeit möchte ich ein Modell für die Attenuierung von EHEC-Stämmen zur Konstruktion eines Lebendvakzins entwerfen. Hierfür könnte eine Kombinationsstrategie verfolgt werden, die die Deletion von Virulenzfaktor-Strukturgenen und zentralen Regulatoren sowie die Einführung von Systemen für die Sicherheit der potentiellen Impfstämme beinhaltet.

Die Attenuierung sollte ausgehend von der Deletion zentraler EHEC-Virulenzfaktoren durchgeführt werden. Hierzu zählen in erster Linie die Virulenzfaktoren, die an der Etablierung von A/E-Läsionen im Darm und damit an der Entwicklung des Durchfalls maßgeblich beteiligt sind, und Shiga-Toxin, das für die Ausprägung der lebensgefährlichen extraintestinalen Symptome verantwortlich ist. Um an Hand des Impfstammes trotz der Inaktivierung der Shiga-Toxin-Gene eine protektive Immunantwort gegen das Toxin erzielen zu können, sollte ein Shiga-Toxin-Toxoid wie das in dieser Arbeit charakterisierte Stx2A-B-Fusionsprotein in den Impfstamm integriert werden. Auch die Enterohämolysingene könnten für die Attenuierung deletiert werden.

Des Weiteren sollten zusätzlich zentrale Regulatoren ausgeschaltet werden. Als EHEC-spezifische Virulenzregulatoren kämen hierfür beispielsweise der Regulator Ler und andere an der Regulation der LEE-kodierten Gene beteiligte Faktoren in Frage sowie phagenspezifische Regulatoren, die direkt oder indirekt die Toxinexpression steuern. Außerdem bieten sich hierfür Regulatoren an, die für die Steuerung von weiteren, nicht EHEC-spezifischen Virulenzfaktoren (Fur, FlhC, RfaH, Hha) oder von zentralen Stoffwechselprozessen (Cya, Crp) verantwortlich sind. Die Deletion dieser Regulatoren hätte zur Folge, daß ganze Genregulationskaskaden funktionsuntüchtig gemacht würden, was EHEC in ihrer Virulenz beeinträchtigen sollte.

Für die Gewährleistung der gentechnischen Sicherheit des Lebendvakzins sollten zusätzlich sog. "Suizidgene", die das Überleben des Stamms in der Umwelt verhindern, in den potentiellen Vakzin Stamm eingeführt werden (z. B. "host killing"). Schließlich sollten Gene ausgeschaltet werden, die an der Rekombination beteiligt sind, wie beispielsweise *recA*. Auf diese Weise würde zum einen die Integration von Fremd-DNA in den Lebendvakzin Stamm und

damit eine Reversion des Stamms zur Pathogenität verhindert werden, zum anderen würde die dadurch bedingte Inhibition der DNA-Reparatur den Stamm noch weiter in seiner generellen Lebensfähigkeit beeinträchtigen. Ein derartiger Vakzinstamm könnte dann für die Vakzinierung von Menschen oder von Tieren, die an der Übertragung von EHEC in die Nahrungskette beteiligt sind, eingesetzt werden.