

Interferenz des probiotischen *Escherichia coli* Stammes Nissle
1917 mit Adhäsion, Replikation und Shiga Toxin Produktion
von EHEC Stämmen *in vitro*

Interference of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle
1917 with adhesion, replication and Shiga toxin
production of EHEC strains *in vitro*



**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity**

vorgelegt von

Stefan A. Rund

aus Massing

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: AOR Dr. Tobias Ölschläger

2. Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Dobrindt

3. Betreuer: Dr. Ulrich Sonnenborn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Interferenz des probiotischen *Escherichia coli* Stammes Nissle 1917 mit Adhäsion, Replikation und Shiga Toxin Produktion von EHEC Stämmen in vitro“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Meinen Eltern

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Lebensweg immer unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Dr. Tobias Ölschläger (*Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg*) für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die Förderung und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand. Bedanken möchte ich mich vor allem für die gute Betreuung meiner Arbeit durch die ständige Diskussionsbereitschaft und die stetig neuen Anregungen und Vorschläge, sowie für die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Symposien. Hierbei ist vor allem der Besuch der `Digestive Disease Week` in Florida hervorzuheben.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dobrindt (*Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster*) und Herrn Dr. Ulrich Sonnenborn (*Ardeypharm, Herdecke*) danke ich für die Erstellung des Zweit-, und Drittgutachtens, sowie für ihre Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne, Daniela Bunsen und Claudia Gehrig möchte ich für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie danken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Graduate School of Life Sciences für die Organisation des Graduiertenprogramms und die Möglichkeit der Teilnahme an abwechslungsreichen Workshops.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Ölschläger für ihre Hilfsbereitschaft und das außergewöhnlich freundliche Arbeitsklima bedanken. Mein Dank gilt hier vor allem Anja Troge und Marita Bartrow, die mir während der Diplomarbeit und am Anfang der Doktorarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich möchte mich hier auch bei meinen Hiwi's Maike und Sabrina bedanken, die mir während einer schwierigen Phase der Arbeit sehr geholfen haben. Als weitere Mitglieder der AG Ölschläger, bei denen ich mich bedanken will, wäre das S3-Team mit Kathrin und Svetlana zu nennen. Ihre überaus professionelle und saubere Arbeitsweise machte das Arbeiten unter S3-Bedingungen um vieles leichter. Allen anderen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zeit und die gegenseitige Hilfe und Unterstützung bei der täglichen Arbeit

Bei Sonja und Maike möchte ich mich vor allem für die gute Zeit bedanken. Es war eine Freude sich mit ihnen das Büro zu teilen und sie waren eine echte Bereicherung im

Institutsalltag. Sonja möchte ich hier auch noch mal für das kritische Durchlesen dieser Arbeit danken.

Kerstin: Danke das du all meine Launen während der Doktorarbeit und die teils ungewöhnlichen Arbeitszeiten ausgehalten hast.

Abschließender Dank gilt der Pharma-Zentrale GmbH für das großzügige Stipendium ohne das ich diese Arbeit nicht hätte realisieren können. Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern bedanken, mit denen ich das Vergnügen hatte zusammenarbeiten zu dürfen. Hierbei ist vor allem Silke Dubbert zu erwähnen, die am Anfang der Doktorarbeit bei der Etablierung der Versuche eine große Hilfe war.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Probiotika.....	5
1.1.1 Definition und Verwendung von Probiotika	5
1.1.2 Der probiotische <i>E. coli</i> Stamm Nissle 1917 (EcN).....	5
1.1.3 Probiotika zur Behandlung von Infektionskrankheiten	6
1.2 Pathogene <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stämme	8
1.2.1 EHEC/HUS – Klinische Entwicklung und Behandlung.....	9
1.2.2 EAHEC O104:H4 - Eigenschaften.....	11
1.2.3 Ursprung des EAHEC O104:H4 Stammes	14
1.3 Shiga Toxin	15
1.3.1 Struktur von Shiga Toxin	15
1.3.2 Transport von Shiga Toxin	16
1.4 Regulation von Shiga Toxin	17
1.4.1 Lysogener Zyklus.....	17
1.4.2 CII.....	18
1.4.3 Lytischer Zyklus + Cro	19
1.4.4 SOS Antwort.....	20
1.4.5 Guanodin-3',5'-bipyrophosphat.....	20
1.4.6 `Quorum sensing` Systeme	21
1.4.7 Indol.....	21
1.4.8 Hohe Salzkonzentration.....	22
1.4.9 Einfluss des Immunsystems auf die Shiga Toxin Produktion	22
1.4.9.1 Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	22
1.4.9.2 Stickstoffmonoxid (NO).....	23
1.5 Phagen	23
1.6 Phagen Resistenz.....	24
1.6.1 Verhindern der Adsorption.....	24
1.6.1.1 Blockade von Phagenrezeptoren	24
1.6.1.2 Produktion einer extrazellulären Matrix.....	24
1.6.1.3 Produktion von kompetitiven Inhibitoren	25
1.6.2 Verhindern von DNA Aufnahme	25
1.6.3 Schneiden von Phagen DNA	26
1.6.3.1 RM-Systeme.....	26
1.6.3.2 CRISPR-Cas System	27
1.6.4 `Abortive infection` (Abi) System.....	28
1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	29
2 Materialien	31
2.1 Geräte und Arbeitsmaterialien	31
2.2 Chemikalien.....	34

2.3	Größenstandards	36
2.4	Antibiotika	36
2.5	Medien, Puffer und Lösungen	36
2.5.1	Flüssigmedien	37
2.5.2	Festmedien	38
2.5.3	Puffer und Lösungen.....	38
2.6	Oligonukleotide	39
2.7	Plasmide und Vektoren	40
2.8	Bakterienstämme	40
3	Methoden	43
3.1	Mikrobiologische Methoden	43
3.1.1	Übernachtskultur	43
3.1.2	Glycerinkultur	43
3.1.3	Differenzierung der Bakterienstämme	43
3.1.3.1	API [®] 20 E.....	43
3.1.3.2	ATB [™] G-EU.....	44
3.1.3.3	ATB [™] VET.....	45
3.1.3.4	MHK-Gram ^{neg}	47
3.2	Molekularbiologische und genetische Methoden	48
3.2.1	PCR.....	48
3.2.2	Herstellung von Agarosegelen	49
3.2.3	Methoden zur Plasmidisolierung	49
3.2.3.1	Isopropanolfällung von DNA.....	50
3.2.3.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	50
3.2.3.3	DNA-Isolierung mittels Qiagen-Kit.....	51
3.2.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen	52
3.2.4.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen	52
3.2.4.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> - Zellen	52
3.2.5	Transformation	53
3.2.5.1	Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	53
3.2.5.2	Transformation durch Elektroporation.....	54
3.2.5.3	Reinigung der Elektroporationsküvetten.....	54
3.3	Zellkultur	54
3.3.1	Auftauen von Zelllinien	54
3.3.2	Splitten von Zelllinien	55
3.3.3	Einfrieren von Zelllinien	55
3.4	Rasterelektronenmikroskopie	56
3.5	Adhäsionsassay und Wachstumskontrolle der Bakterienstämme	57
3.6	Untersuchung der Adhäsion von EAHEC TY3730 im Trans-Well System	59
3.7	Quantifizierung der Shiga-Toxin-Produktion	60
3.7.1	Probenvorbereitung	60
3.7.2	Verotoxin ELISA.....	61
3.7.3	Einfluss von EcN auf die Sekretion von Shiga-Toxin	62
3.7.4	Bestimmung der Shiga-Toxin Expression durch Verwendung von biolumineszenten Reporter Stämmen.....	63

3.7.4.1	Das C-P Reporter System	63
3.7.4.2	Versuchsdurchführung mit C-P Reporter Systemen	65
3.8	Versuche mit Shiga Toxin Phagen	66
3.8.1	Phagenaufreinigung durch CsCl Ultrazentrifugation	66
3.8.2	Phagen-Plaque-Assay	67
3.8.3	Transmissionselektronenmikroskopie	68
3.8.4	Stx-ELISA zur Überprüfung der Stx-Produktion infizierter Bakterienstämme	68
3.8.5	Messung der K ⁺ - Konzentration	68
3.9	Statistische Auswertung	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Differenzierung von Bakterienstämmen	70
4.1.1	Überprüfung der Bakterienstämme auf Reinheit	70
4.1.2	Überprüfung der Identität von EAHEC O104:H4	70
4.1.3	Überprüfung der Stämme auf EcN-Identität mittels PCR	72
4.1.4	Überprüfung der Deletion von AI-2 bei EcN:: <i>luxS</i>	73
4.1.5	Nachweis von <i>E. coli</i> K-12 spezifischer Sequenzen	73
4.1.6	Antibiotikaresistenz	74
4.1.7	API 20E	77
4.2	REM Aufnahmen von adhärenenten Bakterien	77
4.2.1	REM Aufnahmen von EAHEC O104:H4 TY3730	78
4.2.2	REM Aufnahmen von EHEC O157:H7 EDL933	79
4.2.3	REM Aufnahmen von EcN	79
4.3	Einfluss von EcN auf die Adhäsion von pathogenen E. coli Stämmen	80
4.3.1	Adhäsion der Bakterienstämme in Einzelkultur	80
4.3.2	Adhäsion in Co-Kultur	81
4.3.2.1	Adhäsion von EcN in Co-Kultur mit pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen	81
4.3.2.2	Adhäsion von pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen in Co-Kultur mit EcN	82
4.3.3	Adhäsion von EAHEC TY3730 in Co-Kultur mit SK22D	84
4.3.4	Adhäsion von EAHEC TY3730 im 'Trans-Well' System	85
4.4	Einfluss von EcN auf das Wachstum von pathogenen E. coli Stämmen	86
4.5	Einfluss von SK22D auf das Wachstum von pathogenen E. coli Stämmen	90
4.6	Quantifizierung der Shiga-Toxin-Produktion	91
4.6.1	Kalibrierungsgerade	91
4.6.2	Shiga-Toxin Produktion in DMEM – Medium	91
4.6.3	Shiga-Toxin Produktion in LB – Medium	97
4.6.4	Shiga-Toxin Produktion in SCEM – Medium	98
4.6.5	Einfluss der Deletion von AI-2 auf die Shiga-Toxin Produktion in DMEM – Medium	100
4.6.6	Einfluss von Acetat auf die Shiga-Toxin Produktion in DMEM – Medium	101
4.6.7	Einfluss von EcN auf die Sekretion von Shiga-Toxin in SCEM – Medium	102
4.6.8	Shiga-Toxin Produktion nach Induktion durch Mitomycin C in SCEM – Medium	103
4.6.9	Bestimmung der Stx Produktion durch Verwendung von lumineszenten Reporter Stämmen .	104
4.6.10	Shiga-Toxin ELISAs von biolumineszenten Reporter Stämmen	109
4.7	Versuche mit Shiga Toxin Phagen	110
4.7.1	Ergebnisse der stx-PCR	110
4.7.2	Phagen-Plaque-Assay	114
4.7.3	Transmissionselektronenmikroskopie	116

4.7.4	Stx-ELISA zur Überprüfung der Stx-Produktion infizierter Bakterienstämme	117
4.7.5	Messung der K ⁺ - Konzentration	118
4.7.6	Bioinformatische Auswertung der Phagenrezeptorsequenz	120
5	Diskussion	121
5.1	<i>Adhäsionsversuche</i>	<i>121</i>
5.2	<i>Wachstum</i>	<i>125</i>
5.3	<i>Studien zur Toxinproduktion.....</i>	<i>126</i>
5.4	<i>Studien der Phagen-Resistenz von EcN</i>	<i>133</i>
5.5	<i>Abschließende Worte und Ausblick.....</i>	<i>136</i>
6	Literatur	139
7	Anhang.....	158
7.1	<i>Sicherheitsinformation betreffend PAA Kälberserum.....</i>	<i>158</i>
7.2	<i>Aminosäuresequenz von Lamb von E. coli MG1655</i>	<i>159</i>
7.3	<i>Nukleinsäuresequenz von YaeT von E. coli Nissle 1917</i>	<i>159</i>
7.4	<i>Ergebnis des Homologievergleichs des Lamb-Proteins von EcN und MG1655</i>	<i>160</i>
7.5	<i>3D-Strukturmodell des Lamb-Proteins von MG1655</i>	<i>161</i>
7.6	<i>3D-Strukturmodell des Lamb-Proteins von EcN.....</i>	<i>162</i>
7.7	<i>Homologievergleich des lamB-Gens von EcN und CFT073</i>	<i>163</i>
7.8	<i>Homologievergleich des lamB-Gens von ABU83972 und CFT073.....</i>	<i>163</i>
7.9	<i>Homologievergleich des yaeT-Gens von EcN und MG1655.....</i>	<i>164</i>
7.10	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>167</i>
7.11	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>169</i>
7.12	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>172</i>
7.13	<i>Veröffentlichungen.....</i>	<i>173</i>
7.13.1	<i>Publikationen.....</i>	<i>173</i>
7.13.2	<i>Vorträge.....</i>	<i>173</i>
7.13.3	<i>Poster.....</i>	<i>173</i>
7.14	<i>Lebenslauf.....</i>	<i>175</i>

Zusammenfassung

E. coli Nissle 1917 (EcN) zählt durch seine fast hundertjährige Nutzung als Arzneimittel und aufgrund der weitreichenden Forschung während der letzten Jahrzehnte mittlerweile zu einem der am besten untersuchten Probiotika. EcN wird als Medikament zur Remissionserhaltung von Patienten mit Kolitis, bei chronischer Verstopfung und bei Durchfall von Kleinkindern eingesetzt.

Der enteroaggregative – hämorrhagische - *E. coli* (EAHEC) mit dem Serotyp O104:H4 war 2011 in Deutschland für den bisher größten EHEC-Ausbruch seit Beginn der Aufzeichnungen verantwortlich. Es fehlt bis zum heutigen Tage immer noch an effektiven Möglichkeiten einer Infektionsprophylaxe oder einer Behandlung der Erkrankung. Ein alternatives Therapeutikum wird daher dringend benötigt. In dieser Arbeit wurden die antagonistischen Effekte von EcN auf pathogene *E. coli* Stämme wie dem EHEC Stamm EDL933 oder klinischen EAHEC O104:H4 Isolaten untersucht. Es wurden die Auswirkungen von EcN auf die Adhäsion an humane Epithelzellen, das Wachstum und die Shiga Toxin Produktion der pathogenen Stämme untersucht. Zusätzlich wurde die Resistenz von EcN gegenüber Shiga Toxin Phagen nachgewiesen.

Zunächst wurde die Adhäsionseffizienz der verschiedenen *E. coli* Stämme bestimmt. Der am schlechtesten an die humanen Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T adhärierende Stamm war EcN. Dies ist insofern überraschend, da von Probiotika erwartet wird, besser als Pathogene an Epithelzellen zu adhären. Dem ungeachtet konnte jedoch gezeigt werden, dass EcN die Adhäsion von zwei EAHEC O104:H4 Isolaten, des nahe verwandten enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) Stammes 55989 und des enterohämorrhagischen (EHEC) *E. coli* Stammes O157:H7 EDL933 an beide Zelllinien hemmt. Die von EcN produzierten Mikroazine M und H47 konnten hier für einen Teil des beobachteten anti-adhäsiven Effektes von EcN auf die pathogenen *E. coli* Stämme verantwortlich gemacht werden. Die Mikroazine wurden hier als einzige Substanz, die das Wachstum der pathogenen *E. coli* Stämme beeinflusst, identifiziert.

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von EAHEC und EHEC Stämmen ist das Shiga Toxin. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass EcN die Shiga Toxin Produktion der am häufigsten auftretenden EHEC Stämme (‘Big Five’: O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H-, O145:H25) und der klinischen Isolate von EAHEC O104:H4 im Zellkulturmedium DMEM hemmt.

Auffällig war, dass die Stx1 Produktion von EHEC O103:H2 und O111:H⁻ nicht nur von EcN, sondern auch von *E. coli* K-12 Stamm MG1655, gehemmt wurde, im Gegensatz zur EcN-spezifischen Blockierung der Stx2-Produktion in den Serotypen O104:H4, O26:H11, O145:H25. Die Reduktion der Stx-Produktion in EAHEC O104:H4 TY3730 und TY3456, sowie EHEC O26:H11 war zum Teil von der Mikrozinproduktion abhängig. Diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Stx-Produktion in EHEC O157:H7 EDL933 und EHEC O145:H25. Bei Verwendung von LB-Medium zeigte sich im Gegensatz zum DMEM-Medium keine Mikrozin-Abhängigkeit der Toxinproduktion bei den EAHEC Isolaten TY3730 und TY3456. Die Toxinproduktion von EHEC EDL933 wurde ebenfalls nicht durch die Deletion der Mikrozin-Gene in EcN beeinflusst. Studien der Toxinproduktion in SCEM-Medium zeigten ebenfalls eine EcN-Dosisabhängige Reduktion der Stx-Produktion in Co-Kultur. Um den Mechanismus der Hemmung der Stx-Produktion zu untersuchen, wurden Versuche mit der EcN-Mutante EcN::*luxS* durchgeführt. Diese Deletion des AI-2 'Quorum sensing' Moleküls in EcN hatte allerdings keinen Einfluss auf die Hemmung der Stx-Produktion. Der Einsatz von Acetat führte, im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen, nicht zu einer Reduktion der Stx-Produktion. Auch eine Beeinflussung der Lyse der EHEC-Bakterien, oder der Verminderung der Sekretion von Shiga Toxin durch EcN, konnte widerlegt werden. Zur Untersuchung der Stx-Expression wurde ein Assay mit einem biolumineszenten C-P (Chromosom-Plasmid) Reporter System etabliert. Damit konnte die Shiga Toxin Expression im Stammhintergrund EHEC EDL933 in Echtzeit untersucht werden. Hier wurde wiederum eine Reduktion der Shiga Toxin Expression in Co-Kultur mit EcN erfolgreich nachgewiesen.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass EcN nicht nur die Shiga Toxin Produktion von nicht-induzierten EAHEC Bakterien, sondern auch in mit Mitomycin C induzierten Bakterien hemmt.

Als wichtiger Sicherheitsaspekt einer Behandlung mit EcN wurde die Resistenz von EcN gegenüber Shiga Toxin Phagen untersucht. Die Infektion der Bakterien wurde hierbei mit *stx*-spezifischer PCR, Phagen-Plaques-Assay, Stx-ELISA und K⁺-Efflux Assay untersucht. Es konnte durch diese verschiedenen Methoden erfolgreich gezeigt werden, dass EcN nicht durch Shiga Toxin Phagen infiziert wird. Als möglicher Resistenzmechanismus kommt hier eine Mutation vom Phagenrezeptor LamB in Frage, was jedoch noch bestätigt werden muss.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit wichtige antagonistische Effekte von EcN auf pathogene *E. coli* Stämme untersucht, die als Grundlage von neuen und dringend benötigten Behandlungen von EHEC-Infektionen dienen können.

Summary

Due to extensive studies in the last decades and its centennial application as a pharmaceutical, *E. coli* Nissle 1917 (EcN) is among the best characterized probiotics. EcN is used as remedy for remission maintenance of ulcerative colitis, chronic obstipation and diarrhea in children.

The enteroaggregative – haemorrhagic - *E. coli* (EAHEC) strain O104:H4 was responsible for one of the biggest outbreaks of EHEC recorded so far, that took place in Germany in 2011. Currently, there is no effective prophylaxis or treatment available for EHEC infections in humans. Therefore, alternative therapeutics are desperately needed. The antagonistic effects of EcN on pathogenic *E. coli* strains like the EHEC O157:H7 strain EDL933 or clinical isolates of EAHEC O104:H4 were investigated in this study. The influence of EcN on adhesion to human epithelial cell lines, the growth and the Shiga toxin production of pathogenic strains were analysed. Furthermore, the resistance of EcN against Shiga toxin phages was proven.

Initially, the adhesion efficiency of EcN and pathogenic *E. coli* strains were determined in monocultures. EcN showed the lowest number of adhering bacteria to Caco-2 and LS-174T cells. This was insofar surprising, since probiotics are expected to adhere more efficiently to epithelial cells than pathogens. Regardless of this fact, it could be shown that EcN is inhibiting the adhesion of two EAHEC O104:H4 isolates, the closely related EAEC strain 55989 and the EHEC O157:H7 strain EDL933 to both cell lines. The microzins M and H47, which are produced by EcN, can be held responsible for a fraction of the observed anti-adhesive effect of EcN. The Microzins were also identified as the only substance that was influencing the growth of the pathogenic *E. coli* strains.

One of the most important virulence factors of EHEC and EAHEC strains is Shiga toxin. In this study could be shown, that EcN is inhibiting the Shiga toxin production of the most common EHEC strains (big five: O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H-, O145:H25) and two clinical isolates of EAHEC O104:H4 in the cell culture medium DMEM. Interestingly, the Shiga toxin 1 production of EHEC O103:H2 and O111:H- was not only reduced by EcN, but also the *E. coli* K-12 strain MG1655. In contrast, the Stx2 production of the serotypes O104:H4, O26:H11, O145:H25 was only blocked by EcN. The reduction of the Shiga toxin production in EAHEC O104:H4 TY3730 und TY3456, as well as EHEC O26:H11 was partly dependent on the microcin production of EcN. No influence of microzins on the Stx production of EHEC O157:H7 EDL933 and EHEC O145:H25 was detected. When using LB-

medium instead of DMEM-medium, no influence of microzin on the Shiga toxin production of neither EAHEC TY3730 and TY3456, nor EHEC EDL933 could be shown. Experiments with SCEM-medium also resulted in an EcN-dose-dependent inhibition of Shiga toxin production of pathogenic *E. coli* strains in co-culture with EcN. In order to investigate the mechanism responsible for the observed effects, the EcN mutant EcN::*luxS* was used in co-culture experiments. However, the deletion of the quorum sensing molecule AI-2 in EcN::*luxS* had no influence on the Stx production. Using acetate in the experiments did not, in contrast to published results, lead to a reduction of Shiga toxin production. In addition, an influence of EcN on lysis of EHEC strains or the secretion of Shiga toxin could be ruled out. To study the Shiga toxin expression an assay with a bioluminescent C-P (chromosome-plasmid) reporter system was successfully established. Here, Shiga toxin expression could be monitored in real time with the strain background EHEC EDL933. Moreover, a reduction of Shiga toxin expression in co-culture with EcN could be detected.

In further experiments could be shown, that EcN is not only reducing the Shiga toxin production in uninduced bacteria, but also in the Mitomycin C induced EAHEC O104:H4 strain TY3730.

An important safety issue, in order to use EcN as a pharmaceutical against EHEC strains, is the resistance of EcN against Shiga toxin phages. The infection of bacteria was here investigated with phage plaque assay, *stx*-PCR, Stx-ELISA and K⁺-efflux assay. With these different methods could be successfully shown, that EcN is not infected by the tested Shiga toxin phages. A mutation in the phage receptor LamB could be a possible, but still unconfirmed, phage resistance mechanism of EcN.

In summary, this study showed important antagonistic effects of EcN against pathogenic *E. coli* strains, which could be the foundation of new and desperately needed treatment options of EHEC infections.

1 Einleitung

1.1 Probiotika

1.1.1 Definition und Verwendung von Probiotika

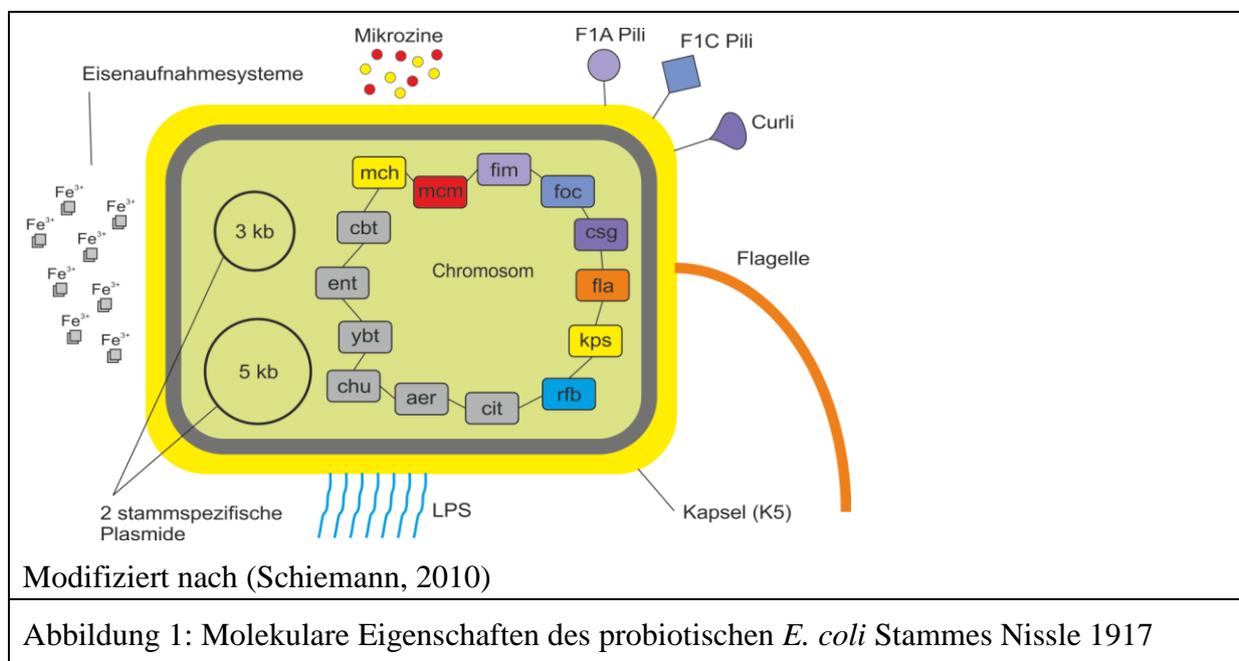
Unter Probiotika versteht man heutzutage „lebende Mikroorganismen, die, wenn in ausreichender Menge verabreicht, dem Wirtsorganismus einen gesundheitlichen Nutzen bringen“ (FAO/WHO, 2001; Schulze et al., 2008). Der aus dem Griechischen abstammende Begriff Probiotikum (pl. Probiotika) leitet sich aus den Wörtern *pro* und *bios* ab, was so viel wie „für das Leben“ bedeutet (Schulze et al., 2008). Als Probiotika werden im Lebensmittelbereich vor allem Laktobazillen, Bifidobakterien, aber auch Streptokokken (*S. thermophilus*) verwendet (Klein et al., 1998; Marteau and Shanahan, 2003; Mercenier et al., 2003; Schulze et al., 2008; Teitelbaum and Walker, 2002), während im Arzneimittelbereich auch Kolibakterien, Enterokokken und Hefen zum Einsatz kommen (Dixit and Kailasapathy, 2005; McFarland and Dublin, 2008; Montrose and Floch, 2005; Schultz, 2008; Zuccotti et al., 2008). Des Weiteren werden Probiotika in der Landwirtschaft (Bernardeau and Vernoux, 2013) und Fischproduktion verwendet (Kim et al., 2012; Lakshmi et al., 2013). Der gesundheitliche Nutzen von Probiotika ist unter anderem auf die Modifikation von immunologischen, respiratorischen und gastrointestinalen Funktionen zurückzuführen (Behnsen et al., 2013; Floch et al., 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Probiotika direkt mit Darmpathogenen durch die Freisetzung von Bakteriozinen (Cotter et al., 2005) oder Metaboliten wie Acetat konkurrieren (Behnsen et al., 2013; Servin, 2004).

1.1.2 Der probiotische *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN)

E. coli Nissle wird bereits seit 1917 (Nissle, 1918) zur Behandlung von verschiedenen Störungen und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes verwendet (Montrose and Floch, 2005; Schultz, 2008; Sonnenborn and Schulze, 2009). Zurzeit wird das lizenzierte Medikament Mutaflor[®], welches EcN als aktive Komponente besitzt, in Deutschland und anderen europäischen Ländern vertrieben (Sonnenborn and Schulze, 2009). EcN ist eine effektive Alternative zum 'Gold Standard' Mesalazin (5-Aminosalicylsäure, 5-ASA), einem Medikament zur Remissionserhaltung von Patienten mit Kolitis (Kruis et al., 2004; Rembacken et al., 1999). Andere Indikationen sind die chronische Verstopfung (Bar et al.,

2009; Mollenbrink and Bruckschen, 1994) und Durchfall bei Kleinkindern (Henker et al., 2007; Henker et al., 2008).

Einige Fitnessfaktoren (siehe Abbildung 1), die zu der probiotischen Eigenschaft von EcN beitragen sind unter anderem verschiedene Eisenaufnahmesysteme (*ent*, *iro*, *iuc/aer*, *ybt*, *chu*, *cit*) und Adhäsine (F1C Fimbrien, F1A Fimbrien, Curli Fimbrien, H1-Flagellen) sowie zwei Mikrozine (M, H47) (Patzner et al., 2003; Schlee et al., 2007; Valdebenito et al., 2006; Vassiliadis et al., 2010). Ein Sicherheitsaspekt, welcher EcN im Vergleich zu Laktobakterien auszeichnet, ist seine Serumsensitivität, die er aufgrund einer Mutation des *wzy* Genes (O6 Antigen Polymerase) besitzt (Grozdanov et al., 2002). Dies resultiert in einer verkürzten O6 Kohlenhydratseitenkette des Lipopolysaccharids, was dazu führt, dass EcN zwar immunogen, aber nicht immunotoxisch ist und einen semi-rauen Phänotyp aufweist (Grozdanov et al., 2002). Trotz seiner engen Verwandtschaft zu dem uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073 besitzt EcN keine Virulenzfaktoren (Grozdanov et al., 2004; Vejborg et al., 2010). EcN besitzt zudem zwei kleine kryptische Plasmide (pMUT1, pMUT2) (Blum-Oehler et al., 2003). Die Funktion dieser Plasmide ist bisher nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass sich diese Plasmide auf die genetische Stabilität des Trägerstammes auswirken können (Feldgarden et al., 1995).



1.1.3 Probiotika zur Behandlung von Infektionskrankheiten

Eine Behandlung von Infektionen durch enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) erweist sich immer noch als schwierig und die herkömmlichen Behandlungsmethoden (Antibiotika,

Dialyse) stoßen hierbei oft an ihre Grenzen (siehe 1.2.1). Die Entwicklung von neuen Therapeutika ist von entscheidender Bedeutung zur Bekämpfung weiterer EHEC Ausbrüche. Da neu entstandene Erreger ein sehr breites Repertoire an Virulenzfaktoren aufweisen können, ist eine Behandlung mit Medikamenten die ein breites Wirkungsspektrum gegen Pathogene aufweisen, klar von Vorteil. Der Einsatz von probiotischen Bakterien zur Behandlung von Infektionskrankheiten oder zur Minderung der Spätfolgen von Erkrankungen könnte sich hier als hilfreich erweisen.

Lactobacillus reuteri ist in der Lage eine EHEC-Kolonisierung in keimfreien Mäusen zu hemmen und ebenfalls die Shiga Toxin abhängigen Krankheitssymptome in den Mäusen zu mindern, was auf eine Reduzierung von Shiga Toxin Produktion, Freisetzung oder Aufnahme hinweist (Eaton et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von organischen Säuren durch *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium thermophilum* und *Pediococcus pentosaceus* eine Verminderung der Shiga Toxin Produktion von EHEC O157:H7 zur Folge hat (Carey et al., 2008). Das Bakterium *Bifidobacterium longum* konnte durch die Produktion von Acetat gnotobiotische Mäuse vor einer Infektion durch EHEC O157:H7 schützen (Fukuda et al., 2011; Fukuda et al., 2012).

Neben Laktobakterien und Bifidobakterien kann auch der probiotische *E. coli* Stamm Nissle 1917 zur Bekämpfung von Infektionen eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass EcN die Invasion von Epithelzellen durch enteroinvasive Bakterien verhindert (Altenhoefer et al., 2004). Des Weiteren konnten antagonistische Effekte von EcN auf die Kolonisierung von Mäusedärmen durch EHEC O157:H7 (EDL933) nachgewiesen werden (Leatham et al., 2009). Die Hemmung der Shiga Toxin Produktion mehrerer STEC Stämme (Reissbrodt et al., 2009) und EHEC/EAHEC Stämme (Rund et al., 2013) durch EcN konnte beobachtet werden.

Die optimale Bekämpfungsmethode einer EHEC Infektion ist die Infektion selbst zu verhindern. Die Reduzierung von EHEC Bakterien in der Umwelt durch Behandlung des Hauptreservoirs (Rind, Schaf, Ziege) durch probiotische Bakterien kann hier sehr hilfreich sein. *Lactobacillus acidophilus* wird bereits in vielen Ställen in den USA verwendet (Callaway et al., 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser die Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 durch Rinder um bis zu 50% reduziert (Brashears et al., 2003; Elam et al., 2003; Younts-Dahl et al., 2005). Der probiotische *E. coli* Stamm Nissle 1917 zeigte in einer Pilotstudie (von Buenau et al., 2005), die die Behandlung und Prophylaxe von Durchfall bei neugeborenen Kälbern untersuchte, eine hohe Wirksamkeit. Daten zur Bedeutung von EcN bei der Reduzierung der Durchseuchung von Rindern durch *E. coli* O157:H7 oder der

Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 liegen nicht vor. Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, dass probiotische *E. coli* (Stämme 271, 786 und 797) die Ausscheidung von *E. coli* O111:NM und O26:H11 durch Kälber reduzieren kann (Zhao et al., 2003).

1.2 Pathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme

Eine Infektion mit pathogenen *E. coli* Stämmen resultiert meist in einem von drei Krankheitstypen: Darm- und Durchfallerkrankungen, Harnwegsinfektionen (UTIs) oder Hirnhautentzündung (Kaper et al., 2004). Die für die Darm- und Durchfallerkrankungen verantwortlichen *E. coli* kann man in sechs verschiedene Kategorien aufteilen (Kaper et al., 2004): Enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffus-adhärenente *E. coli* (DAEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Die Erreger werden aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften durch die sie mit eukaryotischen Zellen interagieren unterschieden (Kaper et al., 2004). Uropathogene *E. coli* (UPEC) verursachen Harnwegsinfektionen. Dagegen sind Meningitis-assoziierte *E. coli* (MNEC) für Hirnhautentzündungen verantwortlich. Diese Erkrankungen werden auch zu den extraintestinalen Infektionen (ExPEC) gezählt (Kaper et al., 2004; Russo and Johnson, 2000). Darüber hinaus können die verschiedenen Pathotypen von *E. coli* in verschiedene Serotypen unterteilt werden. Hier unterscheidet man nach der antigenen Kombination aus Lipopolysaccharid (O), Flagelle (H) und Kapsel (K) der Bakterien (Nataro and Kaper, 1998).

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) wurden zuerst im Jahre 1982 als Ursache einer Erkrankung erkannt (Riley et al., 1983), welche sich durch blutigen und nicht-blutigen Durchfall sowie durch das hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) auszeichnet (Kaper et al., 2004; Tarr et al., 2005). Der am weitesten in Nordamerika und Europa verbreitete EHEC Serotyp, welcher mit dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) in Verbindung steht, ist O157:H7 (Tarr et al., 2005). *E. coli* O157:H7 verursacht in den USA jährlich geschätzt 73.000 Erkrankung, die zu 1.800 - 3.600 Einweisungen ins Krankenhaus und zu 61 - 541 Todesfällen führen (Mead et al., 1999; Rangel et al., 2005). In Deutschland wurden 2012 1.531 Fälle von EHEC-Erkrankungen gemeldet, wobei in 454 Fällen Angaben zur Serogruppe gemacht wurden (RKI, 2013) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Serogruppen der in Deutschland (2012) gemeldeten EHEC-Fälle

Serogruppe	Nennungen	Anteil
O91	72	15,9%
O157	60	13,2%
Ont (nicht typisierbar)	47	10,4%
O26	44	9,7%
O103	34	7,5%
O145	25	5,5%
O128	16	3,5%
O111	14	3,1%
O146	14	3,1%
O55	10	2,2%
Andere	118	26,0%
Summe	454	100,0%

modifiziert nach (RKI, 2013), Tab. 6.11.2

EHEC ist ein Lebensmittelkeim, welcher durch kontaminierte Nahrung übertragen werden kann (Pacheco and Sperandio, 2012). Dazu gehören Fleischprodukte (Rinderhack, Steak, Salami) (Bell et al., 1994; Greig and Ravel, 2009; Jay et al., 2004), Milchprodukte (Käse, Butter) (Jaeger and Acheson, 2000; Neil et al., 2012) und Gemüse (Sprossen, Salat, Spinat) (Buchholz et al., 2011; Grant et al., 2008; Rangel et al., 2005; Sodha et al., 2011; Wendel et al., 2009). Wiederkäuer wie Rinder, Schafe und Ziegen werden von Shiga Toxin produzierenden *E. coli* (Muniesa et al., 2004) kolonisiert. Sie bilden damit das Hauptreservoir in der Umwelt und scheiden die Bakterien mit ihren Fäkalien wieder aus (Blanco et al., 2003; Licence et al., 2001; Widiasih et al., 2004). Eine Besonderheit von EHEC besteht in der sehr niedrigen Infektionsdosis von 50-100 koloniebildenden Einheiten (KBE), die zum Auslösen einer Krankheit benötigt wird (Tilden et al., 1996).

1.2.1 EHEC/HUS – Klinische Entwicklung und Behandlung

Der Zeitraum zwischen Aufnahme von EHEC (O157:H7) Bakterien und dem Einsetzen von Durchfall beträgt zwischen 2 und 12 Tagen (Bell et al., 1994; O'Brien et al., 1983). Im Normalfall verursacht *E. coli* O157:H7 1-3 Tage lang Symptome wie Bauchschmerzen,

Erbrechen, Fieber und nicht-blutigen Durchfall gefolgt von blutigem Durchfall bei ca. 90 % der Patienten (Ostroff et al., 1989). Etwa 7 Tage nach Einsetzen der Symptome kommt es bei einem Großteil der Patienten (~85%) zur spontanen Selbstheilung, während einige Patienten (~15%) HUS entwickeln (Tarr et al., 2005). Der Dickdarm kann während der symptomatischen Phase der Krankheit hochgradig geschädigt werden (Tarr et al., 2005). Auch ein milder Infektionsverlauf mit geringer Symptomatik ist möglich (Rodrigue et al., 1995). Es wurden auch schon *E. coli* O157:H7 aus Patienten mit HUS isoliert, die keinen Durchfall aufwiesen (Brandt et al., 1994; Miceli et al., 1999).

Die keimzahldezipierende Behandlung der Patienten durch Antibiotika wie Fluorchinolone, Cotrimoxazol, Aminoglykoside und Fosfomycin wird nicht empfohlen (DGI, 2011a), da die möglichen Nebenwirkungen, wie die erhöhte Shiga Toxin Produktion durch die Bakterien (Pacheco and Sperandio, 2012), schwerer wiegen als der Nutzen der Medikamente. Durch das Fehlen von effektiven Strategien zur Bekämpfung der EHEC Bakterien beschränkt sich die aktuelle Behandlung hauptsächlich auf unterstützende Maßnahmen (Michael et al., 2009). Dazu gehören das Ersetzen von verlorener Flüssigkeit durch Infusionen sowie dialytische Maßnahmen (Salvadori and Bertoni, 2013).

Mit wachsendem Wissen über die Regulation der *stx* Expression und die Wirkungsweise von Shiga Toxin haben sich neue Strategien zur Bekämpfung der Krankheit entwickelt. Dabei haben sich drei Hauptstrategien herauskristallisiert: Hemmung von Zell-Zell-Kommunikation zur Beeinflussung von Virulenz und Stx Produktion, Impfstoffe und Immuntherapien zur Bekämpfung von STEC Infektionen und Toxinhemmer um die Rezeptorbindung zu verhindern (Pacheco and Sperandio, 2012).

Viele Bakterien nutzen zur Wahrnehmung von Epinephrin/Norepinephrin den Sensor QseC (Sperandio et al., 2003). Es wurde berichtet, dass *qseC* Mutanten von EHEC Stämmen im Tiermodell abgeschwächte Virulenz aufweisen (Clarke et al., 2006). Auf der Grundlage eines Hochdurchsatztestes wurde das kleine Molekül LED209 entdeckt, welches Epinephrine entgegenwirkt und so die Expression von LEE und *stx2* verhindert (Pacheco and Sperandio, 2012; Rasko et al., 2008). LED209 erwies sich als nur leicht toxisch und hemmt darüber hinaus das Wachstum von pro- und eukaryotischen Zellen nicht. Dies lässt vermuten, dass durch den niedrigen Selektionsdruck nur wenige Resistenzen auftreten werden (Pacheco and Sperandio, 2012). Neben den Vorteilen eines solchen Systems weist dieses auch einige Nachteile auf. Zum einen wurden Hemmer der Zell-Zell-Kommunikation bisher nicht in klinischen Studien an Menschen getestet. Somit liegen keine Informationen zu

Nebenwirkungen vor (Pacheco and Sperandio, 2012). Des Weiteren ist das Wirkungsspektrum der Substanz möglicherweise zu klein und so für eine Behandlung ungeeignet. Auch negative Auswirkungen auf die Homeostasis des Magen-Darm-Traktes sind nicht auszuschließen (Pacheco and Sperandio, 2012).

Viele Studien beschäftigten sich mit der Herstellung von Impfstoffen gegen EHEC Infektionen (Mohawk et al., 2010; Mukherjee et al., 2002; Zhang et al., 2011). Jedoch ist bis jetzt noch kein Impfstoff gegen EHEC verfügbar (Pacheco and Sperandio, 2012).

Ein wichtiger Virulenzfaktor von EHEC Bakterien ist das Shiga Toxin (Stx). Zur Neutralisierung von Stx wurden verschiedene Liganden entwickelt, die den Stx-Rezeptor Gb3 imitieren und auch *in vitro* und *in vivo* mäßige Effekte zeigten (Kitov et al., 2000; Nishikawa et al., 2000). In klinischen Studien erwiesen sich diese jedoch als wenig effektiv (Trachtman et al., 2003). Es ist möglich, dass die Stx-neutralisierende Moleküle das Stx1 neutralisieren anstelle des hochtoxische Stx2 (Kulkarni et al., 2010; Pacheco and Sperandio, 2012).

Als weitere Behandlungsmöglichkeit könnte der Antikörper Eculizumab (Soliris[®]) dienen (DGI, 2011a). Dieser humanisierte monoklonale Antikörper bindet an das Komplementprotein C5 und verhindert so dessen Spaltung in C5a und C5b, was wiederum die Bildung des Komplementkomplexes C5b-9 hemmt (DGI, 2011a). Ein Risikofaktor einer Behandlung mit Eculizumab besteht unter anderem in einem erhöhten Risiko einer Meningokokkeninfektion (DGI, 2011b). Ursprünglich nicht zur Behandlung von STEC Infektionen gedacht, zeigen erste Studien eine schnelle und effiziente Erholung bei frühzeitiger Behandlung mit Eculizumab in Patienten (Delmas et al., 2014). Die genaue Wirkungsweise von Eculizumab gegen EHEC ist nicht bekannt.

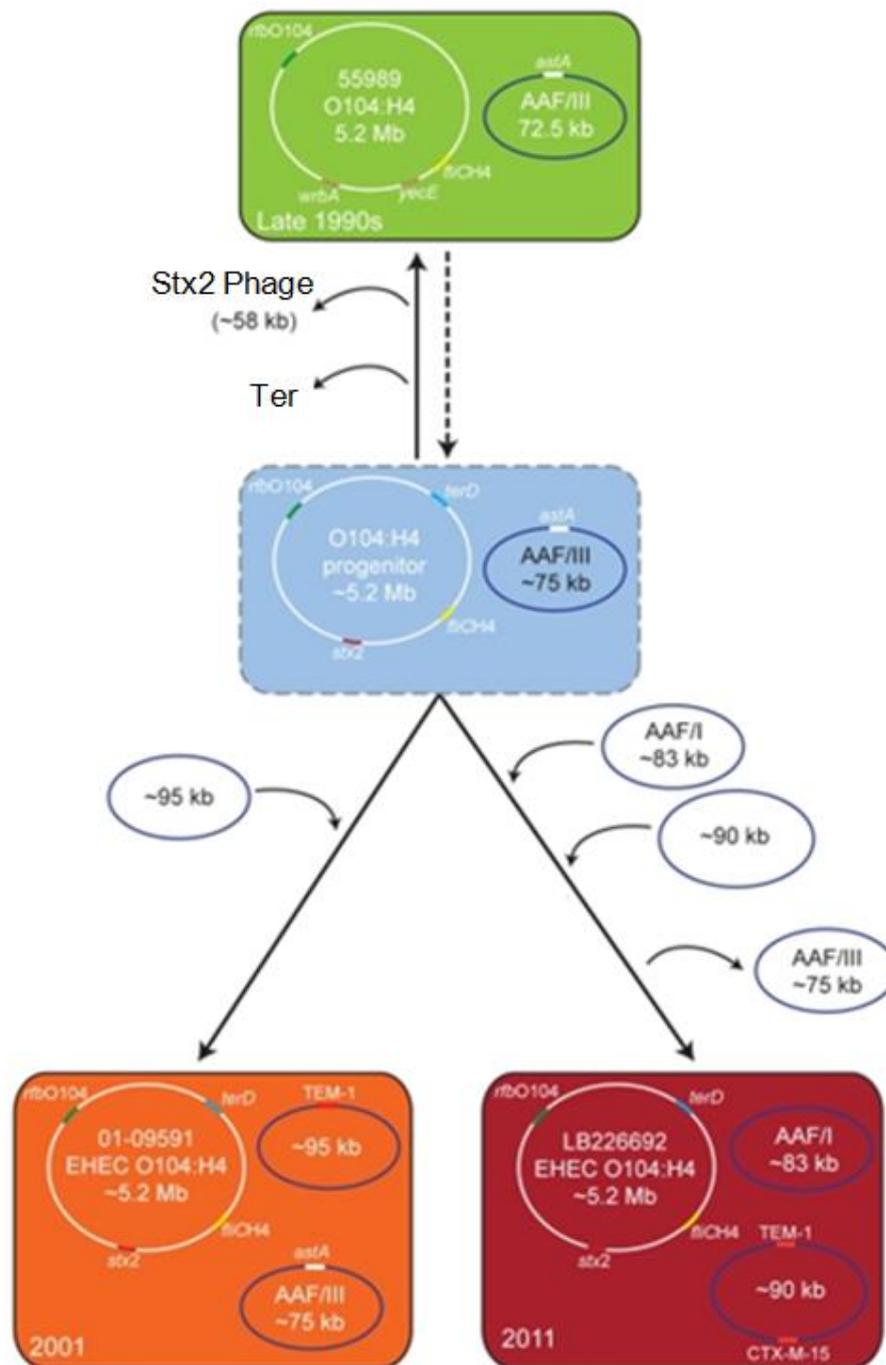
1.2.2 EAHEC O104:H4 - Eigenschaften

2011 gab es in Deutschland den bisher größten EHEC-Ausbruch seit Beginn der Aufzeichnungen. Dieser Ausbruch wurde vom Shiga Toxin produzierenden enterohämorrhagischen *E. coli* Stamm O104:H4 verursacht (RKI, 2011). Insgesamt wurden 2.987 Fälle von Gastroenteritis von denen 18 tödlich verliefen und 855 Fälle von hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), welches 35 Todesfälle zur Folge hatte, gemeldet (RKI, 2011). Dieser neue *E. coli* Stamm ist eine Mischung aus enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) und wird im folgenden als enteroaggregativer – hämorrhagischer - *E. coli* (EAHEC) (Brzuszkiewicz et al., 2011)

bezeichnet. Um die Entstehung von EAHEC zu beschreiben, wurde mit Hilfe einer Genomcharakterisierung ein Evolutionsmodell (Mellmann et al., 2011) erstellt, welches einen gemeinsamen Vorläufer von EAHEC O104:H4, EAEC O104:H4 (55989) und dem historischen EHEC O104:H4 Isolat (HUSEC041) andeutet (siehe Abbildung 2).

Der EAHEC Stamm weist eine einzigartige Kombination von Virulenzfaktoren auf, welche zu seiner Gefährlichkeit beitragen (siehe Abbildung 3). Der EAHEC zeichnet sich unter anderem durch ein Multiresistenzplasmid (pESBL, ~88kb) aus, welches die ESBLs (‘Extended Spectrum β -Lactamasen’), TEM-1 und CTX-M-15 besitzt (Brzuszkiewicz et al., 2011). Es konnte eine hohe Ähnlichkeit von pESBL mit dem Plasmid pEC_Bactec, welches in *E. coli* - Isolaten von Mensch und Pferd entdeckt wurde (Smet et al., 2010), festgestellt werden (Brzuszkiewicz et al., 2011). Die Resistenz von EAHEC O104:H4 gegen fast alle β -Lactamantibiotika erschwert die Behandlung einer Infektion zusätzlich.

EAHEC weist ein enteroaggregatives (‘stacked-brick’) Adhäsionsmuster auf, wie es für EAEC typisch ist (Bielaszewska et al., 2011). Im Gegensatz zu seinem nahen Verwandten EAEC 55989, besitzt EAHEC Gene für die aggregativen Adhärenzfimbrien AAF/I (siehe Abbildung 3), aber nicht für AAF/III (Brzuszkiewicz et al., 2011; Mellmann et al., 2011). Die in klassischen EHEC Stämmen weit verbreitete LEE (‘locus of enterocyte effacement’) (Schmidt, 2010) Pathogenitätsinsel, welche unter anderem für ein Typ III Sekretionssystem kodiert, fehlt bei EAHEC O104:H4 (Brzuszkiewicz et al., 2011). Das Fehlen von Adhäsinen wie dem Intimin (*eae*) gleicht EAHEC durch AAF/I, Iha (‘iron-regulated gene A homologue adhesin’) und LPF (‘long polar fimbriae’) aus (Karch et al., 2012; Mellmann et al., 2011). Die daraus resultierende verbesserte Adhäsion des Bakterienstammes unterstützt möglicherweise die Aufnahme von Shiga Toxin und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit HUS zu entwickeln (Bielaszewska et al., 2011; Karch et al., 2012).



modifiziert nach (Mellmann et al., 2011), Fig 5

Abbildung 2: Evolutionsmodell des Ursprungs von EAHEC O104:H4

Evolutionsmodell von EAHEC O104:H4 (LB226692) und dem historischen Stamm (01-9591) aus dem Jahr 2001 basierend auf chromosomalen und Plasmid Daten. Die Gene des PCR-Differenzierungstests des HUSEC041 Komplexes (*stx2*: Rot; *terD*: Blau; *rfb*_{O104}: Grün; *fliC*_{H4}: Gelb), für Antibiotikaresistenz (TEM-1 und CTX-M-15: Orange) und zur Differenzierung von EAEC Plasmiden (*astA*: Weiß) sind farblich markiert. Die Reihenfolge von Plasmidaufnahme- und verlust wurde frei gewählt, da die genaue Reihenfolge unbekannt ist. Das Jahr der Isolierung jedes Stammes wurde in der linken unteren Ecke angegeben. (Mellmann et al., 2011)

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von EAHEC ist das Shiga Toxin (Stx2, siehe auch 1.3), welches nahe mit dem Stx2 des *E. coli* Stammes O111:H- (JB1-95) verwandt ist (Laing et al., 2012). Eine Induktion der Shiga Toxin Produktion durch Mitomycin C in EAHEC, verglichen mit EHEC O157:H7 EDL933, resultiert in einer deutlich erhöhten Shiga Toxin Menge (Laing et al., 2012). Des Weiteren konnte das Enterotoxin Set1 (Bielaszewska et al., 2011; Rasko et al., 2011), das Proteasehomolog SigA (Al-Hasani et al., 2000), das Telluritresistenzcluster (*terZABCDE*) (Chasteen et al., 2009) und die Pathogenitätsinsel HPI (Eisenaufnahme) (Carniel et al., 1996) in EAHEC nachgewiesen werden (Karch et al., 2012).

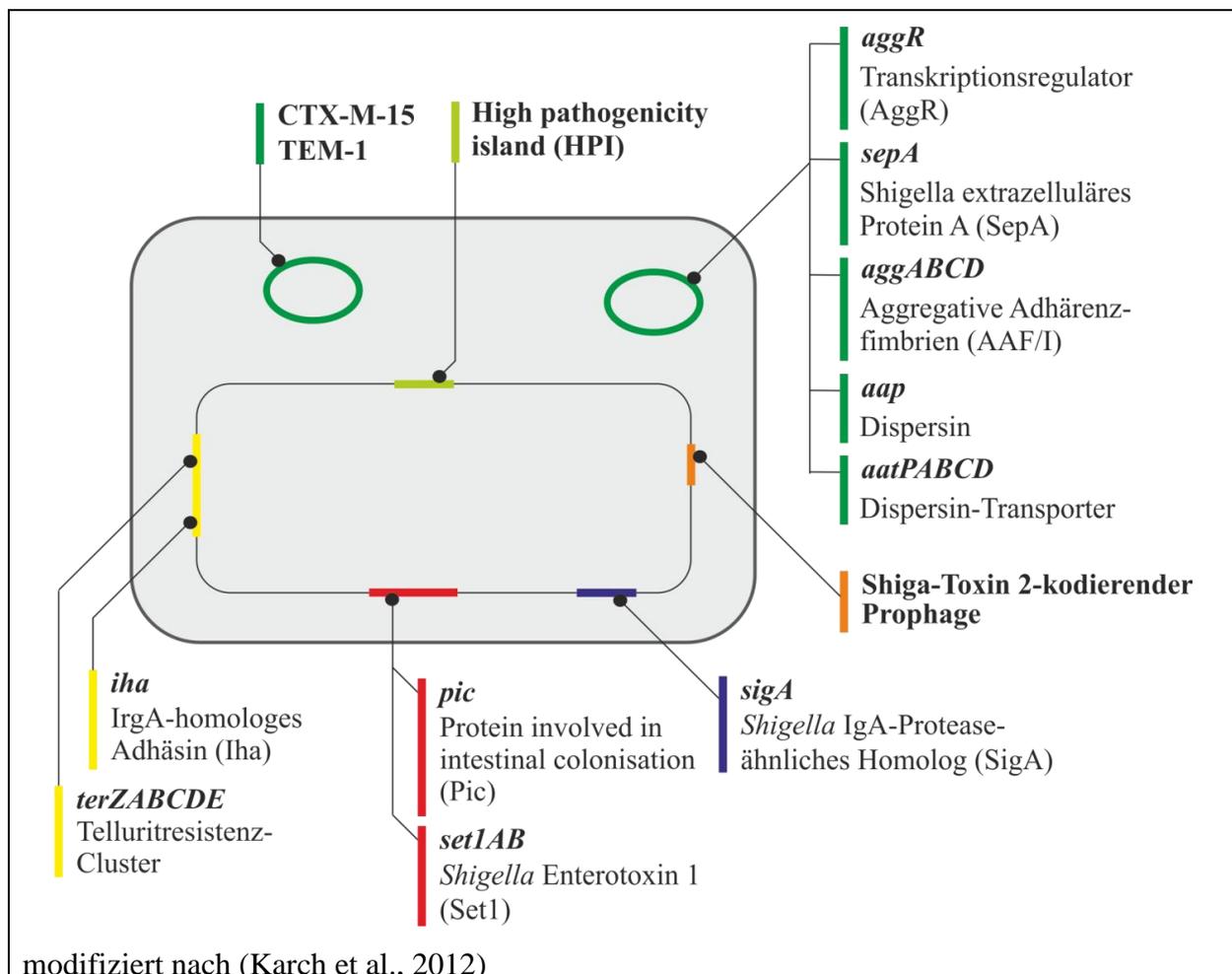


Abbildung 3: Zusammenfassung der Virulenzgene im Genom von EAHEC O104:H4

Die Gene für die wichtigsten Virulenzfaktoren von EAHEC Stamm O104:H4, darunter für das Shiga Toxin und die aggregative Adhärenzfimbrien (AAF/I), sind dargestellt. Neben den chromosomalen Virulenzfaktoren besitzt EAHEC zwei Plasmide, welche für die Antibiotikaresistenz und das EAEC spezifische Adhärenzmuster ('stacked brick') kodieren.

1.2.3 Ursprung des EAHEC O104:H4 Stammes

Als Quelle des EAHEC O104:H4 Ausbruchsstammes wurde eine einzelne Lieferung von Bockshornkleesamen (*Trigonella foenum-graecum*) aus Ägypten identifiziert (Buchholz et al.,

2011). Allerdings konnte in keiner der untersuchten Proben eine Kontamination mit EAHEC O104:H4 nachgewiesen werden (EFSA, 2011). Andere Studien fanden kein Anzeichen von *E. coli* O104:H4 im Stuhl von Rindern, die aus Norddeutschland oder Frankreich stammten, was darauf hinweist, dass Rinder nicht das Hauptreservoir dieses Stammes sind (Auvray et al., 2012; Wieler et al., 2011). Bis jetzt wird angenommen, dass das wahrscheinlichste Reservoir von EAHEC O104:H4 der Mensch ist (Harrington et al., 2006; Karch et al., 2012; Okeke et al., 2010).

1.3 Shiga Toxin

1.3.1 Struktur von Shiga Toxin

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von EAHEC ist wie bereits erwähnt das Shiga Toxin. Beim Shiga Toxin handelt es sich um ein AB₅ Toxin, welches aus einer katalytischen A Untereinheit und fünf nicht-kovalent gebundenen B Untereinheiten besteht (Fraser et al., 2004; Stein et al., 1992). Die Untereinheiten werden in das Periplasma sekretiert (Donohue-Rolfe and Keusch, 1983), wo sie sich dann zum Holoenzym zusammenschließen (Hirst et al., 1984) und durch Lyse der Bakterien freigesetzt werden (Cumby et al., 2012). Die A Untereinheit des Toxins besitzt eine sehr spezifische N-Glycosidase-Aktivität und spaltet die Adeninbase der Position 4.324 der α -Sarcin-Schleife in der Domäne VI der 28S RNA der Ribosomen (rRNA) ab (Endo et al., 1988; Saxena et al., 1989). Durch die so entstehende Hemmung der tRNA-Bindung (Hale and Formal, 1980) wird die Proteinsynthese eukaryotischer Zellen gehemmt, was zu einer induzierten Apoptose der betroffenen Zellen führt (Endo et al., 1988; Pacheco and Sperandio, 2012). Die B Untereinheit bildet eine Struktur, welche an den Globotriaosylceramide (Gb3) Rezeptor auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen bindet (Jacewicz et al., 1986; Lindberg et al., 1987). Jede B Untereinheit besitzt 3 Bindestellen für Gb3, wobei die Bindestelle S2 (siehe Abbildung 4) nur in der pentamerischen Form vorkommt (Johannes and Römer, 2010).

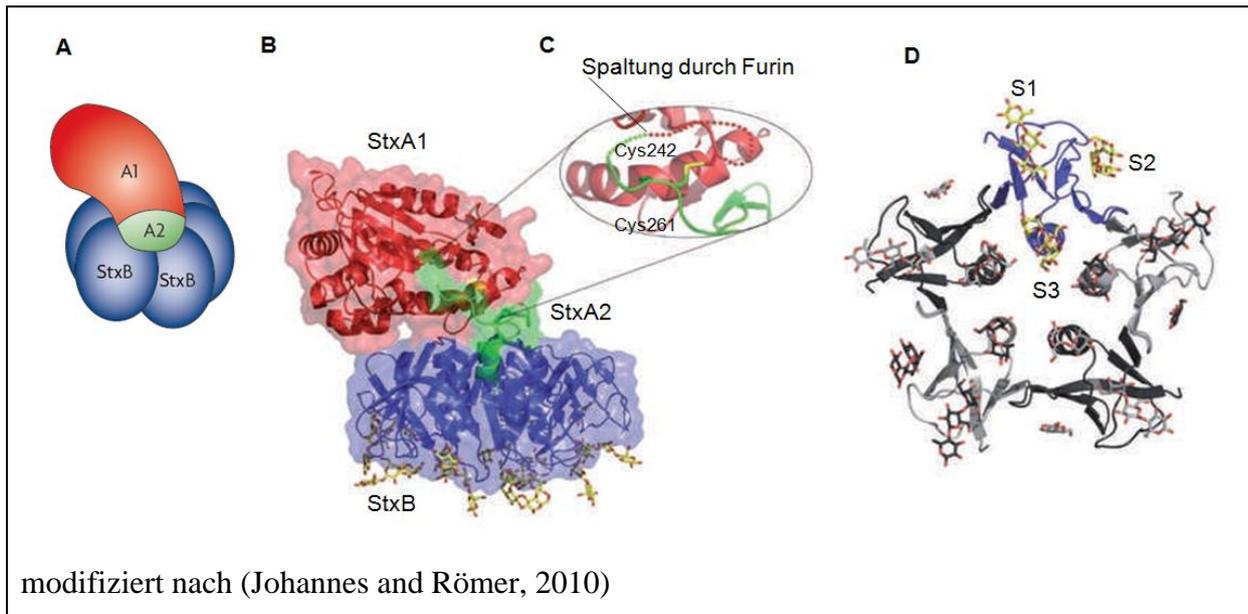


Abbildung 4: Struktur von Shiga Toxin

(A) Vereinfachte Darstellung des Shiga Toxins, bestehend aus A-Untereinheit (A1-A2) und der B-Untereinheit (5x StxB). (B) 3D Proteinstruktur von Shiga Toxin. (C) Vergrößerung der Furin Spaltungsstelle (Arg251-Met252). Disulphidbrücke zwischen Cys242 und Cys261, welche A1 und A2 verbinden ist dargestellt. D) 3D Struktur der fünf B-Untereinheiten. Gb3-Bindestellen (S1-S3) eines blau markierten Monomers werden gezeigt.

1.3.2 Transport von Shiga Toxin

Nach Bindung an den Gb3 Rezeptor wird das Toxin durch Endozytose in die eukaryotischen Zellen aufgenommen. Dies kann sowohl Clathrin-abhängig (Sandvig et al., 1989), als auch Clathrin-unabhängig (Membraneinstülpung) geschehen (Lauvrak et al., 2004; Saint-Pol et al., 2004). Nach der Endozytose befindet sich das Toxin im frühen Endosom und wird durch einen rückläufigen (retrograde) Transport zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) (Mallard et al., 1998) und schließlich zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert (Girod et al., 1999; McKenzie et al., 2009).

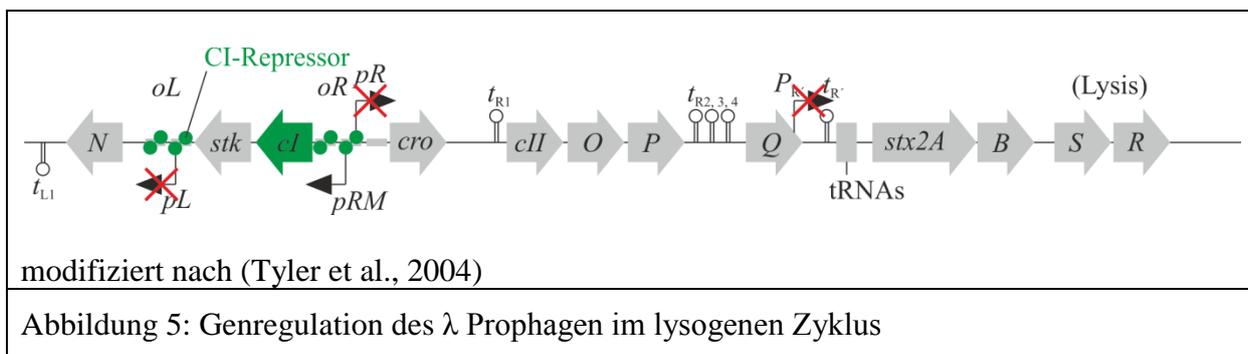
Shiga Toxine bilden keine Poren aus. Dadurch sind sie von der zellulären Maschinerie abhängig, um die katalytische A Untereinheit ins Zytosol der Wirtszelle zu transportieren (Johannes and Römer, 2010). Bereits während der frühen Phase der Aufnahme (frühes Endosom) wird die A Untereinheit durch die membranständige Protease Furin zwischen Arg251 und Met252 gespalten (siehe Abbildung 4). Es entsteht dabei ein katalytisches A1 Fragment und ein StxB-StxA2 Komplex (Garred et al., 1995a; Garred et al., 1995b), welche durch eine Disulphid-Bindung (Cys242-Cys261) miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 4) (Lea et al., 1999; O'Brien and Holmes, 1987). Die Disulphid-Bindung wird schließlich im ER gespalten, was zur Freisetzung der katalytischen A1 Untereinheit führt. Der

Transport über die ER-Membran ins Zytosol der Zielzelle erfolgt dann mithilfe der zellulären Transportmaschinerie, bestehend aus HEDJ, BiP, GRP94, Sec61 und anderen Proteinen (Falguières and Johannes, 2006; LaPointe et al., 2005; Meunier et al., 2002; Yu and Haslam, 2005).

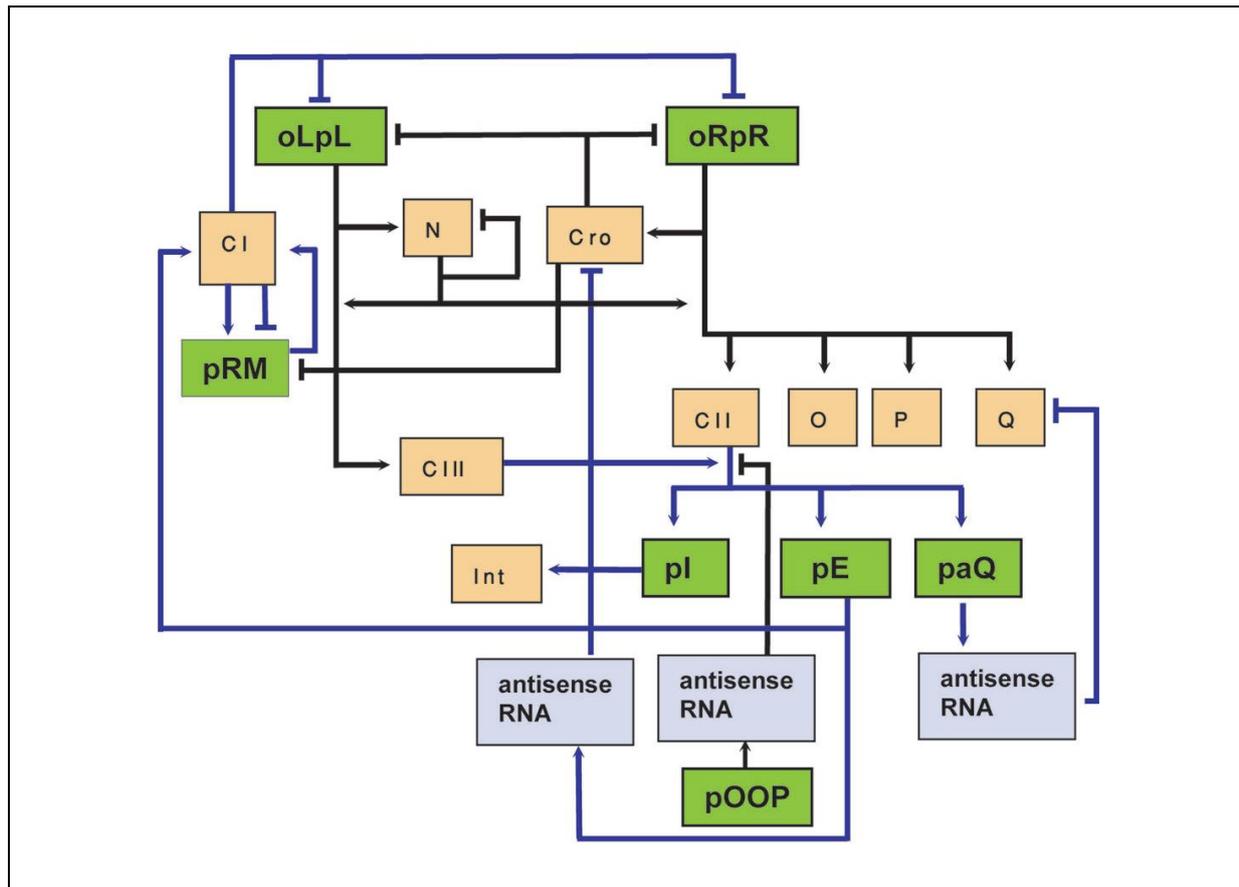
1.4 Regulation von Shiga Toxin

Die Regulation von Shiga Toxin steht in engem Zusammenhang mit der Regulation der Shiga-Toxin Phagen. Diese Phagen können sowohl den lytischen, als auch den lysogenen Zyklus durchlaufen und werden von vielen zellulären Systemen, wie der SOS Antwort reguliert.

1.4.1 Lysogener Zyklus



Im Großteil der Shiga Toxin produzierenden *E. coli* Stämme befinden sich die Toxin Gene (*stxAB*) im Genom eines Prophagen, der Ähnlichkeit mit dem Phagen λ besitzt (Datz et al., 1996; Tyler et al., 2004). Die Regulation der Shiga Toxin Gene ist abhängig von der Transkriptionsregulation dieses Prophagen. Im lysogenen Ruhezustand des λ Prophagen bindet das Repressor-Protein CI an den linken und rechten Operator (*oL*; *oR*) und verhindert so die Transkription an den Promotoren *pR* und *pL* (Pacheco and Sperandio, 2012; Rokney et al., 2008; Tyler et al., 2004) (siehe Abbildung 5). Der Repressor CI bindet als Dimer an die Operator Bindestellen und formt hierbei Tetramere, die die Transkription blockieren (Tyler et al., 2004). Gleichzeitig wird die Transkription am Promotor *pRM* (CI) stimuliert (positive selbstregulierte Schleife). Bei Überschuss von CI erfolgt Bindung von CI an *oR3*. Dies führt zur Hemmung der Transkription am Promotor *pRM* und schützt somit vor Überexpression von CI (Oppenheim et al., 2005). Die Inaktivierung von CI stellt einen der wichtigsten Faktoren beim Übergang in den lytischen Zyklus dar (Campbell, 2003; Pacheco and Sperandio, 2012).



modifiziert nach (Rokney et al., 2008)

Abbildung 6: Regulationsnetzwerk des λ Prophagen im lysogenen Zyklus

1.4.2 CII

Eine wichtige Aufgabe fällt auch dem CII Protein zu, welches die Synthese von Int (Integrase) Protein (Promotor *pI*) und CI Repressor (Promotor *pE* oder *pRE* genannt) stimuliert und so den lysogenen Status stabilisiert (Rokney et al., 2008). Die Aktivierung des antisense Promotors *paQ* durch CII führt zur weiteren Stabilisierung durch Reduzierung der Antiterminatorfunktion von Q (Oppenheim et al., 2005). CII ist ein äußerst instabiles Protein und wird hauptsächlich durch die ATP-abhängige Protease FtsH degradiert (Herman et al., 1993; Kihara et al., 1997). Diese Degradierung kann durch das Protein CIII verhindert werden, indem dieses die Protease FtsH hemmt. Sowohl CII als auch CIII führen zur Bevorzugung des lysogenen Status und werden nicht zur Etablierung des lytischen Status benötigt (Ito and Akiyama, 2005; Rokney et al., 2008). Die Translation von CII wird zudem von IHF (‘integration host factor’) stimuliert (Hoyt et al., 1982).

1.4.3 Lytischer Zyklus + Cro

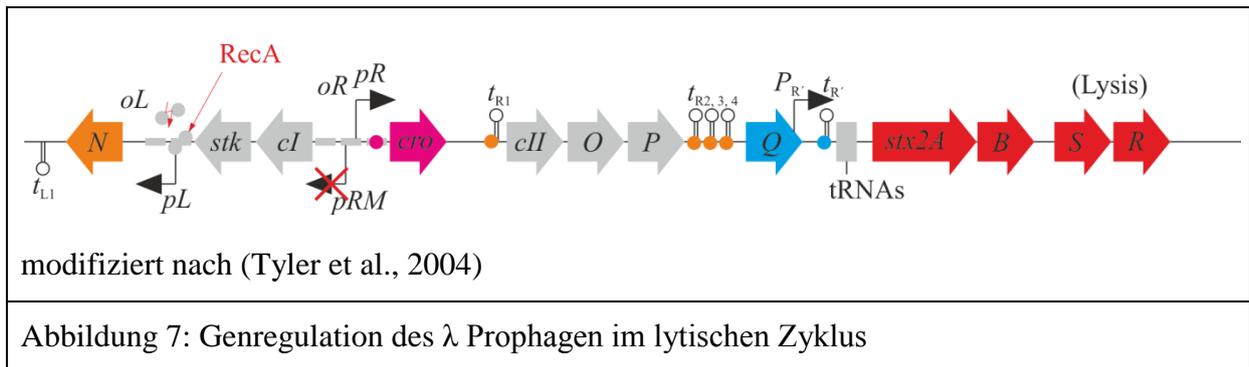
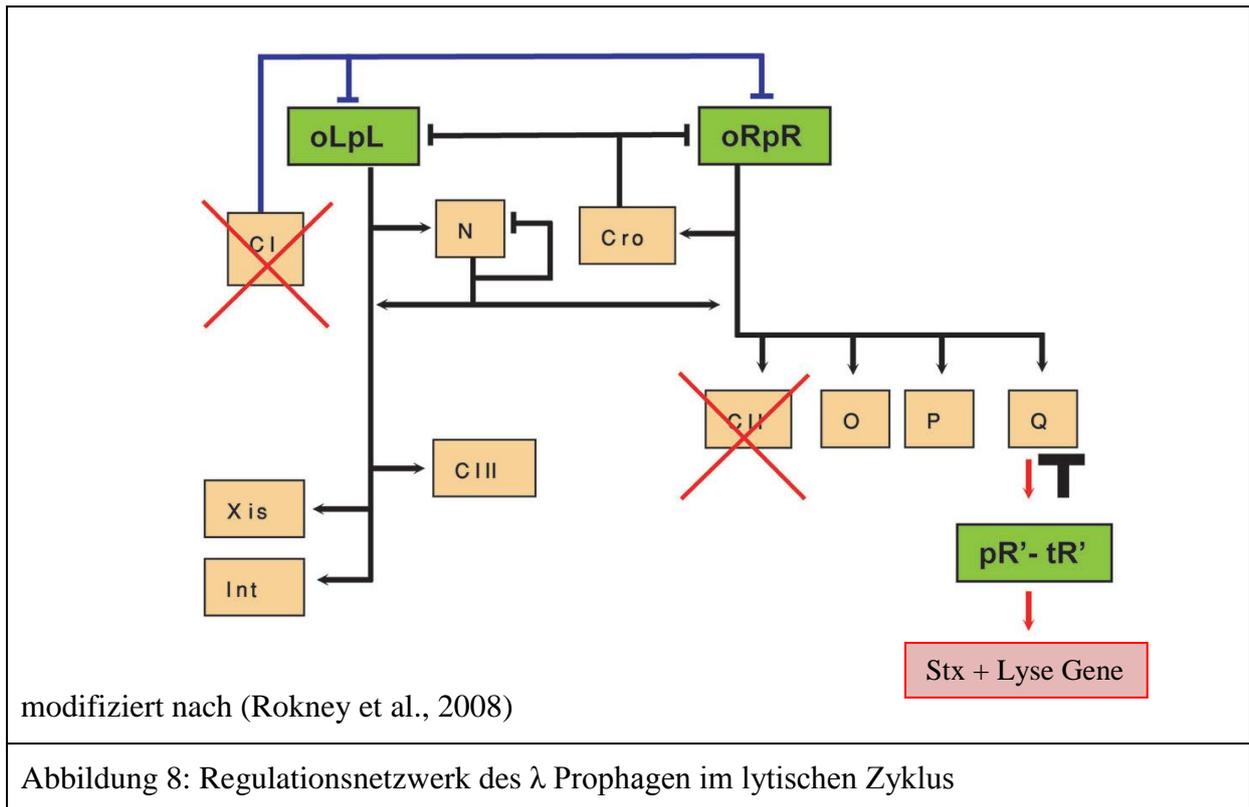


Abbildung 7: Genregulation des λ Prophagen im lytischen Zyklus

Die Induktion des lytischen Phagenzyklus ist das Ergebnis der Aufhebung der Repression durch CI (Pacheco and Sperandio, 2012; Waldor and Friedman, 2005). Dies wird durch eine RecA (siehe 1.4.4) vermittelte Selbstspaltung des Repressors CI hervorgerufen (Muhldorfer et al., 1996) und resultiert in einer Regulationskaskade beginnend mit der Transkription von Genen ausgehend von den Promotoren pR und pL . Zuerst werden Proteine wie der Antiterminator N exprimiert, welche es der RNA Polymerase erlauben Terminatorstellen (t_{R1-4}) zu ignorieren und so die RNA und schließlich die Proteine von distal liegenden Genen zu synthetisieren (Nassar et al., 2013; Tyler et al., 2004) (siehe Abbildung 7). Eines der nun produzierten Proteine ist Q, welches seinerseits die Transkription beginnend am Promotor pR' modifiziert und so die Synthese einer ~26-kb langen mRNA, kodierend für die späten Gene, ermöglicht (Tyler et al., 2004). Unter diesen Genen befinden sich sowohl die Shiga Toxin Gene $stx2A$ und $stx2B$, als auch die Gene für Holin (S) und Endolysin (R), welche zur Lyse der Bakterienzelle führen (Young, 2002). Ein weiterer Regulator im lytischen Zyklus ist Cro. Dieser Repressor bindet an $oR3$ und führt dadurch zur Hemmung der Transkription am Promotor pRM (CI), was wiederum die Aufrechterhaltung des lytischen Status fördert (Johnson et al., 1978). Da Cro auch die Transkription an den Promotoren pR und pL hemmt, ist man sich über die Bedeutung dieses Regulators beim Wechsel vom lysogenen zum lytischen Status noch im unklaren (Svenningsen et al., 2005).



1.4.4 SOS Antwort

Die SOS Antwort spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Shiga Toxin in EHEC Bakterien. Die SOS Antwort von Bakterien ist ein induzierbares DNA Reperatur System, welches es den Bakterien ermöglicht einen plötzlichen Anstieg an DNA-Schäden zu überstehen (Michel, 2005; Wegrzyn and Wegrzyn, 2005). Bei der SOS Antwort sind die zwei Proteine LexA und RecA von entscheidender Bedeutung. Der LexA Repressor bindet während des normalen Wachstums an die SOS-Box in der Promotorregion von SOS Genen und verhindert so deren Transkription (Michel, 2005; Nassar et al., 2013). Das filamentöse RecA Protein induziert die Spaltung des LexA Repressors und führt so zur Transkription der zuvor reprimierten Gene (Los et al., 2009). Der λ Bakteriophagen Repressor CI wird ebenfalls durch RecA zur Selbstspaltung induziert, was schließlich zur Stx Produktion führt (siehe 1.4.3). Die SOS Antwort kann durch UV-Licht, Mitomycin C oder andere induzierende Substanzen (Antibiotika) herbeigeführt werden (Los et al., 2009).

1.4.5 Guanosin-3',5'-bipyrophosphat

Guanosin-3',5'-bipyrophosphat (ppGpp) ist ein Signalmolekül, welches während der Stressantwort (‘stringent response’) von Bakterien produziert wird (Potrykus and Cashel, 2008). ppGpp bindet direkt an RNA Polymerase und kann so die Aktivität von Promotoren

und somit die Transkription einer Vielzahl von Genen beeinflussen (Kanjee et al., 2012; Nowicki et al., 2013). Unter anderem wird die Pathogenität von verschiedenen Bakterien durch ppGpp beeinflusst (Potrykus and Cashel, 2008). Die Transkription von Promotoren des Bakteriophagen λ wird durch ppGpp entscheidend beeinflusst. Die Promotoren pR , pE und pI werden durch ppGpp negativ reguliert, paQ wird positiv reguliert und pL wird nicht beeinflusst (siehe Abbildung 6) (Slominska et al., 1999). Dies resultiert in Bakterien die mit λ Bakteriophagen infiziert sind in einer Hemmung der Vervollständigung der lytischen Entwicklung und somit einer Hemmung der Expression von *stx* Genen (Nowicki et al., 2013). Eine Hemmung der Aktivität vom pR Promotor durch ppGpp wurde bei den Phagen ST2-8624 und 933W nachgewiesen (Nejman et al., 2011). Des Weiteren kann die Stressantwort durch einen Aminosäuremangel (‘stringent response’) und auch durch die Substanz Phenethylisothiocyanate (PEITC) ausgelöst werden (Nowicki et al., 2013). PEITC ist somit ein negativer Regulator der Shiga Toxin Produktion. Guanosin-3',5'-bipyrophosphat wird in *E. coli* durch die zwei Enzyme SpoT und RelA produziert. Die ppGpp Synthase I (RelA) ist ein Ribosom-assoziiertes Enzym, welches durch die Bindung von nicht beladener tRNA an das Ribosom aktiviert wird (Nowicki et al., 2013). Die ppGpp Synthase II (SpoT) ist ein bifunktionales Enzym welches auch als ppGpp Hydrolase fungiert und somit für die Erneuerung von ppGpp verantwortlich ist (Nowicki et al., 2013).

1.4.6 ‘Quorum sensing’ Systeme

Escherichia coli benutzt verschiedene ‘Quorum sensing’ Systeme wie das *luxS*/AI-2 – System (Sperandio et al., 1999; Walters et al., 2006), das AI-3/Epinephrin/Norepinephrin – System (Sperandio et al., 2003; Walters and Sperandio, 2006), Indol (siehe 1.4.7) (Lee and Lee, 2010) und das LuxR Homolog SdiA (Kanamaru et al., 2000), um Signale zwischen den Zellen zu übertragen (Hernandez-Doria and Sperandio, 2013). ‘Quorum sensing’ kann die Pathogenitätsinsel LEE, als auch Flagellenbildung, Beweglichkeit und die Shiga Toxin Bildung beeinflussen (Hernandez-Doria and Sperandio, 2013; Sperandio et al., 2001). Die Induktion der SOS Antwort (*recA*, *uvrA*, *sulA*) durch das ‘Quorum sensing’ System (*luxS*) führt zur Phageninduktion und somit zur Stx Produktion (Sperandio et al., 2001).

1.4.7 Indol

Viele EPEC, EHEC und andere *E. coli* Stämme produzieren mit dem Enzym Tryptophanase (Gen: *tnaA*) aus Tryptophan Indol, Ammoniak und Pyruvat, was es Ihnen ermöglicht

Tryptophan als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen (Yanofsky et al., 1991). Das Metabolit Indol reguliert die Biofilm Bildung (Wang et al., 2001), dient als Signalmolekül (siehe 1.4.6) und ist für die Anpassung an Stress zuständig (Kuczynska-Wisnik et al., 2002; Kuczynska-Wisnik et al., 2010; Lee et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Indol-3-carboxaldehyd (ICA) die Shiga Toxin Produktion in EAHEC des Serotyps O104:H4 (2011C-3495) und EHEC des Serotyps O157:H7 (8624) hemmt (Bommarius et al., 2013). Obwohl der genaue Wirkmechanismus noch unbekannt ist, könnten Indole als neues Therapeutikum zur Behandlung von pathogenen *E. coli* Stämmen eingesetzt werden (Bommarius et al., 2013).

1.4.8 Hohe Salzkonzentration

Die Zusammensetzung der Ionen in Bakterienzellen verändert sich mit der Kationenkonzentration im Wachstumsmedium (Shkilnyj and Koudelka, 2007). Mit steigender Salzkonzentration konnte ein Anstieg der spontanen Induktion des λ Phagen festgestellt werden. Dieser Anstieg der spontanen Induktion war nicht von RecA abhängig und wurde somit nicht durch eine Aktivierung der SOS Antwort hervorgerufen. Auch eine Abhängigkeit von der osmotischen Stressantwort wurde ausgeschlossen (Shkilnyj and Koudelka, 2007). Es wird vermutet, dass Salzstress die Bindungsaffinität des Repressors CI verändert und dadurch zur Phageninduktion führt (Shkilnyj and Koudelka, 2007). Die Induktion durch Salzstress kann somit neben der SOS Antwort (RecA) als alternative Möglichkeit der Phageninduktion durch De-Repression von CI angesehen werden.

1.4.9 Einfluss des Immunsystems auf die Shiga Toxin Produktion

Es ist bekannt, dass Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen auch die Neutrophilen zählen, sowohl NO (siehe 1.4.9.2), als auch H_2O_2 produzieren (Lobysheva et al., 1999).

1.4.9.1 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

H_2O_2 führt zu einer erhöhten Shiga Toxin Produktion in phageninfizierten EHEC Stämmen durch Induktion der SOS Antwort. Auch eine Inkubation von EHEC Bakterien mit humanen Neutrophilen erhöhte die Shiga Toxin Produktion (Los et al., 2010; Wagner et al., 2001). Die Bekämpfung einer EHEC Infektion durch das Immunsystem mittels H_2O_2 führt dadurch letztlich zu einer erhöhten Produktion des Shiga Toxins.

1.4.9.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO), welches von Endothelzellen oder Makrophagen gebildet wird, ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort (Vareille et al., 2007). In infizierten und entzündeten Darmabschnitten kann eine hohe Produktion von NO für pathogene Bakterien zytotoxisch wirken (Gobert et al., 2001). Die Interaktion des NOs mit Rezeptoren, wie dem Repressor NsrR (Bodenmiller and Spiro, 2006; Rodionov et al., 2005), kann zu Änderungen im Transkriptom der Bakterien führen. Stickstoffmonoxid verhindert, vermittelt durch den Sensor NsrR sowohl die *stx2* mRNA Expression und damit die Stx2 Produktion, als auch die Freisetzung von Stx2-Phagen (Vareille et al., 2007). Des Weiteren wird RecA herunterregelt, was ein Hinweis darauf ist, dass NO die bakterielle SOS Antwort hemmt (Vareille et al., 2007). Dies geschieht vermutlich zum Teil durch De-Repression des NO-sensitiven Repressors NsrR (Vareille et al., 2007). Die Hemmung der Shiga Toxin Produktion durch NO *in vivo* stellt einen wichtigen Mechanismus zur Reduzierung der durch Shiga Toxin verursachten Nebenwirkungen einer EHEC Infektion dar.

1.5 Phagen

Phagen und Phagenresistenzmechanismen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Bakterienpopulationen in den meisten, wenn nicht in allen Habitaten (Labrie et al., 2010). Zu den wichtigsten Bakteriophagen zählen die Shiga Toxin Phagen. Shiga Toxin (Stx) Phagen sind genetisch so hochvariabel, dass ihr einziges gemeinsames genetisches Merkmal der Besitz von für Shiga Toxin kodierende Gene ist (Allison, 2007; Muniesa et al., 2004; Smith et al., 2007). Die Stx Phagen beinhalten doppelsträngige DNA und gehören zu den Familien der Siphoviridae oder Myoviridae (Schmidt, 2001). Der Phage 933W besitzt beispielsweise ein isometrisch ikosaedrisches Kapsid und einen kurzen Schwanz (Muniesa et al., 2004). Es kommen aber auch Phagen mit langen, dicken geraden oder gekrümmten Schwänzen vor (Muniesa et al., 2004).

Die Freisetzung von Phagen durch Lyse der *E. coli* Bakterien kann dazu führen, dass die freigesetzten Phagen andere *E. coli* Stämme (Muniesa et al., 2004; Muniesa et al., 2003; Muniesa et al., 2012) oder andere Genera von Bakterien (Strauch et al., 2001) infizieren. Es wird vermutet, dass YeaT einen konservierten Rezeptor in *E. coli* zur Bindung von Phagen darstellt (Muniesa et al., 2012), welcher auch in *E. coli* O104:H4 vorhanden ist (Rohde et al., 2011). An diesen Rezeptor binden etwa 70% der Stx Phagen durch konservierte Regionen ihrer 'Spike' Proteine am Schwanzende von Phagen mit 'Kurzschwanzphänotyp' (Smith et

al., 2007). Darüber hinaus dient der Rezeptor LamB (Cumby et al., 2012), welcher auch als Maltoporin bezeichnet wird, als Phagenrezeptor. Kommt es zu einer Infektion der kommensalen Darmbakterien durch Stx Phagen kann das zu einer vermehrten Shiga Toxin Produktion im Darm führen (Smith et al., 2007). Dies stellt einen wichtigen Punkt der Pathogenität von Shiga Toxin produzierenden Bakterien dar.

1.6 Phagen Resistenz

Um sich vor den Angriffen der Phagen zu schützen, entwickelten sich in Bakterien Phagen Resistenz Mechanismen. Die Phagen entwickelten ihrerseits Mechanismen diese zu umgehen.

1.6.1 Verhindern der Adsorption

Die Adsorption von Phagen an Wirtszellrezeptoren ist der erste Schritt einer Infektion. Die Resistenzmechanismen der Adsorption können in drei Kategorien unterteilt werden: Blockade von Phagenrezeptoren, Produktion einer extrazellulären Matrix und die Produktion von kompetitiven Inhibitoren (Labrie et al., 2010).

1.6.1.1 Blockade von Phagenrezeptoren

Der *E. coli* Phage T5 lässt von seiner Wirtszelle ein Lipoprotein (Llp) produzieren, welches den T5-Rezeptor FhuA blockiert und so eine Superinfektion verhindert (Pedruzzi et al., 1998). Dies verhindert gleichzeitig eine Bindung von neu gebildeten Phagen an lysierte Zellreste (Pedruzzi et al., 1998).

Auch Wirtszellen können Lipoproteine nutzen, um die Bindung von Phagen zu verhindern. So nutzen F^+ *E. coli* Stämme das Membranprotein TraT, welches vom F-Plasmid kodiert wird, um die Konformation des T-Phagenrezeptors OmpA zu verändern und so deren Bindung zu verhindern (Labrie et al., 2010; Riede and Eschbach, 1986).

1.6.1.2 Produktion einer extrazellulären Matrix

Die Produktion von extrazellulären Polymeren ermöglicht es den Bakterien eine Barriere zwischen den Phagen und ihren Rezeptor zu schaffen, was eine Infektion erschwert oder verhindert (Labrie et al., 2010). Die extrazelluläre Matrix kann allerdings im Gegenzug auch von Phagen als Rezeptor genutzt werden (Castillo and Bartell, 1976).

In *E. coli* gibt es eine Vielzahl von O-Antigenen (Lipopolysaccharide) und K-Antigenen (Kapsel), die als Rezeptoren für Phagen dienen können (Labrie et al., 2010). Die Diversität dieser Rezeptoren, oder deren Abwesenheit, verhindert die Bindung spezifischer Phagen. So können unter anderem kapselspezifische Phagen nicht an kapsellose *E. coli* Mutanten binden (Fitzgerald-Hughes et al., 2014; Stirm, 1968).

Die Phasenvarianz ist ein weiterer Mechanismus, der es Bakterien wie *Haemophilus influenza* ermöglicht die Bindung von Phagen (z.B. HP1v1) zu verhindern. Verantwortlich hierfür ist eine Modifikation des *lic2A* Genes, welches am Lipo- und Oligosaccharid Syntheseweges beteiligt ist (Zaleski et al., 2005).

1.6.1.3 Produktion von kompetitiven Inhibitoren

Die Phagen T1, T5 und Φ 80 nutzen in *E. coli* den Eisentransporter FhuA als Rezeptor (Breyton et al., 2013; Labrie et al., 2010; Langenscheid et al., 2004). Die Bildung von Mikrozin J25 unter Nährstoffmangel und dessen Bindung an FhuA vermeiden die Bindung der oben genannten Phagen (Destoumieux-Garzon et al., 2005).

1.6.2 Verhindern von DNA Aufnahme

Bei 'Superinfection exclusion' Systemen (Sie) handelt es sich in der Regel um membranassoziierte Proteine, die die Aufnahme von Phagen DNA in die Wirtszelle blockieren und so eine Resistenz gegen bestimmte Phagen vermitteln (Labrie et al., 2010).

Der Phage T4 besitzt zwei Sie - Systeme die durch *imm* und *sp* kodiert werden (Labrie et al., 2010) (siehe Abbildung 9). Durch Konformationsänderungen an der Eintrittsstelle blockiert das Membranprotein Imm ('immunity protein') die Übertragung der Phagen DNA in das Zytoplasma der Bakterienzelle (Lu et al., 1993). Das Membranprotein Sp blockiert die Aktivität des T4 Lysozyms (*gp5*), verhindert so die Degradierung des Peptidoglykans und somit die Übertragung der Phagen DNA (Moak and Molineux, 2000).

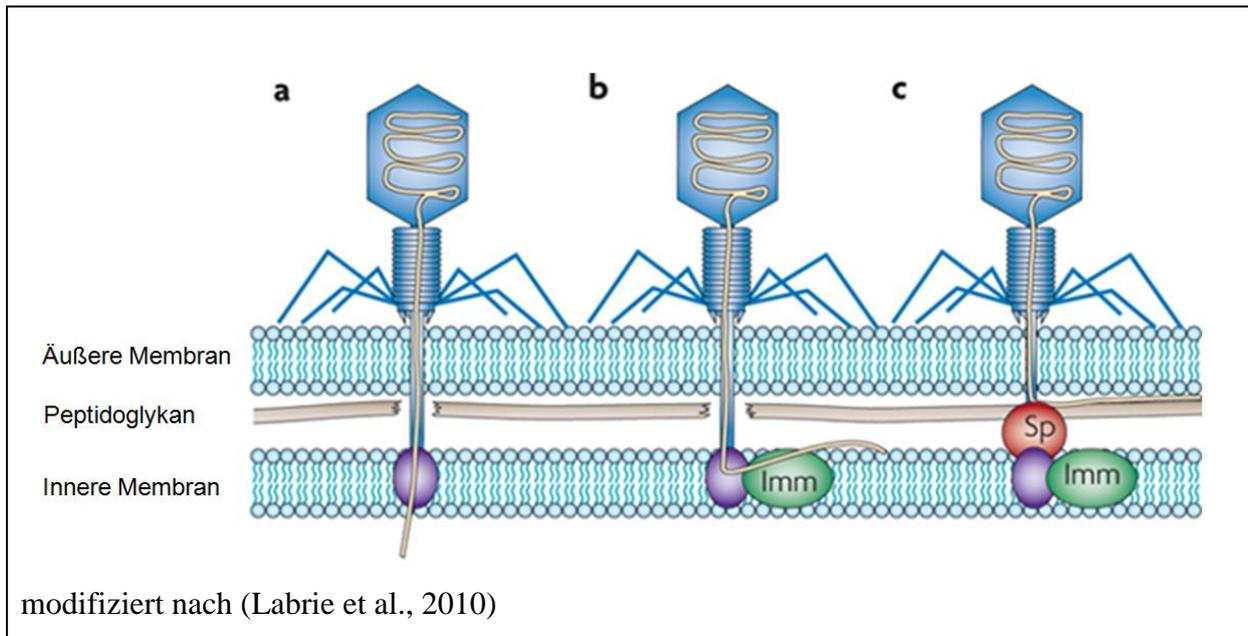


Abbildung 9: Systeme zur Blockade der Übertragung von Phagen DNA

(a) Infektion einer *E. coli* Bakterienzelle durch einen T4 Phagen. Peptidoglykan wird degradiert und ein Membranprotein ist an der Translokation der DNA ins Zytoplasma beteiligt. (b) Der Phage T4 kodiert das Imm Protein, welches die Translokation der DNA ins Zytoplasma blockiert und damit die Infektion verhindert. (c) Das Protein Sp blockiert die Degradierung von Peptidoglykan und klemmt damit die DNA zwischen Peptidoglykan und der Äußeren Membran ein. (Labrie et al., 2010)

1.6.3 Schneiden von Phagen DNA

1.6.3.1 RM-Systeme

Restriktions/Modifikations-Systeme (RM-Systeme) sind Zweikomponentensysteme, bestehend aus einer Endonuklease und einer Methyltransferase (Suzuki, 2012). Nicht methylierte Phagen DNA wird von der Endonuklease erkannt und gespalten (Pingoud et al., 2005b), während die Methyltransferase zelleigene DNA methyliert und so deren Abbau verhindert (Labrie et al., 2010). Es wurden viele Strategien von Phagen entwickelt, um das RM-System zu umgehen, während die Bakterien es ihrerseits kontinuierlich weiterentwickeln (Labrie et al., 2010).

So besitzen λ Phagen mit *ral* einen Mechanismus zur Verminderung der Aktivität des RM-Systems (Zabeau et al., 1980). *Ral* steigert die Methyltransferaseaktivität von Typ I RM-Systemen und erhöht somit die Methylierungsrate der Phagen DNA, was zu einem verminderten Abbau der DNA führt (King and Murray, 1995; Pingoud et al., 2005a; Zabeau et al., 1980).

1.6.3.2 CRISPR-Cas System

‘Clustered regularly interspaced short palindromic repeats’ (CRISPR) und CRISPR-assoziierte (Cas) Gene kommen in einer Vielzahl von bakteriellen Genomen vor (Louwen et al., 2014). Die CRISPR-Cas Sequenz besteht üblicherweise aus direkten Wiederholungen (21-48 bp), welche von Platzhaltern (‘Spacer’, 26-72 bp) unterbrochen und von *cas* Genen (4-20) flankiert werden (Labrie et al., 2010). Dieses System wird auch als adaptives bakterielles Immunsystem bezeichnet und dient der Abwehr von Nukleinsäuren eindringender Plasmide und Phagen, was meist mit deren Degradierung einhergeht (Horvath and Barrangou, 2010; Louwen et al., 2014). CRISPRs eignen sich von Phagen Spacer-Sequenzen an, welche eine Immunität gegen diese Phagen bewirken (Sorek et al., 2008). Die ‘Repeat-Spacer’-Sequenz wird in lange RNA transkribiert und in kleine RNAs (sRNA) prozessiert, welche aus dem ‘Spacer’ und je einen halben ‘Repeat’ an den Enden bestehen (Sorek et al., 2008). Ein Komplex aus sRNA und Cas Proteinen bindet dann an Phagen Nukleinsäuren, was zur Degradierung dieser fremden Nukleinsäuren führt (Sorek et al., 2008) (siehe Abbildung 10).

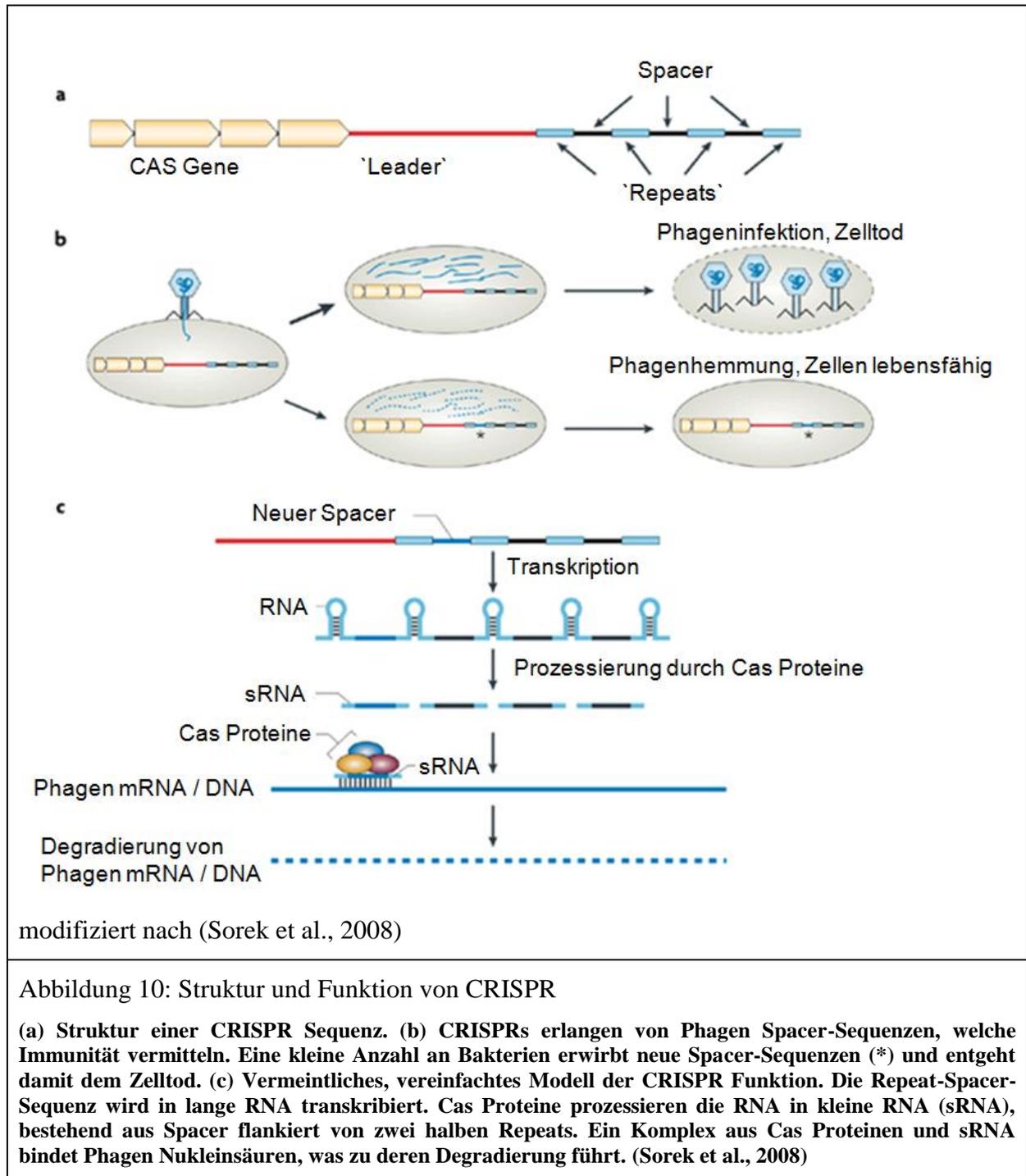


Abbildung 10: Struktur und Funktion von CRISPR

(a) Struktur einer CRISPR Sequenz. (b) CRISPRs erlangen von Phagen Spacer-Sequenzen, welche Immunität vermitteln. Eine kleine Anzahl an Bakterien erwirbt neue Spacer-Sequenzen (*) und entgeht damit dem Zelltod. (c) Vermeintliches, vereinfachtes Modell der CRISPR Funktion. Die Repeat-Spacer-Sequenz wird in lange RNA transkribiert. Cas Proteine prozessieren die RNA in kleine RNA (sRNA), bestehend aus Spacer flankiert von zwei halben Repeats. Ein Komplex aus Cas Proteinen und sRNA bindet Phagen Nukleinsäuren, was zu deren Degradierung führt. (Sorek et al., 2008)

1.6.4 'Abortive infection' (Abi) System

Abi-Systeme zeichnen sich durch den Tod der Bakterienzelle nach Infektion mit Phagen aus (Labrie et al., 2010). Ein sehr bekanntes Abi System ist das Rex System in lysogenen λ -*E. coli* (Molineux, 1991; Snyder, 1995), welches die zwei Komponenten RexA und RexB benötigt. RexA wird während der Phageninfektion durch einen Phagenprotein-DNA-Komplex aktiviert (Parma et al., 1992; Snyder, 1995). Das membrangebundene RexB wird wiederum durch zwei aktive RexA Proteine aktiviert. Bei RexB handelt es sich um einen Ionenkanal,

welcher nach Aktivierung das Membranpotential reduziert und damit zu einem Abfall des ATP-Levels führt (Labrie et al., 2010). Dadurch wird die Synthese von Makromolekülen reduziert, was schließlich zum Stopp der Zellteilung führt (Parma et al., 1992; Snyder, 1995). Durch den Abfall des ATP-Levels bricht auch die ATP-abhängige Phageninfektion ab (Labrie et al., 2010) (siehe Abbildung 11).

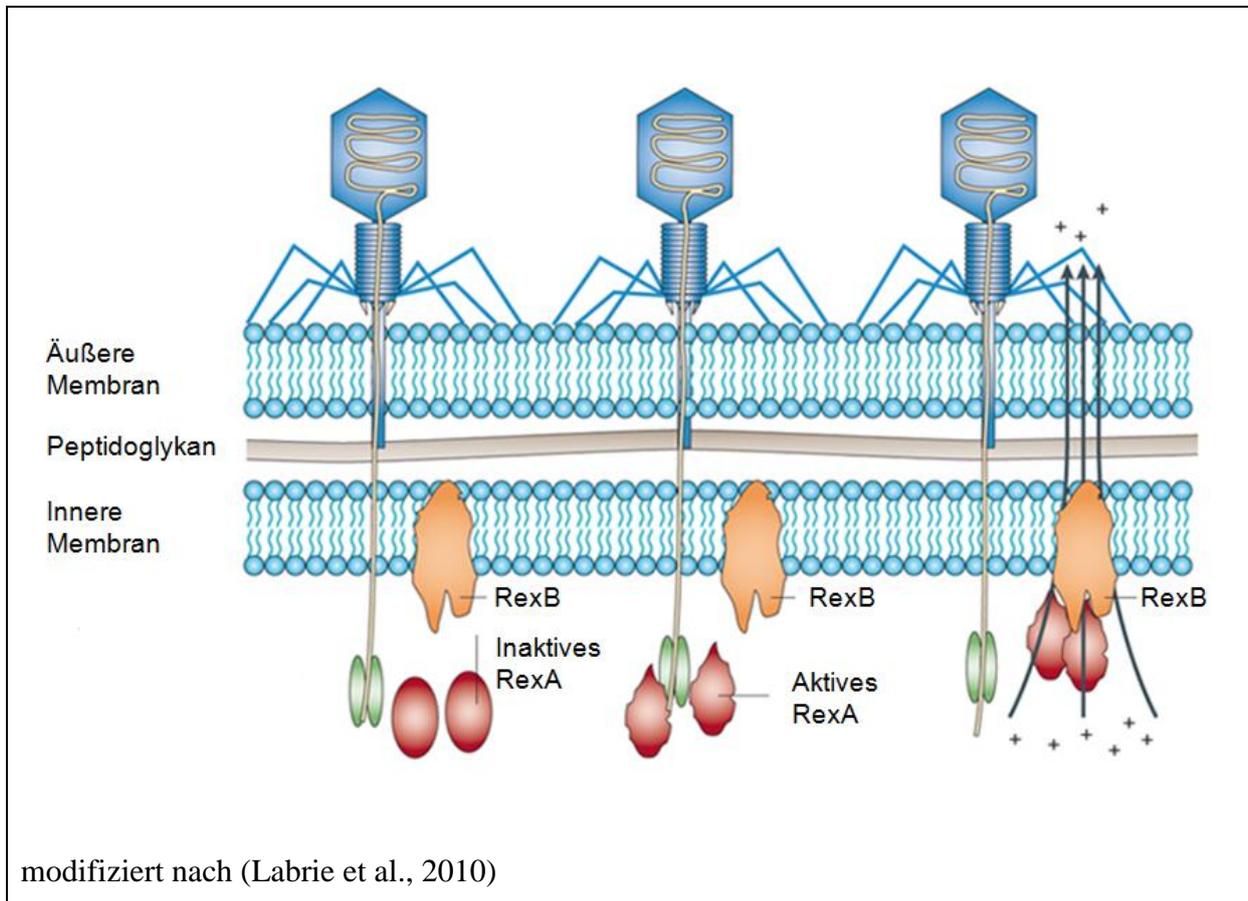


Abbildung 11: Funktionsweise des Rex Systems

Das Rex System ist ein Beispiel eines Zweikomponenten Abi System, welches in *E. coli* agiert. Die inaktive Form des Sensorproteins RexA wird durch einen Phagenprotein-DNA Komplex aktiviert. Zwei aktivierte RexA Proteine veranlassen die Aktivierung des membranassoziierten Proteins RexB, welches als Ionenkanal agiert und die Passage von Kationen durch die innere Membran erlaubt. Dadurch wird das Membranpotential zerstört, was die Bakterienzelle tötet, aber gleichzeitig auch zum Abbruch der ATP-abhängigen Phageninfektion führt. (Labrie et al., 2010)

1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung

E. coli Nissle 1917 (EcN) zählt durch seine fast hundertjährige Nutzung als Arzneimittel und aufgrund der weitreichenden Forschung während der letzten Jahrzehnte mittlerweile zu einem der am besten untersuchten Probiotika. Das Fehlen von effektiven Möglichkeiten einer Infektionsprophylaxe oder einer Behandlung von EHEC Infektionen führte zur Fragenstellung dieser Arbeit, welche auf 4 Säulen basiert. Im Allgemeinen sollten die antagonistischen

Effekte des probiotischen *E. coli* Stamm Nissle 1917 auf pathogene *E. coli* Stämme, wie dem EHEC Stamm EDL933 oder klinischen EAHEC O104:H4 Isolaten, untersucht werden. Dabei sollte zunächst die Adhäsion der pathogenen Stämme, als erste Säule, in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN überprüft werden, was die Wachstumskontrolle der Stämme, als zweite Säule, beinhaltet. Hierbei handelt es sich um wichtige Faktoren, welche eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer EHEC Infektion spielen. Die dritte der vier Säulen umfasste die Untersuchung der Shiga Toxin Bildung der pathogenen *E. coli* Stämme als einen der wichtigsten Virulenzfaktoren. Es sollte hier geklärt werden, welchen Einfluss EcN auf die Shiga Toxin Produktion von EHEC und EAHEC Stämmen hat. Die vierte und wichtigste Säule umfasste die Überprüfung der Shiga Toxin Phagenresistenz von EcN, was als Sicherheitsaspekt essentiell für die Entwicklung einer Behandlung ist. Bei jedem Teilgebiet sollte, falls möglich, der für die beobachteten Effekte verantwortliche Wirkmechanismus erforscht werden.

2 Materialien

2.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

Gerät/Arbeitsmaterial	Bezeichnung / Hersteller
-20°C Gefrierschrank	Premium NoFrost GN 3056, Liebherr (Ochsenhausen)
24 – Kavitäten – Platte	CELLSTAR [®] TC – Platte 24 Well, Greiner BioOne (Frickenhausen)
15 ml – Röhrchen	PS, 15 ml, konischer Boder, steril, Greiner BioOne (Frickenhausen)
50 ml – Röhrchen	PS, 50 ml, konischer Boder, steril, Greiner BioOne (Frickenhausen)
Brutschrank	Jouan INNOVENS, Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
	Function Line BB 16, Heraeus [®] Thermo Fisher Scientific (Hanau)
Schüttelinkubator	Innova 4000, New Brunswick Scientific (Enfield, USA)
4°C – Kühlschrank	Öko Energiesparer, Privileg (Fürth)
-80°C Gefrierschrank	HERAfreeze HFU 686 Basic, Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Analysewaage	JL-180, Chyo Balance Corporation (Japan)
Gelelektrophoresekammer	Midi – large 460.000, Harnischmacher (Nottuln)
Chamber slides [™] (Objektträger mit Aufbau)	Nunc Lab-Tek Chamber Slide System (8 Well, Permanox [®] Plastik, Thermo Fischer Scientific (Erlangen)
Critical-Point-Dryer (CPD)	BAL-Tec (Schalksmühle)
Dampfsterilisator	Vakulab PL 669 – 2 H R/L, MMM Münchner Medizin Mechanik GmbH (München)
Deckgläser (24x50 mm)	Knittel Gläser GmbH (Bielefeld)
Digitalkamera	Powershot G3, Canon (Tokio, Japan)
Eismaschine	Eisbereiter AF30, Scotsman (Vernon Hills, IL, USA)

Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell™, Bio – Rad (Hercules, CA, USA)
Elektroporationsküvetten	GenePulser® Küvette, Bio – Rad (Hercules, CA, USA)
ELISA Reader	MultiskanAscent, Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Gel-Dokumentation	INTAS® GDS, Intas (Göttingen)
Feinwaage	JL – 180, Chyo Balance Corp. (Japan)
Filtereinheiten	Millex® – GV PVDF 0,22µm Millex® – GP PES 0,22µm Millipore (Wien, Österreich)
Gerät zum Durchmischen von Proben	Vortex Power Mix L46, Labinco (Niederlande)
Greiner – Röhrchen	Cellstar® Tubes 15 ml Cellstar® Tubes 50 ml Greiner Bio – one (Frickenhausen)
Grobwaage	Kern 470, Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Heizblock	HX – 2, Peqlab (Erlangen)
	Thermo-Shaker TS-100, Peqlab (Erlangen)
Kulturröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Kryoeinfriergerät	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Kryoröhrchen	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Kühl – Mikrozentrifuge	Biofuge 13R, (Rotor: Sepatech #3757) Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge	Heraeus Multifuge X3R (Rotor: Fiberlite F15-8x50cy), Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
	Heraeus Multifuge X1R (Rotor: Highconic II), Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
	Multifuge® 1 L – R, Heraeus (Hanau), Sorvall 75002000, Heraeus (Hanau)
Lichtmikroskop zur Kontrolle der Zellkulturen	Telaval 31, Zeiss (Jena)

Luminometer	Luminescence Reader, Victor™ X Light, Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Magnetrührer	L – 81, Labinco (Niederlande) KM02 electronic, IKA – Labortechnik (Staufen)
Mikrowelle	8017, Privileg (Benton Harbor, MI, USA)
Mikrozentrifuge	Biofuge Pico (Rotor: PP 1/99 #3325), Heraeus (Hanau)
	Heraeus Pico 21 (Rotor: 75003424), Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
Mikrotiterschüttler	Titramax 1000, Heidolph Instruments (Schwabach)
NanoDrop® – Analysegerät	Spectrophotometer ND – 1000, Peqlab (Erlangen)
Netzgerät	E455, Consort (Turnhout, Belgien)
Neubauer – Zählkammer	Precicolor, HBG (Giessen – Luetzellinden)
Pipettenspitzen mit Filter	MultiGuard Barrier Tips, Sorenson BioScience (Salt Lake City, USA)
Serologische Pipetten	Greiner BioOne (Frickhausen)
K ⁺ -Elektrode	Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
pH – Meter	Inolab pH 720, WTW (Weilheim)
pH/Ionen - Meter	SevenCompact, Mettler-Toledo (Greifensee, Schweiz)
Photometer	Ultrospec™ 3100 pro, Amersham Biosciences (Nürnberg)
Pipettus	Accu – jet® pro, Brand (Wertheim)
Spritzen (steril)	Injekt® 5ml + 10ml, Braun (Melsungen)
Rasterelektronenmikroskop	JEOL JSM-7500F, JEOL (Eichingen)
Sterilbank	HeraSafe® HS 12/2, Heraeus (Hanau)
	Class II Type A/B3, Nuaire (Plymouth, MN, USA)
Dialysemembran	Spectra/Por® , MWCO: 6-8.000, SpectraLabs (Breda, Niederlande)
Dialysemembranschlauchklemmen	Spectra/Por® Weight Closures, SpectraLabs (Breda, Niederlande)
Transmissionselektronenmikroskop	EM 10, Zeiss (Jena)

Kanüle	Sterican [®] , 20 G, Braun (Melsungen)
Zellkultureinsätze	24 Well ThinCert (0,4 µm), Greiner BioOne (Frickenhausen)
Zellkulturflasche	CELLSTAR [®] Filter Top (75 cm ²), Greiner BioOne (Frickenhausen)

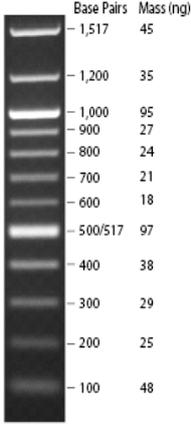
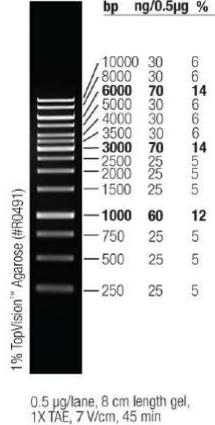
2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar (Difco TM)	BD Bioscience (Heidelberg)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid (Dihydrat, p.a. ACS)	Roth (Karlsruhe)
Chloroform zur Analyse EMSURE [®]	Merck (Darmstadt)
CHROMagar TM Orientation	BD Bioscience (Heidelberg)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	NEB (Frankfurt/Main)
DNA Ladepuffer 6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (Erlangen)
DNA Ladepuffer 6x Gel Loading Dye Blue	NEB (Frankfurt/Main)
DNA Ladepuffer 5x GelPilot DNA Loading Dye	Qiagen (Hilden)
DNA Größenstandard 100 bp	NEB (Frankfurt/Main)
DNA Größenstandard 1 kb	Fermentas (St. Leon – Rot)
Doxycyclin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM), High Glucose, L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>E. coli</i> -Coliformen-Agar (ECC)	Medco (München)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Eisessig (Essigsäure, Rotipuran [®] 100 %, p.a.)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (1 %ige Lösung in H ₂ O)	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum Gold , FBS)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Gallensalze	Difco Nr.3, BD Bioscience (Heidelberg)
Giemsa – Stammlösung	Roth (Karlsruhe)

Glutaraldehyd-Lösung (50 %)	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin (86 %)	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Immersionsöl	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Ladepuffer (Loading Dye Solution 6x)	Fermentas (St. Leon – Rot)
L – Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS Pellets)	Roth (Karlsruhe)
PBS, Dulbecco´s PBS (ohne Ca & Mg)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
peqGold Universal Agarose	Peqlab (Erlangen)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (rauchend, Rotipuran® 37 %, p.a.)	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Trypton (aus Casein, pankreatisch verdaut)	Roth (Karlsruhe)
Tween® 20	AppliChem (Darmstadt)
Trypanblau	Fluka Analytical (Buchs, Schweiz)
Uranylacetat (2 % in H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (30% reinst)	Roth (Karlsruhe)

2.3 Größenstandards

 <p>Base Pairs Mass (ng)</p> <p>— 1,517 45</p> <p>— 1,200 35</p> <p>— 1,000 95</p> <p>— 900 27</p> <p>— 800 24</p> <p>— 700 21</p> <p>— 600 18</p> <p>— 500/517 97</p> <p>— 400 38</p> <p>— 300 29</p> <p>— 200 25</p> <p>— 100 48</p>	 <p>bp ng/0.5µg %</p> <p>10000 30 6</p> <p>8000 30 6</p> <p>6000 70 14</p> <p>5000 30 6</p> <p>4000 30 6</p> <p>3500 30 6</p> <p>3000 70 14</p> <p>2500 25 5</p> <p>2000 25 5</p> <p>1500 25 5</p> <p>1000 60 12</p> <p>750 25 5</p> <p>500 25 5</p> <p>250 25 5</p> <p>1% TopViewision™ Agarose (#RC491)</p> <p>0.5 µg/lane, 8 cm length gel, 1X TAE, 7 V/cm, 45 min</p>
<p>Abbildung 12: 100 bp DNA – Ladder #3231S von NEB (Frankfurt)</p>	<p>Abbildung 13: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder #SM0311 von Fermentas (St. Leon – Rot)</p>

2.4 Antibiotika

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Konzentration der Stocklösung in mg/ml	Endkonzentration in µg/ml	Hersteller	Lösungsmittel
Kanamycin	50	50	Roth (Karlsruhe)	ddH ₂ O
Ampicillin	50	50	Roth (Karlsruhe)	ddH ₂ O
Doxycyclin	6	6	Roth (Karlsruhe)	ddH ₂ O

Weitere Antibiotika wurden in Form von Testkits zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (3.1.3) verwendet.

2.5 Medien, Puffer und Lösungen

Medien, Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder hitzeinstabile Stoffe steril filtriert und nach Abkühlen hinzugefügt. Falls nicht anders angegeben, wurden diese bei Raumtemperatur (RT) am Arbeitsplatz gelagert.

2.5.1 Flüssigmedien

- LB – Medium: siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Zusammensetzung von LB – Medium

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Trypton	10 g
Wasser (dH ₂ O)	ad 1000 ml

- SCEM – Medium (Polzin et al., 2013)

Tabelle 5: Zusammensetzung von SCEM – Medium

Bestandteil	Menge
Trypton	6,25 g
D – Glukose	2,6 g
Natriumchlorid	0,88 g
KHCO ₃	2,7 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
NaHCO ₃	1,7 g
Gallensalze (Nr. 3, Difco)	4,0 g
Wasser (dH ₂ O)	ad 1000 ml

- DMEM – Medium:

Es wurde DMEM Medium („high Glucose 4,5 g/l, with L – Glutamin“) des Herstellers PAA Laboratories GmbH (Cölbe) mit FBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) verwendet. Hierfür wurde die FBS – Flasche nach Lagerung bei -20°C aufgetaut und dann 20 min bei 60°C hitzeinaktiviert. Aliquots von 50 ml des fetalen Kälberserums (10%) wurden anschließend bei Bedarf der 500 ml Flasche mit DMEM – Medium zugefügt (siehe 7.1).

- Einfriermedium:

Zur Herstellung des Einfriermediums wurden 70 % DMEM – Medium, 20 % FBS und 10 % DMSO verwendet.

2.5.2 Festmedien

- LB – Agar (1,5 % Agar): siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammensetzung von LB – Agar

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Trypton	10 g
Agar	15 g
Wasser (dH ₂ O)	ad 1000 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung von LB – Softagar

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Trypton	10 g
Agar	6 g
Wasser (dH ₂ O)	ad 1000 ml

- ECC Agar (Medco)
- CHROMagar™ Orientation (BD)

2.5.3 Puffer und Lösungen

- TAE 50x: siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: TAE 50x

Bestandteil	Menge
Tris	193,6 g
Eisessig	45,6 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	80 ml
Wasser (dH ₂ O)	ad 800 ml

- EDTA (0,5 M, pH 8,0)
- wässrige 10 % – ige Glycerin – Lösung

- wässrige 10 mM Magnesiumchlorid – Lösung
- 0,9 % – ige Natriumchlorid – Lösung (Saline)
- 0,1 % – iges Triton X-100 in sterilem Wasser (dH₂O)

2.6 Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide (Primer) von Eurofins (Ebersberg): siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Schmelztemperatur
O104rfbO-f	5'-TGAAGTATTTTAGGATGG-3'	57,2 °C
O104rfbO-r	5'-AGAACCCTCACTCAAATTATG-3'	53,8 °C
fliCH4-a	5'-GGCGAAACTGACGGCTGCTG-3'	57,9 °C
fliCH4-b	5'-GCACCAACAGTTACCGCCGC-3'	59,7 °C
TerD1	5'-AGTAAAGCAGCTCCGTCAAT-3'	60,9 °C
TerD2	5'-CCGAACAGCATGGCAGTCT-3'	55,4 °C
LP43	5'-ATCCTATTCCTCCGGGAGTTTACG-3'	60,3 °C
LP44	5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'	62,1 °C
KS7	5'-CCCGGATCCATGAAAAA AACATTATTAATAGC-3'	63,1 °C
KS8	5'-CCCGAATTCAGCTATTCTGAGTCAACG-3'	65,0 °C
Muta 5	5'-AACTGTGAAGCGATTGACCCC-3'	61,0 °C
Muta 6	5'-GGACTGTTCAGAGAGCTATC-3'	61,0 °C
Muta 7	5'-GACCAAGCGATAACCGGATG-3'	62,0 °C
Muta 8	5'-GTGAGATGATGGCCACGATT-3'	62,0 °C
Muta 9	5'-GCGAGGTAACCTCGAACATG-3'	60,5 °C
Muta 10	5'-CGGCGTATCGATAATTCACG-3'	58,4 °C
luxS fw	5'-TTCTTCGTTGCTGTTGATGCG-3'	52,4 °C
luxS rev	5'-GCTTCACAGTCGATCATACCC-3'	54,4 °C

2.7 Plasmide und Vektoren

Tabelle 10: Verwendete Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Besonderheit	Konstruiert aus/ Referenz
pGEM-T Easy	Ampicillin 75 µg/ml	linearisierter Vektor mit T-Überhängen	Benutzerhandbuch von Promega (Mannheim)
pGEM-T1	Ampicillin 75 µg/ml	cyclisierter pGEM-T Easy Vektor durch Verdau mit EcoRI	pGEM-T Easy Vektor
pluxCDAB3	Ampicillin 75 µg/ml	C-P Reporter Plasmid	(Shimizu et al., 2011)

2.8 Bakterienstämme

Tabelle 11: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz	Herkunft	Nr. ^{a/b}
EHEC EDL933	O157:H7, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , LEE-Pathogenitätsinsel,	(Perna et al., 2001)	Ulrich Dobrindt, Münster	3 ^b
EHEC EDL933 E1-E2S	O157:H7, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>luxE</i> unter <i>stx1</i> -Promotorkontrolle	(Shimizu et al., 2011)	Takeshi Shimizu, Chiba, Japan	40 ^b
EHEC EDL933 E(SR)2-E1S	O157:H7, <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>luxE</i> unter <i>stx2</i> -Promotorkontrolle, ΔS + R (Lyse Gene)	(Shimizu et al., 2011)	Takeshi Shimizu, Chiba, Japan	41 ^b
EAHEC TY3730	O104:H4, <i>stx2</i> , pESBL, pAA, Amp ^R , Klinisches Isolat (Gastroenteritis)	(Mellmann et al., 2011)	Holger Rohde, Hamburg	15 ^b
EAHEC TY3456	O104:H4, <i>stx2</i> , pESBL, pAA, Amp ^R , Klinisches Isolat (HUS ⁺)	(Mellmann et al., 2011)	Holger Rohde, Hamburg	28 ^b
EHEC 1530/99 (HUSEC018)	O26:H11, <i>stx2</i> , <i>eae</i> ⁺ , EHEC- <i>hlyA</i> , <i>terE</i> , Stx-Titer: 1024	(Mellmann et al., 2008), HUSEC Referenzstamm-sammlung (Münster)	IMIB Stammsammlung (937)	5 ^b

EHEC 5714/96	O103:H2, <i>stx1</i> , <i>eae</i> ⁺ , <i>hly</i> ⁺	(Schmidt et al., 1999)	IMIB Stammsammlung (722)	6 ^b
EHEC 1637/77	O111:H ⁻ , <i>stx1</i> , <i>eae</i> ⁺		IMIB Stammsammlung (721)	7 ^b
EHEC 4392/97 (HUSEC033)	O145:H25, <i>stx2</i> , <i>eae</i> ⁺ , EHEC- <i>hlyA</i> , Stx-Titer: 16	(Mellmann et al., 2008), HUSEC Referenzstamm- sammlung (Münster)	Ulrich Dobrindt, Münster	32 ^b
EAEC 55989	O104:H4, AAF/III	(Brzuszkiewicz et al., 2011)	Ulrich Dobrindt, Münster	34 ^b
<i>Escherichia coli</i> CFT073	Uropathogenes human Isolat, O6:K2:H1; Hämolytisch; Typ IV Pili	(Hancock et al., 2010; Vejborg et al., 2010)	IMIB Stammsammlung	338 ^a
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (<i>Nalr</i>), <i>relA1</i> , Δ(<i>lacIZYA-argF</i>), U169, <i>deoR</i> , Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15λ</i> ⁻	(Woodcock et al., 1989), (Grant et al., 1990)	Stammsammlung AGÖ	14
<i>Escherichia coli</i> MG1655	OR:H48:K ⁻ , F ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	(Blattner et al., 1997)	Stammsammlung AGÖ	2
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	O6:K5:H1; pMUT1, pMUT2, Mikrozin H47/M, F1C- Fimbrien, Typ 1 Fimbrien, Curli	(Schiemann, 2010)	Ardeypharm (Herdecke)	1 ^a
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 ΔK5	O6:K5:H1; Mikrozin H47/M, F1C- Fimbrien, Typ 1 Fimbrien, Curli, ΔK5		Stammsammlung AGÖ	94
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 c	O6:K5:H1; Mikrozin H47/M, F1C- Fimbrien, Typ 1 Fimbrien, Curli, ΔpMUT1, ΔpMUT2	(Schiemann, 2010)	Stammsammlung AGÖ	9

<i>Escherichia coli</i> Nissle:: <i>luxS</i>	O6:K5:H1; pMUT1, pMUT2, Mikrozin H47/M, F1C- Fimbrien, Typ 1 Fimbrien, Curli, <i>luxS</i> -Mutante	(Jacobi et al., 2012)	Stammsammlung AGÖ	1 ^b
<i>Escherichia coli</i> HB101	K-12xB Derivat, F- λ -, <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (rB-mB-), <i>recA13</i> , <i>leuB6</i> , <i>ara</i> - 14, <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL20</i> (SmR), <i>glnV44</i>	(Boyer and Roulland- Dussoix, 1969)	IMIB Stammsammlung	278 ^a
<i>Escherichia coli</i> ABU83972	UTI Isolat, OR:K5:H	(Klemm et al., 2006; Roos et al., 2006)	Stammsammlung AGÖ	81 ^a

a: Nummer in der Stammsammlung der AG Ölschläger; b: Nummer in der Stammsammlung des S3-Labors

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Übernachtkultur

Übernachtkulturen (ÜNK) wurden soweit nicht anders angegeben in Kapsenberg-Röhrchen hergestellt. Dazu wurden 2 ml LB-Medium mit der entsprechenden Menge Antibiotikum gemischt und in ein Röhrchen überführt. Dieser Mischung wurden 20 µl einer Bakterien-Glycerinkultur (3.1.2) zugefügt. Alternativ wurde eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer Pipettenspitze in das Kapsenberg-Röhrchen gegeben.

3.1.2 Glycerinkultur

Die Bakterienstämme wurden als Glycerinkulturen bei -20°C oder -80°C gelagert. Dafür wurden zunächst 2 ml einer ÜNK (3.1.1) bei 13000 U/min (Mikrozentrifuge) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 500 µl MgCl₂ (10 mM) resuspendiert und 1 ml Glycerin (86 %) zugefügt. Nach kräftigem Mischen wurden die Bakterienstämme eingelagert.

3.1.3 Differenzierung der Bakterienstämme

3.1.3.1 API[®] 20 E

Der API[®] 20 E Streifen test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Enterobakterien wurde, wie in der Gebrauchsanweisung von bioMérieux angegeben, durchgeführt. Die getesteten Reaktionen und die aktiven Substanzen werden in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Im API[®] 20 E Streifentest getestete Reaktionen¹

Abkürzung	Aktive Substanz	Reaktion / Enzyme
ONPG	2-nitrophenyl- βDgalactopyranoside	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βDGalactopyranosidase)
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase
CIT	trisodium citrate	CITrate utilization
H ₂ S	sodium thiosulfate	H₂S production
URE	urea	UREase
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase
IND	L-tryptophane	INDole production
VP	sodium pyruvate	acetoin production (Voges Proskauer)
GEL	gelatin	GELatinase
GLU	D-glucose	fermentation / oxidation (GLU ucose)
MAN	D-mannitol	fermentation / oxidation (MAN nitol)
INO	inositol	fermentation / oxidation (INO sitol)
SOR	D-sorbitol	fermentation / oxidation (SOR bitol)
RHA	L-rhamnose	fermentation / oxidation (RHA mnose)
SAC	D-sucrose	fermentation / oxidation (SAC charose)
MEL	D-melibiose	fermentation / oxidation (MEL ibiose)
AMY	amygdalin	fermentation / oxidation (AMY gdalin)
ARA	L-arabinose	fermentation / oxidation (ARA binose)

¹ Angaben in Englisch vom Produktdatenblatt bioMérieux (REF: 20100)

3.1.3.2 ATB[™] G-EU

Der ATB[™] G-EU Streifentest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Enterobakterien wurde, wie in der Gebrauchsanweisung von bioMérieux angegeben, durchgeführt. Die darin verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen werden in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Chemotherapeutika, die im ATB™ G-EU verwendet werden¹.

Chemotherapeutikum	Abkürzung	Konzentration (µg/ml)
Ampicillin	AMP	8
Amox-Clav.Ac	AMC	8/2
Ticarcillin	TIC	8
Piperacillin	PIC	8
Piperacilin + Tazobactam	TZP	8/4; 16/4
Cephalotin	CFT	8
Cefuroxim	CXM	8
Cefixim	CFM	1
Cefotaxim	CTX	1
Cefoxitin	CXT	8
Cefoxitin 32	CX32	32
Ceftazidim	CAZ	1; 8
Cefepim	FEP	1; 8
Imipenem	IMI	2
Meropenem	MERO	2
Gentamicin	GEN	2
Tobramycin	TOB	2
Amikacin	AKN	8
Tetracyclin	TET	4
Nalidixinsre CASFM	NALF	8
Nalidixinsre CLSI	NALI	16
Ofloxacin	OFL	0,5
Levofloxacin	LVX	1
Ciprofloxacin	CIP	0,5; 1
Cotrimoxazol	TSU	2/38
Fosfomycin	FOS	32

¹ Angaben in Englisch vom Produktdatenblatt bioMérieux (REF: 14318)

3.1.3.3 ATB™ VET

Der ATB™ VET Streifentest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Bakterien tierischer Herkunft wurde, wie in der Gebrauchsanweisung von bioMérieux

angegeben, durchgeführt. Die darin verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen werden in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Chemotherapeutika, die im ATB™ VET verwendet werden¹.

Chemotherapeutikum	Abkürzung	Konzentration (µg/ml)
Penicillin	PEN	0,25
Erythromycin	ERY	1
Amoxicillin	AMO	4
Lincomycin	LIN	2
Amox-Clav.AC	AMC	4/2
Pristinamycin	PRI	2
Oxacillin	OXA	2
Tylosin	TYL	2
Cefalotin	CFT	8
Colistin	COL	4
Cefoperazon	CFP	4
Cotrimoxazol	TSU	2/38
Streptomycin	STR	8
Sulfamethizol	SUL	100
Spectinomycin	SPE	64
Flumequin	FLU	4
Kanamycin	KAN	8
Oxolinic Ac.	OXO	2
Gentamicin	GEN	4
Enrofloxacin	ENR	0,5
Apramycin	APR	16
Nitrofurantoin	FUR	25
Chloramphenicol	CMP	8
Fusidic Ac.	FUC	2
Tetracyclin	TET	4
Rifampicin	RFA	4
Doxycyclin	DOT	4
Metronidazol	MTR	4

¹ Angaben in Englisch vom Produktdatenblatt bioMérieux (REF: 14289)

3.1.3.4 MHK-Gram^{neg}

Der Mikro-Reihenverdünnungstest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von gramnegativen Bakterien wurde, wie in der Gebrauchsanweisung von BioRad angegeben, durchgeführt. Die darin verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen werden in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Chemotherapeutika, die im MHK-Gram^{neg} verwendet werden¹.

Chemotherapeutikum	Abkürzung	Konzentration (µg/ml)
Gentamicin	Gm	1; 2; 4
Amikacin	Ak	4; 8; 16
Tobramycin	To	1; 2; 4
Doxycyclin	Dx	1; 2; 4
Trimethoprim/Sulfamethoxazol*	T/S	16; 32; 64
Ampicillin	Am	2; 4; 8
Ampicillin/Sulbactam	Am/S	2; 4; 8
Mezlocillin	MEC	4; 8; 16
Ticarcillin	TIC	8; 16; 32
Piperacillin	PIP	4; 8; 16; 32
Piperacillin/Tazobactam	PIP/T	4; 8; 16; 32
Azlocillin	ALC	8; 16; 32; 64
Cefsulodin	CFS	2; 4; 8; 16
Aztreonam	AZT	2; 4; 8; 16
Chloramphenicol	Cr	8
Cefaclor	CC	1; 2; 4
Cefixim	CFM	1; 2
Cefuroxim	CRX	1; 2; 4
Cefazolin	CZ	4; 8
Cefotaxim	CTX	2; 4; 8
Cefoxitin	FOX	4; 8
Cefoperazon	CFPZ	2; 4; 8
Cefotiam	CTM	4; 8
Cefepim	CFP	4; 8
Ofloxacin	Ofl	1; 2

Ciprofloxacin	CIP	1
Nitrofurantoin	Fd	64; 256

* Cotrimoxazol; [†] Angaben vom Produktdatenblatt BioRad (Art.-Nr. 934510)

3.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.2.1 PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. In den Versuchen wurden Primer der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) verwendet. Als DNA-Template diente Bakterienzellysat oder isolierte DNA (Plasmid, chromosomale DNA). Für das Zellysat wurden 100 µl einer Übernachtskultur aufgekocht (100°C, 10 min) und davon 1 µl als Template verwendet. Isolierung von Plasmid-DNA wird in Abschnitt 3.2.3 erläutert. Zur Isolierung von chromosomaler DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma QIAGEN (Düren) verwendet. Zur Amplifikation der DNA-Abschnitte wurde entweder die *Taq* DNA Polymerase der Firma ThermoScientific (Erlangen) oder der *Taq* PCR Master Mix von QIAGEN (Düren) verwendet. Reaktionsansätze und Reaktionsprogramm sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für die PCR mit *Taq* DNA Polymerase

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA	100 ng	Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
dNTPs (10 mM)	1 µl	Denaturierung	95°C	30 s	30
MgCl ₂ (25 mM)	1,25 µl	Annealing*	x°C	30 s	
5'- Primer (10 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	60 s/kb	
3'- Primer (10 pmol/ µl)	1 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1
10x <i>Taq</i> Puffer	5 µl				
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,25 µl				
dH ₂ O	ad 50 µl				

*Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur T_m gewählt. Diese Annealingtemperatur betrug im Falle der *Taq* DNA Polymerase und des *Taq* PCR Master Mixes 5°C unter der Schmelztemperatur T_m .

Tabelle 17: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für die PCR mit *Taq* PCR Master Mix

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA	100 ng	Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
2x <i>Taq</i> PCR Master Mix	25 µl	Denaturierung	94°C	30 s	30
5'- Primer (100 pmol/ µl)	1 µl	Annealing*	x°C	30 s	
3'- Primer (100 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	60 s/kb	
dH ₂ O	ad 50 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1

*Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur T_m gewählt. Diese Annealingtemperatur betrug im Falle der *Taq* DNA Polymerase und des *Taq* PCR Master Mixes 5°C unter der Schmelztemperatur T_m .

Die Schmelztemperatur kann mit Hilfe des Online Programmes `Tm Calculator` von ThermoScientific (Erlangen) berechnet werden. Alternativ werden die Schmelztemperaturen auch im Produktdatenblatt bei Lieferung der Primer durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) angegeben.

3.2.2 Herstellung von Agarosegelen

- 1 %-iges Agarosegel:

1,5 g Agarose wurden mit 150 ml TAE-Puffer gut vermischt und bis zur vollständigen Auflösung der Agarose in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurde diese homogene Mischung in eine Agarosegel-Apparatur gegossen und bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Gel wurde sofort verwendet oder zur kurzzeitigen Lagerung in Frischhaltefolie verpackt und im Kühlschrank gelagert.

- 4 %-iges Agarosegel:

Die Herstellung erfolgte wie bei dem 1 %-igen Agarosegel, mit dem Unterschied, dass 6 g Agarose anstelle von 1,5 g verwendet wurden. Um zu starken Siedeverzug zu verhindern, wurde hier ein zu langes Aufkochen vermieden.

3.2.3 Methoden zur Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung wurde die Mikrozentrifuge Biofuge Pico (Rotor: PP 1/99 #3325, Heraeus, Hanau) verwendet.

3.2.3.1 Isopropanolfällung von DNA

Zunächst wurden 2 ml Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 13000 U/min mit der Mikrozentrifuge (Biofuge Pico) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment mit 150 µl Puffer P1 (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) resuspendiert und 3 µl Lysozym (50 mg/ml) zugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wurden 300 µl Puffer P2 (Qiagen) zugefügt und durch viermaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gut durchmischt. Danach wurde die Mischung maximal 5 min bei RT inkubiert, 225 µl Puffer P3 (Qiagen) zugegeben und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, erneut für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden 472,5 µl Isopropanol (100 %) zugefügt, kurz gemischt und die Mischung für 1-2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 1 ml 70 %-igen Ethanol durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 U/min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment für etwa 5 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde das getrocknete Sediment in 50 µl dest. Wasser aufgenommen. Bei baldiger Verwendung wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4°C im Kühlschrank gelagert, zur längeren Lagerung wurde der -20°C Gefrierschrank verwendet.

3.2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Der Beginn der Aufreinigung erfolgte wie bei der Isopropanolfällung mit den Puffern P1, P2 und P3 (Qiagen). Nach der 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden allerdings hier 100 µl einer Phenol-Chloroform-Mischung (1:1) zugefügt und durch kurze Benutzung des Reagenzgefäßmischers gut durchmischt. Danach wurde 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, wodurch es zu einer Phasentrennung der zuvor hergestellten Emulsion kam. Die untere organische Phase enthielt die Proteine, die obere wässrige Phase enthielt DNA. RNA wurde bereits durch die RNase A in Puffer P1 abgebaut. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Mit 100 %-igem eiskalten Ethanol wurde dann das Reaktionsgefäß bis zur 2 ml Füllgrenze aufgefüllt. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 U/min wurde der Überstand verworfen und 1 ml 70 %-iger Ethanol zugefügt. Nun wurde 10 min bei 13000 U/min mit der Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Noch verbleibendes Ethanol wurde durch 10-minütige Trocknung bei Raumtemperatur entfernt. Das Sediment wurde in 20 µl dest. Wasser resuspendiert. Bei

baldiger Verwendung wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4°C im Kühlschrank gelagert, zur längeren Lagerung wurde der -20°C Gefrierschrank verwendet.

3.2.3.3 DNA-Isolierung mittels Qiagen-Kit

Hierbei handelt es sich um eine Variante des im QIAprep® Miniprep Handbuch erwähnten Originalprotokolls. Zuerst wurden 2 ml Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 13000 U/min mit der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment mit 250 µl Puffer P1 resuspendiert und 5 µl Lysozym (50 mg/ml) zugefügt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und durch viermaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gut durchmischt. Danach wurde die Mischung maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 350 µl Puffer N3 zugegeben und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 U/min wurde der Überstand auf eine QIAprep Säule überführt. Es wurde nun 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Puffer PB und 1 min Zentrifugation bei 13000 U/min wurde der Durchfluss verworfen. Es wurden 750 µl Puffer PE zugegeben, 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. 50 µl Puffer EB wurde zugegeben, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 13000 U/min mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Bei baldiger Verwendung wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4°C im Kühlschrank gelagert, zur längeren Lagerung wurde der -20°C Gefrierschrank verwendet.

Tabelle 18: Verwendete Puffer für die Plasmidisolierung

Puffer	Verwendung	Zusammensetzung
P1	Resuspendierungs-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2	Lysis-Puffer	200 mM NaOH, 1% SDS
P3	Neutralisations-Puffer	3 M Kaliumacetat, pH=5,5
N3	Neutralisations-Puffer	keine Angaben vorhanden
PB	Bindungs-Puffer	keine Angaben vorhanden
PE	Wasch-Puffer	keine Angaben vorhanden
EB	Elutions-Puffer	keine Angaben vorhanden

3.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli* - Zellen

3.2.4.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* - Zellen

50 ml LB-Medium wurden in einem Erlenmeyer-Kolben mit 0,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte nun eine Messung der OD₆₀₀. Nach Erreichen einer OD₆₀₀=0,6 wurde die Bakteriensuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Röhrchen für 10 min bei 4000 U/min und 4°C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Multifuge X3R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment mit 12,5 ml eiskalter steriler CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend 10 min bei 4000 U/min und 4°C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Multifuge X3R) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 1,25 ml eiskalter steriler CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und anschließend 30-60 min auf Eis inkubiert. Zu der Bakteriensuspension wurden je 0,52 ml steriles eiskaltes Glycerin (87 %) zugegeben und die Mischung zu je 100 µl aliquotiert. Die kompetenten Bakterien wurden entweder gleich verwendet, oder bei -80°C gelagert.

3.2.4.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli* - Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden zunächst 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben mit 0,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte nun eine Messung der OD₆₀₀. Nach Erreichen einer OD₆₀₀=0,6 wurde die Bakteriensuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Das Röhrchen wurde für 10 min bei 4000 U/min und 4°C in der

Kühlzentrifuge (Heraeus Multifuge X3R) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 50 ml eiskaltem, sterilem dest. Wasser resuspendiert und 10 min bei 4000 U/min und 4°C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Multifuge X3R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 25 ml eiskaltem sterilen dest. Wasser resuspendiert und 10 min bei 4000 U/min und 4°C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Multifuge X3R) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Bakteriensediment in 1 ml eiskalter steriler 10 %-iger Glycerin-Lösung resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit der Kühl-Mikrozentrifuge 5 min bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 150 µl eiskalter, steriler 10 %-iger Glycerin-Lösung resuspendiert und die Mischung zu je 75 µl aliquotiert. Die elektrokompenten Bakterien wurden entweder gleich verwendet, oder bei -80°C gelagert.

3.2.5 Transformation

3.2.5.1 Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden je 100 µl kompetente Bakterienzellen verwendet. Diese wurden direkt nach der Herstellung (3.2.4.1) oder nach Lagerung bei -80°C benutzt. Nach Lagerung bei -80°C wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden etwa 100 ng Plasmid-DNA zugegeben, vorsichtig durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde 2 min bei 42°C auf dem Heizblock erhitzt und danach mit 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Es wurde 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann für 2 min bei 5000 U/min mit der Mikrozentrifuge Biofuge Pico zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Hierbei wurden LB-Platten verwendet, die Antibiotika entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Antibiotikaresistenzen enthielten. Die auf den LB-Platten gewachsenen Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen, auf eine separate LB-Platte aufgetupft und die auf der Pipettenspitze verbleibenden Bakterien zur Herstellung eines Ansatzes zur Überprüfung der konstruierten Vektoren verwendet. Bei positivem Ergebnis konnte so die Kolonie auf der LB-Platte gleich weiterverwendet werden. Kolonien positiver Klone wurden von der separaten LB-Platte in ein Kapsenberg-Röhrchen zur Herstellung einer Übernachtskultur (3.1.1) überführt. Aus diesen Übernachtskulturen wurden später Glycerinkulturen zur Lagerung hergestellt.

3.2.5.2 Transformation durch Elektroporation

Zur Transformation durch Elektroporation wurden je 75 µl kompetente Bakterienzellen verwendet. Diese wurden gleich nach Herstellung (3.2.4.2) oder nach Lagerung bei -80°C benutzt. Nach Lagerung bei -80°C wurden diese Aliquots langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde etwa 100 ng Plasmid-DNA zugegeben, vorsichtig durchmischt und die Mischung in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurde die Küvette in das Elektroporationsgerät gegeben. Als Einstellung wurde im Transformationsprogramm für Bakterien ein Strompuls von 2,5 kV (Stufe 2) gewählt. Nach Auslösen des Strompulses wurde sofort 1 ml eisgekühltes LB-Medium zugegeben und die Mischung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und für 2 min bei 5000 U/min mit der Mikrozentrifuge Biofuge Pico zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten ausplattiert. Mit den Agarplatten wurde wie bei der Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen (3.2.5.1) verfahren.

3.2.5.3 Reinigung der Elektroporationsküvetten

Da die Elektroporationsküvetten wiederverwendet wurden, wurden diese nach Benutzung gereinigt. Hierzu wurden die Küvetten zuerst mit 70 %-igem Ethanol ausgespült und für 15 min vollständig mit 70 %-igem Ethanol überschichtet. Danach wurden die Elektroporationsküvetten dreimal mit dest. Wasser gespült und umgedreht auf einem Zellstoff-Tuch getrocknet. Nach der Trocknung erfolgte die Sterilisation der Küvetten mit der UV-Kammer. Hierzu wurde das integrierte Programm zur Sterilisation von UV-beständigem Material gewählt. Die Sterilisation wurde dreimal für 90 s durchgeführt. Die Küvetten wurden danach in sterilen, verschlossenen Glasbehältnissen aufbewahrt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Auftauen von Zelllinien

Zum Ansetzen neuer Zellkulturlinien wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und auf Eis transportiert. Anschließend wurde das Kryoröhrchen bei 37°C und 5 % Kohlendioxid (CO₂) solange inkubiert, bis sich nur noch ein kleiner gefrorener Rest in dem Röhrchen befand. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt, das

Kryoröhrchen mit 1,5 ml DMEM (+FBS) gespült und ebenfalls in die Zellkulturflasche überführt. Zu den bereits vorhandenen 3 ml Zellsuspension wurden 17 ml DMEM (+FBS) gegeben und die Zellkulturflasche nach kurzem Schütteln bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Dies war notwendig, da sich im Einfriermedium DMSO befand. Dieses wirkt als Zellgift, schädigt die Zellen und verhindert die Erkennung einer möglichen bakteriellen Kontamination der Zellen.

3.3.2 Splitten von Zelllinien

Zuerst wurde von konfluenten Zellkulturen in Zellkulturflaschen das Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 5 ml vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und 5 – 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Sobald die Zellen sich lösten, wurde die Trypsin-EDTA-Mischung abgenommen und verworfen. Mit 5 ml auf 37°C vorgewärmten DMEM (+FBS) wurden die Zellen durch wiederholtes Einsaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit mit der Pipette von der Flaschenwand gelöst. Die Zellsuspension wurde kräftig durchmischt und je 1 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt. Dazu wurden 19 ml auf 37°C vorgewärmtes DMEM (+FBS) gegeben und die Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ bis zum nächsten Splitten oder der Verwendung in Versuchen inkubiert.

3.3.3 Einfrieren von Zelllinien

Zum Einfrieren wurden Zelllinien in der stationären Wachstumsphase verwendet. Zum Wegfrieren von 3 ml Zellsuspension wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturflasche verwendet. Wie beim Splitten von Zelllinien wurde das Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 5 ml vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und 5 – 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Sobald die Zellen sich lösten, wurde das Trypsin-EDTA abgenommen und verworfen. Mit 3 ml 4°C kaltem Einfriermedium wurden die Zellen durch wiederholtes Resuspendieren der Flüssigkeit mit der Pipette von der Flaschenwand gelöst. Die Zellsuspension wurde auf zwei Kryoröhrchen verteilt und diese in einem Styro-Rack auf Eis gestellt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in das Kryoeinfriergerät (Mr. Frosty) überführt und dieses über Nacht bei -80°C inkubiert. Durch das Kryoeinfriergerät wurde ein langsames und für die Zellen schonendes Abkühlen von etwa 1°C / min ermöglicht. Am nächsten Tag erfolgte dann die Überführung zur Endlagerung in flüssigen Stickstoff.

3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Runde Deckgläser (12 mm) wurden in einer 24-Kavitäten-Platte mit Poly-L Lysin Lösung (0,1 % in H₂O) über Nacht bei RT beschichtet. Nach Absaugen der Lösung wurde 1 ml Zellsuspension (Caco-2: 4.0 x 10⁵ Zellen/ml; siehe 3.5) in jede Kavität gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Epithelzellen mit 2 % Glutaraldehyd für 15 min bei RT fixiert. Im Anschluss wurde die Lösung abgesaugt und 1 ml einer 2 h Bakterieneinzelkultur (~1,5 x 10⁷ KBE/ml, siehe 3.5) in DMEM-Medium zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37°C und 0 % CO₂ wurden die nicht-adhärierenden Bakterien abgenommen und 1 ml Glutaraldehyd (6,25 %) zugegeben. Nach Fixierung über Nacht wurden die Deckgläser in neue 24-Kavitäten-Platten mit Sörensenpuffer überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Deckgläser nicht austrockneten. Die vorbereiteten 24-Kavitäten-Platten mit Deckgläsern wurden anschließend an die technischen Assistentinnen der Abteilung für Elektronenmikroskopie zur Trocknung und Bedampfung abgegeben. Die Assistentinnen entfernten das Wasser durch eine Aceton-Entwässerungsreihe (siehe Tabelle 24) und führten im Anschluss eine Kritische-Punkt-Trocknung mit dem „Critical-point-dryer CPD 030“ (BAL-TEC) durch. Die abschließende Bedampfung der Proben erfolgte mit Gold/Palladium.

Tabelle 19: Verwendeter Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (100 mM)

Bestandteil	Menge
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
ddH ₂ O	100 ml

Tabelle 20: Verwendeter Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (100 mM)

Bestandteil	Menge
KH ₂ PO ₄	1,36 g
ddH ₂ O	100 ml

Tabelle 21: Verwendeter Sörensenpuffer (100 mM, pH 7.4)

Bestandteil	Menge
Na ₂ HPO ₄ (100 mM)	12,2 ml
KH ₂ PO ₄ (100 mM)	81,8 ml

Tabelle 22: Verwendete 2 %-ige Glutaraldehydlösung

Bestandteil	Menge
50 % Glutaraldehyd	4 ml
1 x PBS	96 ml

Tabelle 23: Verwendete 6,25 %-ige Glutaraldehydlösung

Bestandteil	Menge
50 % Glutaraldehyd	12,5 ml
Sörensenpuffer (100 mM)	87,5 ml

Tabelle 24: Entwässerungsreihe der REM Proben

Lösung	Dauer	Vorgang
Sörensenpuffer	5 x 5 min	Waschschritt
Aceton 30 %	15 min	Entwässerung
Aceton 50 %	20 min	
Aceton 75 %	30 min	
Aceton 90 %	45 min	
Aceton 100 %	5 x 30 min	
	Aufbewahrung	

3.5 Adhäsionsassay und Wachstumskontrolle der Bakterienstämme

Zur Durchführung der Adhäsionsassays wurden die humanen Darmepithelzelllinien Caco2 und LS174T verwendet. Zuerst wurde von konfluenten Kulturen in Zellkulturflaschen das Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 5 ml vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und 3 - 8 min (Caco-2: 8 min; LS-174T: 3 min) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde abgenommen und verworfen. Mit 5 ml auf 37°C vorgewärmten DMEM Zellkulturmedium wurden die Zellen durch wiederholtes Resuspendieren der Flüssigkeit mit der Pipette von der Flaschenwand gelöst. Die Zellsuspension wurde kräftig durchmischt und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. 100 µl der Zellsuspension und 100 µl Trypanblaulösung wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt, ein Aliquot davon in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl pro ml Suspension bestimmt. Die Zellsuspension wurde verdünnt (Caco-2: 4,0 x 10⁵ Zellen/ml; LS-174T: 1,0 x 10⁶ Zellen/ml) und davon 1 ml / Kavität in 24-Kavitäten-Platten

ausgesät. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz (Caco-2: $6,0 \times 10^5$ Zellen/Kavität; LS-174T: $1,4 \times 10^6$ Zellen/Kavität) für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Das Zellkulturmedium wurde 30 min vor Versuchsbeginn durch frisches Medium ersetzt. Um ein Endvolumen von 1 ml zu erhalten, wurde darauf geachtet, das Volumen des frischen Mediums dem Volumen der Bakteriensuspension anzupassen. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden Übernachtskulturen der Bakterienstämme in LB-Medium zum Animpfen von 2 h-Kulturen in DMEM-Medium (ca. 200 µl ÜNK / 5 ml Medium) verwendet. Die 2 h-Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Einzelkulturen mit EcN / SK22D oder pathogenen *E. coli* und Co-Kulturen im Verhältnis 1:1 und 10:1 (EcN:pEc) wurden verwendet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze des Adhäsionsassays wird in Tabelle 25 veranschaulicht. Zur Überprüfung der Bakterienzahlen wurden die einzelnen Ansätze verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Ansätze des Adhäsionsassays

Ansatz*	Bakterienzahl [KBE/ml]	Infektionsvolumen	Volumen Medium	Endvolumen
(¹) Einzelkultur EcN	$1,5 \times 10^7$ EcN	25 µl EcN	975 µl	1000 µl
(²) Einzelkultur pEc	$1,5 \times 10^7$ pEc	25 µl pEc	975 µl	1000 µl
(³) Co-Kultur 1:1 (EcN:pEc)	$1,5 \times 10^7$ EcN + $1,5 \times 10^7$ pEc	25 µl EcN + 25 µl pEc	950 µl	1000 µl
(⁴) Co-Kultur 10:1 (EcN:pEc)	$1,5 \times 10^8$ EcN + $1,5 \times 10^7$ pEc	250 µl EcN + 25 µl pEc	725 µl	1000 µl
(⁵) Co-Kultur 10:1 (EcN:pEc)	$1,5 \times 10^7$ EcN + $1,5 \times 10^6$ pEc	25 µl EcN + 2,5 µl pEc	972,5 µl	1000 µl
(⁶) Einzelkultur pEc	$1,5 \times 10^6$ pEc	2,5 µl pEc	997,5 µl	1000 µl

* Ansätze 1-6 werden zur einfacheren Unterscheidung in Abbildungen und Auswertung mit (¹⁻⁶) gekennzeichnet

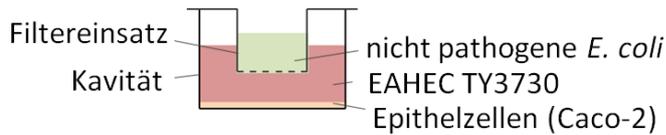
Die 24-Kavitäten-Platten mit Epithelzellen und Bakterien wurden für 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Bestimmung der adhärenen Bakterien wurde der Überstand mit den nicht-adhärenen Bakterien entfernt und für die Wachstumsanalyse weiterverwendet. Die 24-Kavitäten-Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA (1:250; 37°C) überschichtet und für 15 min auf dem Schütteltisch bei 1000 rpm und RT geschüttelt. Die Suspension mit lysierten Epithelzellen und intakten Bakterien wurde anschließend gut durchmischt, verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert.

Zur Überprüfung des Wachstums der Bakterienstämme wurde die Bakterienzahl in den Einzel- und Co-Kulturen zu den Zeitpunkten 2, 5 und 24 h bestimmt. Das eingesetzte Inokulum zum Zeitpunkt 0 h bildete die Basis der Wachstumskurve. Zur Bestimmung der Anzahl der Bakterien wurde der beim Zeitpunkt $t = 2$ h entfernte Überstand (nicht-adhärenente Bakterien) entsprechend verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert. Der verbliebene Überstand wurde in neue 24-Kavitäten-Platten überführt und für weitere 22 h bei 37°C und 0 % CO₂ inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 5$ h und $t = 24$ h wurde der Überstand abgenommen, gut durchmischt, verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert.

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde die Bakteriensuspension zuerst mit Saline (0,9 %) in Schritten von 1:10 oder 1:100 verdünnt und 100 µl auf Agarplatten ausplattiert. Zur Unterscheidung der einzelnen Bakterienstämme in Co-Kulturen wurden selektive Antibiotikaplatten verwendet. EHEC O104:H4 (TY3730, TY3456) wies eine Resistenz gegen Ampicillin (50 µg/ml) und EAEC O104:H4 (55989) gegen Doxycyclin (6 µg/ml) auf. Bei EHEC O157:H7 (EDL933) machte man sich die unterschiedliche Farbe auf ECC Agarplatten zunutze. Im Gegensatz zu EcN oder SK22D, deren Kolonien einen dunkelblau-lila Farbton aufwiesen, waren Kolonien von EHEC O157:H7 (EDL933) rosa gefärbt. Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C und 0 % CO₂ inkubiert und anschließend wurde die Anzahl an KBE pro Platte bestimmt. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren wurde aus zwei Agarplatten die durchschnittliche Anzahl an KBE/ml (KBE/Kavität) bestimmt. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen jeweils eine Vierfachbestimmung der adhärenente Bakterien und eine Doppelbestimmung der nicht adhärenente Bakterien durchgeführt wurden.

3.6 Untersuchung der Adhäsion von EAHEC TY3730 im Trans-Well System

Zur Untersuchung der Adhäsion von EAHEC TY3730 im Trans-Well System wurden Zellkultureinsätze (24 Well ThinCert; 0,4 µm) verwendet. Die Vorbereitung des Versuches erfolgte gemäß dem Standard Adhäsionsassay (siehe 3.5). Das Zellkulturmedium wurde 30 min vor Versuchsbeginn durch 725 µl frisches Medium ersetzt. 25 µl der 2h-Kultur von EAHEC TY3730 wurden zu Versuchsbeginn in der Kavität gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde der Filtereinsatz eingesetzt und 250 µl der nicht pathogenen *E. coli* Stämme in den Filtereinsatz pipettiert. Die 24-Kavitäten-Platten mit Epithelzellen und Bakterien wurden für 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.



modifiziert nach (Stelzner, 2013)

Abbildung 14: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Einflusses von nicht pathogenen *E. coli* Stämmen auf die Adhäsion von EAHEC TY3730 an Caco-2 Epithelzellen nach räumlicher Trennung durch Filtereinsätze.

Zur Bestimmung der adhärenten Bakterien wurde der Überstand mit den nicht-adhärenten Bakterien entfernt, die 24-Kavitäten-Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA (1:250; 37°C) überschichtet und für 15 min auf dem Schütteltisch bei 1000 rpm und RT geschüttelt. Die Suspension mit lysierten Epithelzellen und intakten Bakterien wurde anschließend gut durchmischt, verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert.

3.7 Quantifizierung der Shiga-Toxin-Produktion

3.7.1 Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden Übernachtskulturen der Bakterienstämme in LB-Medium zum Animpfen von 2 h-Kulturen in DMEM-Medium, LB-Medium oder SCEM-Medium (ca. 200 μ l ÜNK / 5 ml Medium) verwendet. Die 2 h-Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Einzelkulturen mit nicht pathogenen *E. coli* (npEc = EcN/SK22D/MG1655) oder pathogenen *E. coli* und Co-Kulturen im Verhältnis 1:1 und 10:1 (npEc:pEc) wurden verwendet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze zur Quantifizierung der Toxin-Produktion sind identisch mit den Ansätzen des Adhäsionsassays (Ansatz 1-4), welche in Tabelle 26 veranschaulicht sind. Das jeweilige Medium wurde in 24-Kavitäten-Platten vorgelegt und war bei Zugabe der Bakterien bereits auf 37°C vorgewärmt. Für jeden Ansatz wurden jeweils vier Kavitäten mit den Einzel- bzw. Co-Kulturen beimpft.

Tabelle 26: Zusammensetzung der Ansätze zur Quantifizierung der Toxinproduktion

Ansatz	Bakterienzahl [KBE/ml]	Infektionsvolumen	Volumen Medium	Endvolumen
(¹) Einzelkultur npEc	1,5 x 10 ⁷ npEc	25 µl npEc	975 µl	1000 µl
(²) Einzelkultur pEc	1,5 x 10 ⁷ pEc	25 µl pEc	975 µl	1000 µl
(³) Co-Kultur 1:1 (npEc:pEc)	1,5 x 10 ⁷ npEc + 1,5 x 10 ⁷ pEc	25 µl npEc + 25 µl pEc	950 µl	1000 µl
(⁴) Co-Kultur 10:1 (npEc:pEc)	1,5 x 10 ⁸ npEc + 1,5 x 10 ⁷ pEc	250 µl npEc + 25 µl pEc	725 µl	1000 µl

* Ansätze 1-4 werden zur einfacheren Unterscheidung in Abbildungen und Auswertung mit (¹⁻⁴) gekennzeichnet

Die 24-Kavitäten-Platten mit den Bakterien wurden für 24 h bei 37°C und 0 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die 24-Kavitäten-Platten auf einem Schütteltisch (1000 rpm) für 5 min geschüttelt und die vier Bakteriensuspensionen der jeweiligen Ansätze in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach einer guten Durchmischung mit dem Vortex Power Mix wurden die Proben sterilfiltriert (0,22 µm, low protein binding) und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

3.7.2 Verotoxin ELISA

Zur Quantifizierung der Shiga Toxin Produktion von EHECs wurde der RIDASCREEN[®] Verotoxin ELISA von r-biopharm verwendet. Im Kit enthalten sind Mikrotiterplatte, Probenpuffer, Waschpuffer (10x), Positivkontrolle, Konjugat, Substrat und Stopp-Reagenz. Laut Herstellerangabe (persönliche Kommunikation) detektieren die verwendeten Antikörper auf der Mikrotiterplatte und im Konjugat im Falle von Stx1 ein Konformationsepitop des Holoproteins. Im Falle von Stx2 bindet der monoklonale Antikörper auf der Mikrotiterplatte die A-Untereinheit des Toxins und der monoklonale Antikörper im Konjugat die B-Untereinheit des Toxins.

Tabelle 27: Packungsinhalt eines RIDASCREEN® Verotoxin ELISA Kits*

Packungsinhalt	Menge	Beschreibung
Mikrotiterplatte	1 x 96 Kavitäten	Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen Verotoxin 1 und 2
Probenpuffer	100 ml	Protein-gepufferte NaCl-Lösung (nicht verwendet)
Waschpuffer	100 ml	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10x); enthält 0,1 % Thimerosal
Positivkontrolle	1,8 ml	Inaktivierte Verotoxine
Konjugat	10 ml	Peroxidase-konjugierte monoklonale Antikörper gegen Verotoxin 1 und 2 in stabilisierter Proteinlösung; grün gefärbt
Substrat	10 ml	Harnstoffperoxid/TMB
Stopp-Reagenz	6 ml	1 N Schwefelsäure

* Herstellerangabe nach www.r-biopharm.com

Zu Beginn wurden die einzelnen Proben, als auch Mikrotiterplatte und Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und eine 1:10 Verdünnung in H₂O des mitgelieferten Waschpuffers erstellt. Je drei Kavitäten wurden mit 100 µl der mitgelieferten Positivkontrolle, Negativkontrolle (Medium) und den Proben befüllt. Die Mikrotiterplatte wurde für 60 min bei RT inkubiert und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Konjugates hinzugefügt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl des Substrates zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden 50 µl Stopp-Reagenz hinzugefügt und gleich im Anschluss eine photometrische Messung bei 450 nm am ELISA Messgerät (Messmodus: stepping, Messtyp: Single) durchgeführt. Jede Mikrotiterplatte wurde in kurzen Abständen dreimal gemessen und daraus der Mittelwert gebildet, um Messungenauigkeiten auszugleichen.

3.7.3 Einfluss von EcN auf die Sekretion von Shiga-Toxin

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde das bei 3.7.1. erwähnte Protokoll verwendet. Zur Trennung von Bakteriensediment und Überstand erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm (Allegra X-22R; Rotor: C1015) für 10 min. Das Bakteriensediment wurde in der entsprechenden Menge PBS mit 0,5 mg/ml Polymyxin aufgenommen. Der Überstand wurde in ein separates 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und Polymyxin zugegeben (Endkonzentration: 0,5 mg/ml). Überstand und Bakteriensediment wurden bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach einer guten Durchmischung mit dem Vortex Power Mix wurden die Proben

sterilfiltriert (0,22 µm, low protein binding) und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert. Zur Quantifizierung der Shiga Toxin Produktion von EHECs wurde der RIDASCREEN® Verotoxin ELISA von r-biopharm verwendet (siehe 3.7.2).

3.7.4 Bestimmung der Shiga-Toxin Expression durch Verwendung von biolumineszenten Reporter Stämmen

3.7.4.1 Das C-P Reporter System

Das C-P Reporter System (Chromosom-Plasmid) macht sich die *Photobacterium luminescens luxCDABE* Gene zunutze, um die Expression von Shiga-Toxin 1 (Stx1) und Shiga-Toxin 2 (Stx2) in Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Echtzeit zu untersuchen. Die *luxCDABE* Gene wurden hierzu in eine Kasette mit *luxCDAB* und das *luxE* Gen aufgeteilt. Das *luxE* Gen, welches keinen Promotor besitzt, wurde im EHEC Chromosom hinter den Genen der Shiga-Toxine eingebaut. Die *luxCDAB*-Kasette wurde auf einem `Multicopy`-Plasmid mit Ampicillin-Resistenz exprimiert. Dies ermöglichte es, eine direkte Abhängigkeit zwischen Biolumineszenz und der Promotor-Aktivität der Shiga-Toxine herzustellen. Das Niveau der Biolumineszenz war identisch mit dem Niveau der Stx1 und Stx2 Produktion in den Stx1 und Stx2 Expressions-Stämmen (Shimizu et al., 2011). Des Weiteren war die Produktion der Shiga-Toxine auf demselben Niveau wie bei deren Elternstämmen (Shimizu et al., 2011). Der Stammhintergrund der verwendeten Systeme ist jeweils EHEC O157:H7 EDL933.

Das Biolumineszenz Chromosom-Plasmid Hybrid Reporter System (C-P Reporter System) war ein großzügiges Geschenk von Takeshi Shimizu (Chiba, Japan).

Die Zusammensetzung der Gene der einzelnen Expressionsstämmen werden in Abbildung 17 dargestellt. Abbildung 16 zeigt die zur Verfügung gestellten Plasmide für das C-P System. In den Versuchen wurden hauptsächlich die in Abbildung 15 dargestellten C-P Reporter Systeme verwendet. Hierbei werden die C-P Reporter Systeme in ein Stx1 Expressions System [E1-E2S (pluxCDAB3)] (E1) und ein Stx2 Expressions System [E(SR)2-E1S(pluxCDAB3)] (E2) unterteilt. Zur Vereinfachung werden diese Systeme als Expressionssystem für Stx1 (E1) und Expressionssystem für Stx2 (E2) abgekürzt.

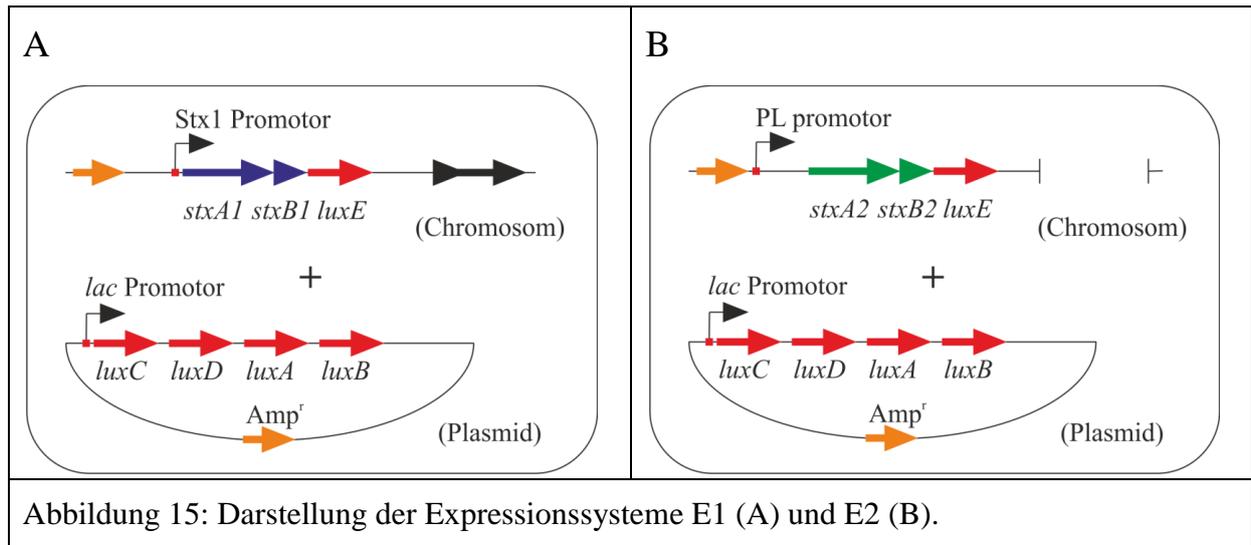


Abbildung 15: Darstellung der Expressionssysteme E1 (A) und E2 (B).

Um die Plasmide in den Bakterien zu stabilisieren, wurde in allen verwendeten Medien Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet. Die nicht pathogenen *E. coli* Stämme (EcN, SK22D, MG1655) wurden durch Transformation mit dem Plasmid pGEM-T1 ebenfalls in Gegenwart von Ampicillin (50 µg/ml) kultiviert. Bei pGEM-T1 handelt es sich um die zirkuläre Version des pGEM-T Easy Vektors (Amp^R, Promega).

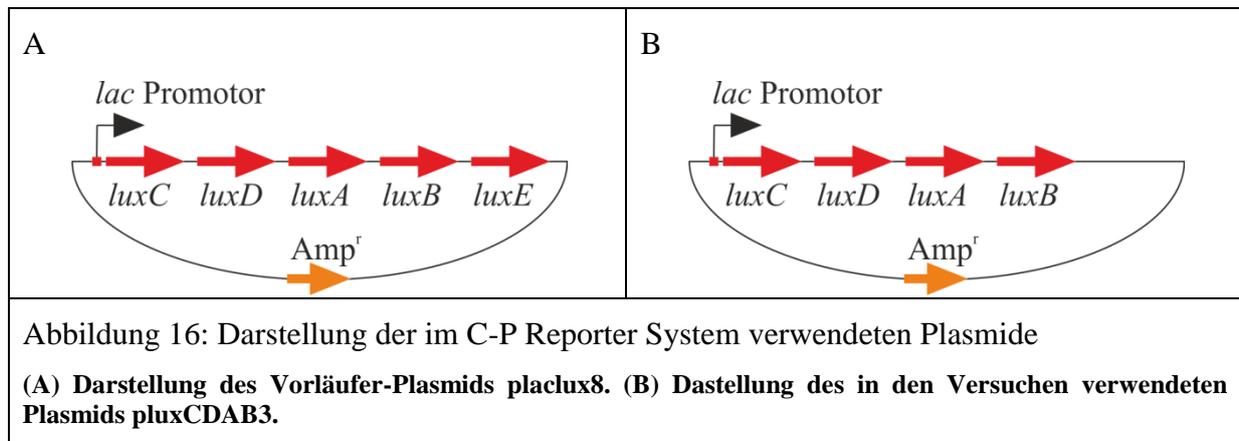
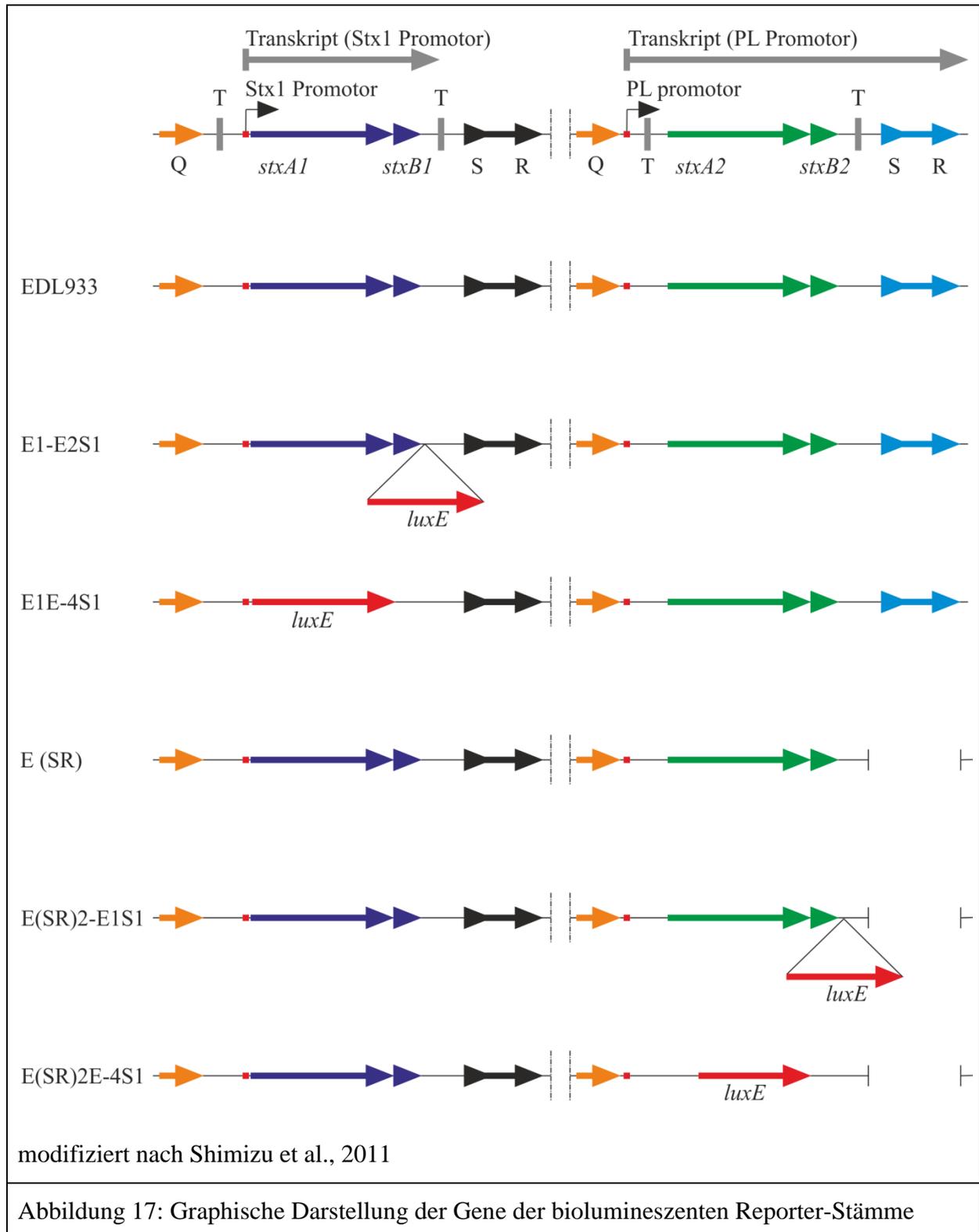


Abbildung 16: Darstellung der im C-P Reporter System verwendeten Plasmide

(A) Darstellung des Vorläufer-Plasmids *placlux8*. (B) Darstellung des in den Versuchen verwendeten Plasmids *pluxCDAB3*.



3.7.4.2 Versuchsdurchführung mit C-P Reporter Systemen

Die Biolumineszenz Versuche wurden mit den Mikrotiterplatten 'CulturePlate™-96' von PerkinElmer am Gerät Victor X Light (PerkinElmer) durchgeführt. Die Messungen erfolgten jeweils bei 37°C.

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden Übernachtkulturen der Bakterienstämme in LB-Medium (+Amp 50 µg/ml) zum Animpfen von 2 h-Kulturen in DMEM-Medium (+Amp 50 µg/ml) (ca. 200 µl ÜNK / 5 ml Medium) verwendet. Die 2 h-Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Einzelkulturen mit nicht pathogenen *E. coli* (npEc = EcN/SK22D/MG1655) oder pathogenen *E. coli* und Co-Kulturen im Verhältnis 1:1 und 10:1 (npEc:pEc) wurden verwendet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze sind identisch mit den Ansätzen des Adhäsionsassays (Ansatz 1-4) und zur Quantifizierung der Stx Produktion. Diese werden in Tabelle 26 veranschaulicht. Die Versuche wurden in 96-Kavitäten-Platten mit je 100 µl der Ansätze (¹⁻⁴) durchgeführt.

Tabelle 28: Einstellungen am VictorXLight zur Biolumineszenzmessung in Englisch*

Faktor	Einstellung auf:
Temperature:	37°C
Plate:	Generic 8x12 size plate
Measurement height:	Standard – 8 mm
Delay:	60 s
Measurement time:	1 s
Emission aperture:	Normal
Emission filter:	No filter: slot a7

* Programm von VictorX ist in englischer Sprache und wird daher auch so aufgeführt

Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 0 % CO₂. Messungen wurden alle 30 min in den ersten 12 Stunden durchgeführt, danach alle 2 Stunden. Zur Messung wurden die 96-Kavitäten-Platten aus dem Brutschrank genommen, der Deckel entfernt und in VictorXLight gestellt. Da das Licht in der Zeit des Standortwechsels ausreicht, um bereits ein Hintergrundsignal zu erzeugen, ruhten die Platten vor der Messung für 60 s im Gerät (Delay-Einstellung). Nach Messung wurden die 96-Kavitäten-Platten weiter bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.8 Versuche mit Shiga Toxin Phagen

3.8.1 Phagenaufreinigung durch CsCl Ultrazentrifugation

Hochrein aufgereinigte Phagen wurden für EM-Aufnahmen (siehe 3.8.3), zur Bestimmung der `PFU`/ml (siehe 3.8.2) und für die Messung der K⁺ Konzentration (siehe 3.8.5) verwendet.

Hierzu wurden zunächst 10 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium mit CaCl_2 (10 mM) angesetzt. Mit dieser ÜNK wurde 1 l LB-Medium mit CaCl_2 (10 mM) angeimpft und für ca. 2,5 h unter Schütteln bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 1-1,5 inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Mitomycin C (1 mg/ml) zugegeben, um die Phagenbildung zu induzieren und weitere 5 h unter Schütteln bei 37°C und Lichtabschluss (Hemmung der Photo-Reaktivierung) inkubiert. Die Phagenbildung und damit einhergehende Lyse der Bakterien führte zu einem Absinken der optischen Dichte und zur Klumpenbildung im Medium. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde anschließend bei 4000 U/min und 4°C für 15 min abzentrifugiert (Heraeus Multifuge X1R) und der Überstand in 250 ml Bechgläser überführt. Die Phagensuspension wurde danach bei 7.000 g und 4°C für 18 h (Sorvall GSA) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Phagenpräzipitat für mindestens 5 h bei 4°C in je 10 ml SM-Puffer aufgeweicht. Das Phagenpräzipitat wurde anschließend im SM-Puffer resuspendiert, in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 12.000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, das Volumen bestimmt und 0,75 g CsCl_2 pro ml Phagensuspension langsam untergemischt. Mit dieser Mischung wurden Ultrazentrifugenröhrchen befüllt und für 24 h bei 45.000 U/min (Beckman 70 Ti Rotor) und 4°C zentrifugiert. Eine komplette Füllung der Zentrifugenröhrchen wurde mit SM-Puffer + CsCl_2 (0,75 g/ml) erreicht. Nach Zentrifugation bildeten die Phagen eine gräuliche Bande im unteren Drittel des Röhrchens. Diese wurde mit einer Spritze (20 G) abgenommen und in eine Dialyse-Schlauchmembran (MWCO: 6-8.000) überführt. Dialyse wurde über Nacht bei 4°C in 1 l SM-Medium mit 1 M NaCl durchgeführt. Anschließend wurde zweimal mit 1 l SM-Medium für 2-3 h bei 4°C dialysiert, die Phagensuspension abgenommen, sterilfiltriert (0,22 μm , low protein binding) und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.8.2 Phagen-Plaque-Assay

Zur Quantifizierung der infektiösen Phagen wurden die Phagensuspensionen (siehe 3.8.1) in Schritten von 1:10 mit SM-Medium verdünnt. Übernachtskulturen der getesteten Bakterienstämme wurden in LB-Medium mit 10 mM CaCl_2 bei 37°C angezogen. 100 μl der ÜNK und 100 μl der jeweiligen Verdünnung der Phagensuspensionen wurden 20 min bei 37°C als Standkultur inkubiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Softagar zugegeben (handwarm, ca. $40\text{-}50^\circ\text{C}$), durch schwenken durchmischt, das Gemisch auf LB-Agarplatten gegossen und gleichmäßig verteilt. Alternativ wurden 10 μl der verdünnten Phagensuspensionen auf die mit 3 ml LB-Softagar (enthält die Indikatorbakterien)

beschichtete LB-Agarplatte aufgetropft. Die Platten wurden bei 37°C für 24 – 48 h inkubiert und anschließend die Anzahl der Phagen-Plaques ausgewertet.

3.8.3 Transmissionselektronenmikroskopie

5 µl der sterilfiltrierten Phagensuspensionen (siehe 3.8) wurden auf ein beschichtetes Kupfernetzchen gegeben, für 1 min bei RT inkubiert und die Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. 5 µl Uranylacetat (2 % in H₂O) wurden auf das Netzchen gegeben, für 45 s bei RT inkubiert und anschließend mit einem Filterpapier abgesaugt. Das getrocknete Netzchen wurde bis zur Mikroskopie in einer Aufbewahrungsbox bei RT gelagert.

3.8.4 Stx-ELISA zur Überprüfung der Stx-Produktion infizierter Bakterienstämme

Übernachtskulturen der getesteten Bakterienstämme wurden in LB-Medium mit 10 mM CaCl₂ bei 37°C angezogen. 100 µl der ÜNK und 100 µl der jeweiligen Phagensuspensionen wurden 20 min bei 37°C als Standkultur inkubiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Medium zugegeben und die Bakterien-Phagen-Suspension für 24 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer guten Durchmischung mit dem Vortex Power Mix wurden die Proben sterilfiltriert (0,22 µm, low protein binding) und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert. Zur Quantifizierung der Shiga Toxin Produktion wurde der RIDASCREEN® Verotoxin ELISA von r-biopharm verwendet (siehe 3.7.2).

3.8.5 Messung der K⁺ - Konzentration

Übernachtskulturen der Bakterienstämme wurden in LB-Medium mit Maltose (0,2 %) angezogen. Die ÜNK wurden genutzt, um 100 ml LB-Medium (+ 0,2 % Maltose) anzupflanzen und anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bei 37°C und Schütteln zu inkubieren. Die Bakterienkulturen wurden bei 4000 rpm (Multifuge® 1 L – R, Sorvall 75002000, Heraeus) für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde zweimal mit je 100 ml Saline (0,9 %) gewaschen und anschließend in 100 ml Saline (0,9 %) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in je 5 ml Aliquots aufgeteilt und bei 37°C für 10 min inkubiert.

Die Messung der Kaliumkonzentration wurde bei 37°C mit einer Orion Ionplus Kalium Elektrode (Thermo Scientific) durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde jeweils eine Eichung

des Gerätes mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen (K^+ in H_2O) durchgeführt ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/l; $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l; $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l; $5,0 \times 10^{-4}$ mol/l; $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l). Zu Beginn der Messungen wurde für 15 min ein Basiswert der Kaliumkonzentration ermittelt. Nach Zugabe von 150 μ l Phagenkonzentrat (siehe 3.8.1) oder 150 μ l SM-Medium (Kontrolle) wurde die Kaliumkonzentration für 20 min gemessen (Messintervall: 30 s). Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt.

3.9 Statistische Auswertung

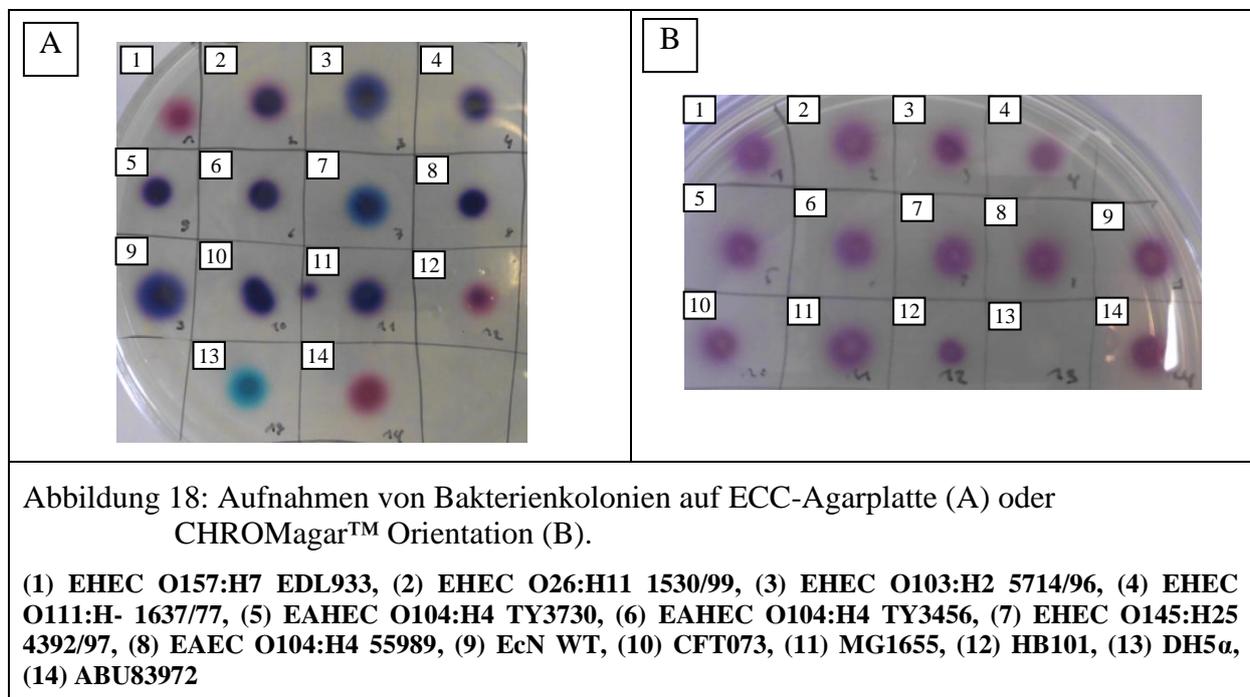
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5. Zur Bestimmung der Signifikanz von Daten wurde der t-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Differenzierung von Bakterienstämmen

4.1.1 Überprüfung der Bakterienstämme auf Reinheit

Zur Reinheitskontrolle wurden die Bakterienstämme regelmäßig auf ECC-Agarplatten oder CHROMagar™ Orientation Agarplatten ausplattiert. Durch die enzymatische Aktivität der Bakterien (z.B. β -Galactosidase) wird ein Komplex aus Chromophor und Substrat, welcher in den Agarplatten vorhanden ist, gespalten. Das Chromophor wird freigesetzt und führt dadurch zu einer Färbung der Bakterienkolonie. Durch unterschiedliche metabolische Aktivität erhalten verschiedene Bakterienstämme andere Farben und sind somit leicht mit dem bloßen Auge unterscheidbar. Eine Kontamination durch fremde Bakterien kann hier selbst bei einer niedrigen Konzentration der kontaminierenden Bakterien festgestellt werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings wie bereits erwähnt ein abweichender Zuckerstoffwechsel. Die Kolonie von DH5 α war hierbei auf der CHROMagar™ Orientation – Platte farblos, wodurch sie in Abbildung 18 B schlecht erkennbar ist.



4.1.2 Überprüfung der Identität von EAHEC O104:H4

Um die Identität der verwendeten klinischen Isolate von EAHEC O104:H4 zu bestätigen, wurden die Stämme mittels PCR-Reaktion überprüft (Bielaszewska et al., 2011).

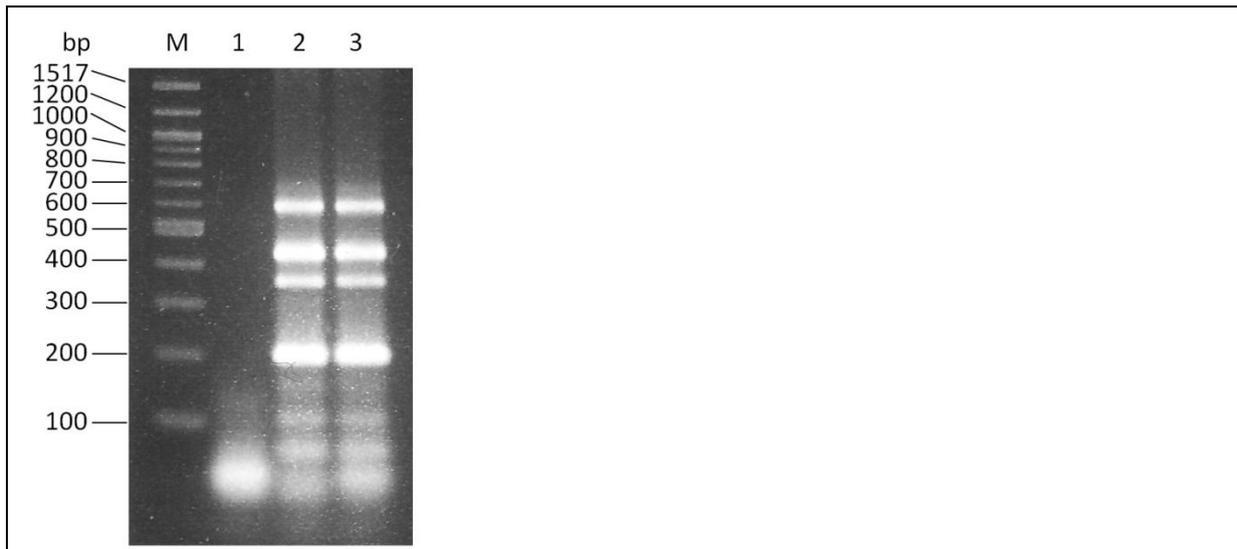


Abbildung 19: PCR-Screen zum Nachweis der Identität von EAHEC O104:H4

Durchgeführt wurde eine PCR mit den Primern O104rfbO, fliCH4, LP43/44 und TerD1/D2. M: 100 bp DNA-Leiter (NEB); Spur 1: Negativkontrolle (dH₂O), Spur 2: EAHEC O104:H4 TY3730, Spur 3: EAHEC O104:H4 TY3456.

Tabelle 29: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von EAHEC.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
Template	1 µl	Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
2x Taq PCR Master Mix	12,5 µl	Denaturierung	94°C	30 s	30
O104rfbO-f (10 pmol/ µl)	1 µl	Annealing	55°C	60 s	
O104rfbO-r (10 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	60 s	
fliCH4-a (10 pmol/ µl)	1 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1
fliCH4-b (10 pmol/ µl)	1 µl	Primer-Sequenzen werden in Tabelle 9 aufgeführt.			
LP43 (10 pmol/ µl)	1 µl				
LP44 (10 pmol/ µl)	1 µl				
TerD1 (10 pmol/ µl)	1 µl				
TerD2 (10 pmol/ µl)	1 µl				
dH ₂ O	ad 25 µl				

Die erwartete Größe der amplifizierten PCR-Produkte lag bei 201 bp (fliCH4), 351 bp (O104rfbO), 584 bp (LP43/44) und 434 bp (TerD1/TerD2), was den Banden im Agarosegel entspricht (Abbildung 19).

Die Identität der EAHEC O104:H4 Isolate konnte somit erfolgreich bestätigt werden.

4.1.3 Überprüfung der Stämme auf EcN-Identität mittels PCR

Um die EcN-Identität der verwendeten Stämme zu bestätigen, oder Verunreinigungen durch EcN ausschließen zu können, wurden die Stämme mittels PCR-Reaktion überprüft. Diese Überprüfungen wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

Tabelle 30: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von EcN.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
Template	1 µl	Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
2x Taq PCR Master Mix	12,5 µl	Denaturierung	94°C	45 s	30
Muta5 (10 pmol/ µl)	1 µl	Annealing	60°C	45 s	
Muta6 (10 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	45 s	
Muta7 (10 pmol/ µl)	1 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1
Muta8 (10 pmol/ µl)	1 µl	Primer-Sequenzen werden in Tabelle 9 aufgeführt.			
Muta9 (10 pmol/ µl)	1 µl				
Muta10 (10 pmol/ µl)	1 µl				
dH ₂ O	ad 25 µl				

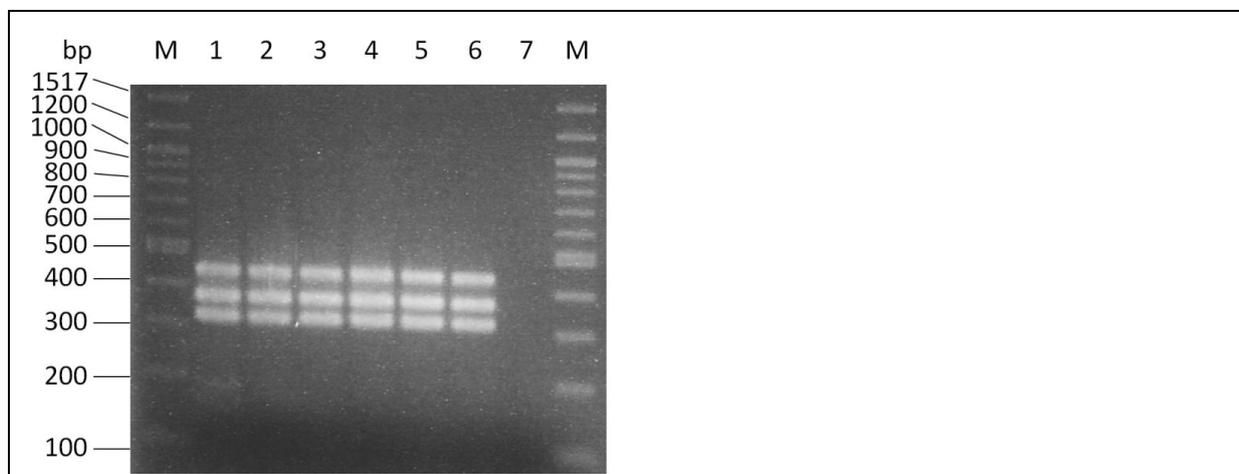


Abbildung 20: PCR-Screen zum Nachweis der Plasmide pMUT1 und pMUT2

Durchgeführt wurde eine PCR mit den Primern Muta5-10. Bestätigung der Identität von EcN in den Phagen-Versuchen (siehe 4.7). M: 100 bp DNA-Leiter (NEB); Spur 1: EcN im Versuch mit EHEC O157:H7 EDL933 Phagenisolat, Spur 2: EcN im Versuch mit EHEC O26:H11 1530/99 Phagenisolat, Spur 3: EcN im Versuch mit EHEC O103:H2 5714/96 Phagenisolat, Spur 4: EcN im Versuch mit EHEC O111:H- Phagenisolat, Spur 5: EcN im Versuch mit EAHEC O104:H4 TY3456 Phagenisolat, Spur 6: EcN im Versuch mit EHEC O145:H25 4392/97 Phagenisolat, Spur 7: Negativkontrolle (dH₂O)

Die erwartete Größe der amplifizierten PCR-Produkte lag bei 361 bp (Muta5/6), 427 bp (Muta7/8) und 313 bp (Muta9/10), was den Banden im Agarosegel entsprach (Abbildung 20).

4.1.4 Überprüfung der Deletion von AI-2 bei EcN::*luxS*

Zur Bestätigung der Deletion von AI-2 wurde der Stamm EcN::*luxS* mittels PCR überprüft (Jacobi et al., 2012). Durch ein Intron ist der betroffene Genabschnitt bei EcN::*luxS* größer als der entsprechende Genabschnitt bei EcN.

Tabelle 31: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für die Überprüfung von EcN::*luxS*.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
Template	1 µl	Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
2x <i>Taq</i> PCR Master Mix	12,5 µl	Denaturierung	94°C	60 s	30
<i>luxS</i> fw (10 pmol/ µl)	1 µl	Annealing	58°C	60 s	
<i>luxS</i> rev (10 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	120 s	
dH ₂ O	ad 25 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1
Primer-Sequenzen werden in Tabelle 9 aufgeführt.					

Die errechnete Größe der amplifizierten PCR-Produkte ohne Insert lag bei 458 bp, was der Bande im Agarosegel entsprach (Abbildung 21).

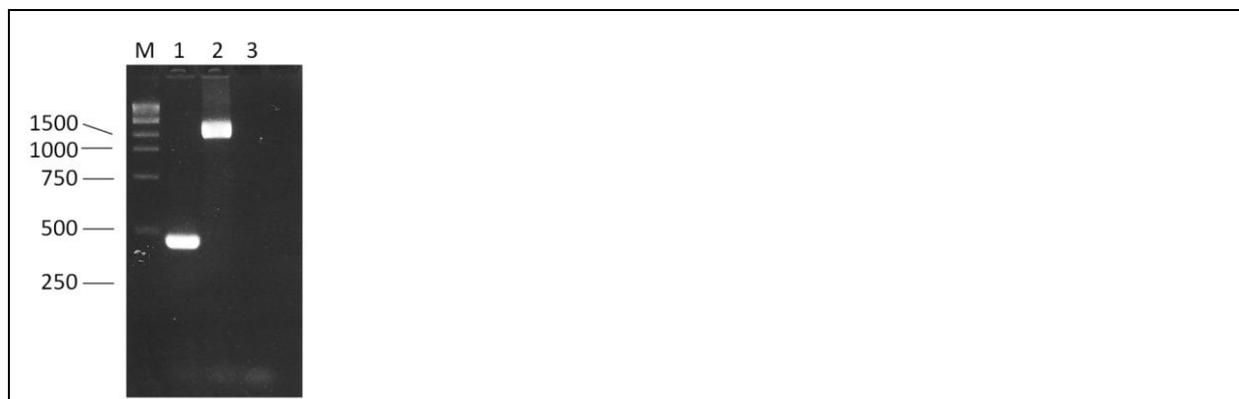


Abbildung 21: PCR-Screen zum Nachweis der Deletion von AI-2

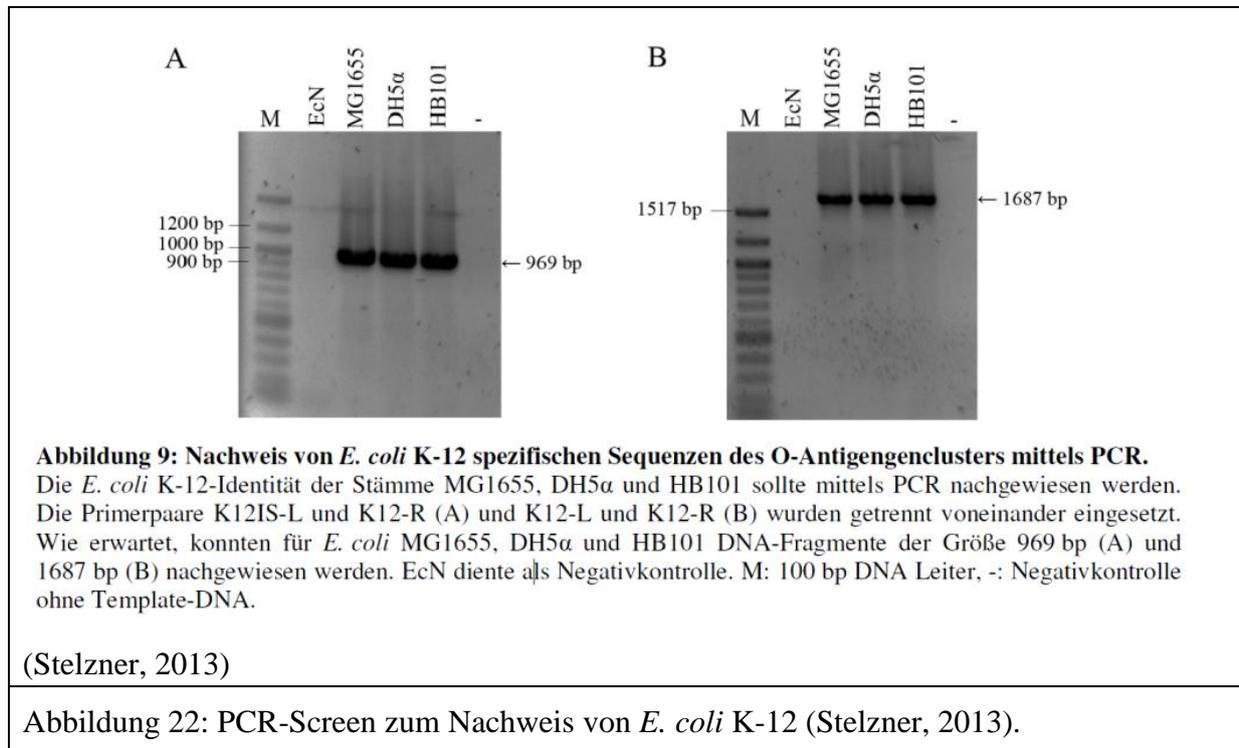
Durchgeführt wurde eine PCR mit den Primern *luxS* fw und *luxS* rev (Jacobi et al., 2012). M: 1 kb DNA-Leiter (NEB); Spur 1: EcN, Spur 2: EcN::*luxS*, Spur 3: Negativkontrolle (dH₂O)

Die Identität von EcN::*luxS* konnte bestätigt werden. EcN::*luxS* wies hierbei die beschriebene Resistenz gegen Kanamycin (50 µg/ml) auf (Jacobi et al., 2012), die von einem Insert kodiert wird, welches durch PCR nachgewiesen werden konnte.

4.1.5 Nachweis von *E. coli* K-12 spezifischer Sequenzen

Um die Identität der K-12 Stämme zu bestätigen, wurden die Stämme mittels PCR-Reaktion überprüft.

Die Überprüfung wurde von Kathrin Stelzner (Stelzner, 2013) durchgeführt. Die Identität von MG1655, DH5 α und HB101 konnte bestätigt werden (Abbildung 22).



4.1.6 Antibiotikaresistenz

Zur Unterscheidung von EcN und den pathogenen *E. coli* Stämmen in Co-Kultur wurden zunächst Tests auf Antibiotikaresistenz der einzelnen Stämme durchgeführt (3.1.3). Als Resultat dieser Tests wurde Ampicillin (50 μ g/ml) zur Unterscheidung von EcN (Sensitiv) und den EAHEC Isolaten TY3730 (Resistent) und TY3456 (Resistent) verwendet. Zur Differenzierung von EcN (Sensitiv) und EAEC O104:H4 55989 (resistent) wurde Doxycyclin (6 μ g/ml) ausgewählt. Alle drei oben erwähnten pEc Stämme zeigten bei den Antibiotikakonzentrationen keine Reduzierung der Keimzahl nach Ausplattieren auf AB-Agarplatten im Vergleich zu Agarplatten ohne Antibiotika. Eine Differenzierung durch andere getestete Antibiotika war nicht möglich. Dies lag daran, dass der Resistenz-Unterschied zwischen EcN und den pathogenen *E. coli* Stämmen entweder zu gering war, oder die resistenten Bakterien dennoch eine Reduzierung der Lebendkeimzahl im Vergleich zur Inkubation ohne Antibiotika zeigten. Eine quantitative Auswertung von Co-Kulturversuchen wäre damit nicht möglich gewesen.

Was im MHK-Gram^{neg} – Test besonders hervorzuheben ist, ist die Sensitivität des EAHEC Isolates TY3456 gegen Trimethoprim/Sulfamthoxazol (Cotrimoxazol). Alle anderen getesteten EAHEC Isolate (18) waren gegen diese Antibiotika resistent.

Tabelle 32: Ergebnisse der MHK-Gram^{neg} - Tests

Antibiotikum	Abk.	Konzentr. (µg/ml)	Stamm.Nr., Serotyp, Stammbezeichnung								
			30, EcN WT	3, O157:H7 EDL933	5, O26:H11 1530/99	6, O103:H2 5714/96	7, O111:H- 1637/77	15, O104:H4 TY3730	28, O104:H4 TY3456	32, O145:H25 4392/97	34, O104:H4 55989
Wachstumskontrolle	W Lana		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Chloramphenicol	Cr	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gentamycin	Gm	1	0	0	0	0	0	0	0	x	x
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amikacin	Ak	4	x	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tobramycin	To	1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		2	x	0	0	0	x	x	0	0	x
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Doxycyclin	Dx	1	0	x	0	0	0	x	x	0	x
		2	0	x	0	0	x	x	x	0	x
		4	0	0	0	0	0	x	x	0	x
Trimethoprim/ Cotrimoxazol	T/S	16	0	0	0	0	0	x	0	0	0
		32	0	0	0	0	0	x	0	0	0
		64	0	0	0	0	0	x	0	0	0
Ampicillin	Am	2	x	x	x	x	0	x	x	x	x
		4	0	0	0	x	0	x	x	x	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Ampicillin / Sulbactam	Am / S	2	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Mezlocillin	MEC	4	0	0	0	x	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		16	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Ticarcillin	TIC	8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		16	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		32	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Piperacillin	PIP	4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		16	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		32	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Piperacillin / Tazobactam	PIP / Tz	4	0	0	0	x	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Azlocillin	ALC	8	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		16	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		32	0	x	0	0	0	x	x	x	0
		64	0	0	x	0	0	x	x	0	0
Cefsulodin	CFS	2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		4	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		8	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		16	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aztreonam	AZT	2	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		16	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefaclor	Cc	1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
		2	x	x	x	x	0	x	x	x	x
		4	x	0	x	x	0	x	x	x	x
Cefixim	CFM	1	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		2	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefuroxim	CRX	1	0	x	x	x	x	x	x	x	0
		2	0	x	0	x	0	x	x	x	0
		4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefazolin	CZ	4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefotaxim	CTX	2	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefoxitin	FOX	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefoperazon	CFP	4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		16	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefotiam	CTM	4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Ceftazidim	CFZ	4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		16	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Cefepim	CFP	4	0	0	0	0	0	x	x	0	0
		8	0	0	0	0	0	x	x	0	0
Ofloxacin	Ofi	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxazin	Cfl	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrofurantoin	Fd	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		256	0	0	0	0	0	0	0	0	0

X = Resistenz / Wachstum; 0 = Sensitiv / kein Wachstum;

Die Nummern der Bakterienstämme entsprechen den in Tabelle 11 angegebenen Stammmummern.

Tabelle 33: Ergebnisse der ATB™ VET - Tests

Chemotherapeutikum	Abkürzung	Konzentration (µg/ml)	Stamm.Nr., Serotyp, Stammbezeichnung					
			3, O157:H7	5, O26:H11	6, O103:H2	7, O111:H-	32, O145:H25	30, EcN WT
Penicillin	PEN	0,25	X	X	X	X	X	X
Erythromycin	ERY	1	0	0	0	0	0	0
Amoxicillin	AMO	4	0	0	0	0	0	0
Lincomycin	LIN	2	X	X	X	X	X	X
Amox-Clav.AC	AMC	4 / 2	0	X	X	x (leicht)	0	0
Pristinamycin	PRI	2	0	0	0	0	0	0
Oxacillin	OXA	2	0	0	0	0	0	0
Tylosin	TYL	2	0	0	0	0	0	0
Cefalotin	CFT	8	0	0	0	0	0	0
Colistin	COL	4	0	0	0	0	0	0
Cefoperazon	CFP	4	0	0	0	0	0	0
Cotrimoxazol	TSU	2 / 38	0	0	0	0	0	0
Streptomycin	STR	8	0	0	0	0	0	0
Sulfamethizol	SUL	100	0	0	0	0	0	0
Spectinomycin	SPE	64	X	X	X	X	X	X
Flumequin	FLU	4	X	X	X	X	X	X
Kanamycin	KAN	8	X	X	X	X	X	X
Oxolinic Ac.	OXO	2	X	X	X	X	X	X
Gentamicin	GEN	4	0	0	0	0	0	0
Enrofloxacin	ENR	0,5	0	0	0	0	0	0
Apramycin	APR	16	0	0	0	0	0	0
Nitrofurantoin	FUR	25	0	0	0	0	0	0
Chloramphenicol	CMP	8	0	0	0	0	0	0
Fusidic Ac.	FUC	2	0	0	0	0	0	0
Tetracyclin	TET	4	0	0	0	0	0	0
Rifampicin	RFA	4	X	X	X	X	X	X
Doxycyclin	DOT	4	X	X	X	X	X	X
Metronidazol	MTR	4	X	X	X	X	X	X

X = Resistenz / Wachstum; 0 = Sensitiv / kein Wachstum
Die Nummern der Bakterienstämme entsprechen den in Tabelle 11 angegebenen Stammmummern.

Tabelle 34: Ergebnisse der ATB™ G-EU - Tests

Chemotherapeutikum	Abkürzung	Konzentration (µg/ml)	Stamm.Nr., Serotyp, Stammbezeichnung					
			3, O157:H7	5, O26:H11	6, O103:H2	7, O111:H-	32, O145:H25	30, EcN WT
Ampicillin	AMP	8	0	X	0	0	0	0
Amox-Clav.Ac	AMC	8 / 2	0	0	0	0	0	0
Ticarcillin	TIC	8	0	0	0	0	0	0
Piperacillin	PIC	8	0	0	0	0	0	0
Piperacilin + Tazobactam	TZP	8/4 – 16/4	0	0	0	0	0	0
Cephalotin	CFT	8	0	X	X	x (leicht)	0	0
Cefuroxim	CXM	8	0	0	0	0	0	0
Cefixim	CFM	1	0	0	0	0	0	0
Cefotaxim	CTX	1	0	0	0	0	0	0
Cefoxitin	CXT	8	0	0	0	0	0	0
Cefoxitin 32	CX32	32	0	0	0	0	0	0
Ceftazidim	CAZ	8-1	0	0	0	0	0	0
Cefepim	FEP	8-1	0	0	0	0	0	0
Imipenem	IMI	2	0	0	0	0	0	0
Meropenem	MERO	2	0	0	0	0	0	0
Gentamicin	GEN	2	0	0	0	0	0	0
Tobramycin	TOB	2	0	0	0	0	0	0
Amikacin	AKN	8	0	0	0	0	0	0
Tetracyclin	TET	4	0	0	0	0	0	0
Nalidixinsre CASFM	NALF	8	0	0	0	0	0	0
Nalidixinsre CLSI	NALI	16	0	0	0	0	0	0
Ofloxacin	OFL	0,5	0	0	0	0	0	0
Levofloxacin	LVX	1	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	CIP	0,5 – 1	0	0	0	0	0	0
Cotrimoxazol	TSU	2/38	0	0	0	0	0	0
Fosfomycin	FOS	32	0	0	0	0	0	0

X = Resistenz / Wachstum; 0 = Sensitiv / kein Wachstum
Die Nummern der Bakterienstämme entsprechen den in Tabelle 11 angegebenen Stammmummern.

4.1.7 API 20E

Zur Identifizierung der Bakterienstämme wurde ein metabolisches Profil der Stämme mit dem API 20E Test erstellt. Es konnte hier einwandfrei festgestellt werden, dass es sich bei den verwendeten Stämmen um *E. coli* Bakterien handelt.

Tabelle 35: Ergebnisse des API 20E-Tests

Stamm	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
O157:H7 EDL933	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
O26:H11, 1530/99	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
O103:H2, 5714/96	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
O111:H-, 1637/77	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
EcN WT	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1
O145:H25, 4392/97	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1

1 = Positiv, 0 = Negativ

4.2 REM Aufnahmen von adhärennten Bakterien

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Bilder von adhärennten Bakterien wurden aufgenommen, um zu klären, ob durch Co-Kultivierung eine Reduzierung der Adhäsine (Fimbrien, Flagelle) auftritt, was wiederum eine Abnahme der Adhäsion in Co-Kultur zur Folge haben könnte. Bakterien in Co-Kultur könnten hier durch gold-gelabelte Antikörper unterschieden werden. Zunächst wurden jedoch Bilder in Einzelkultur aufgenommen.

4.2.1 REM Aufnahmen von EAHEC O104:H4 TY3730

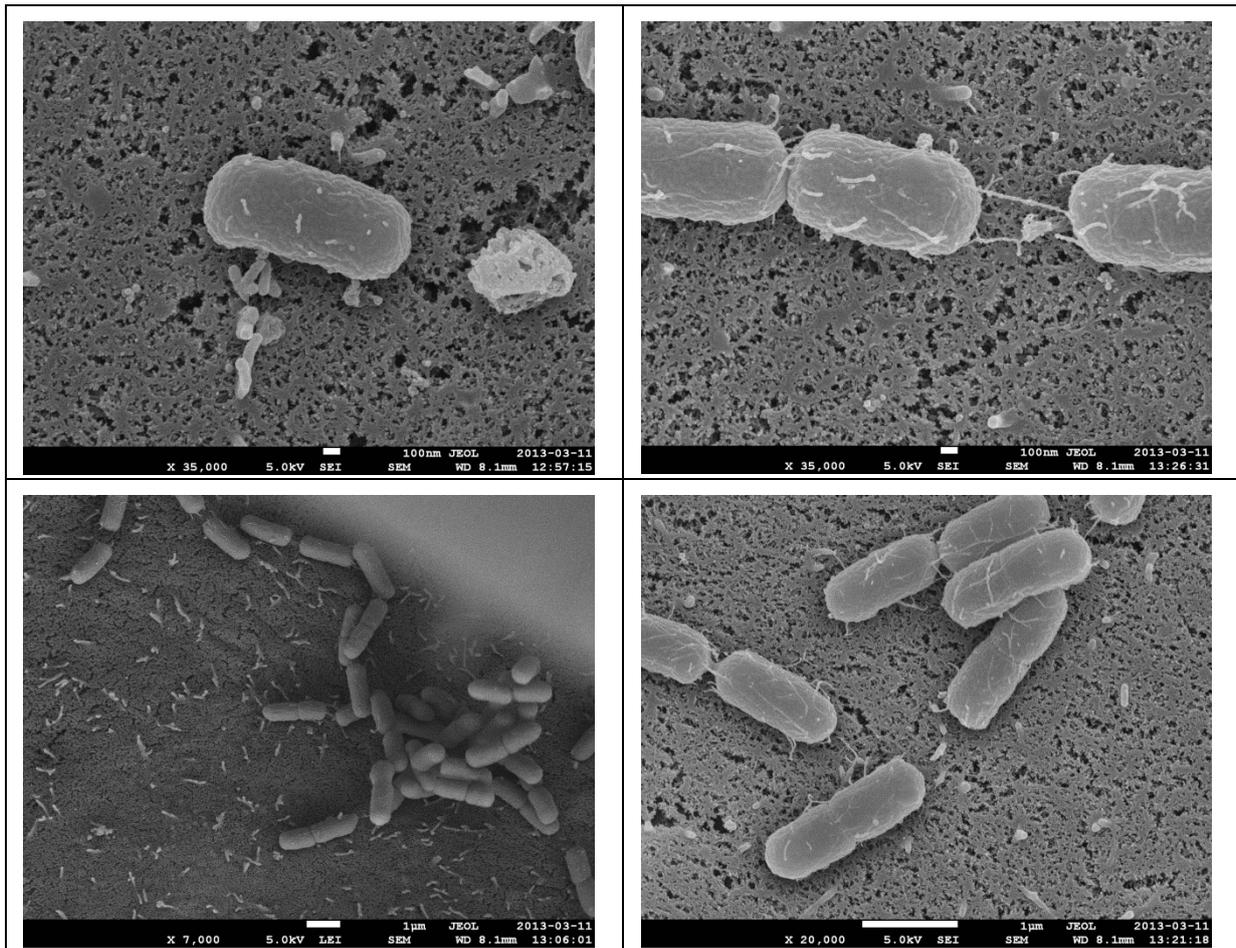


Abbildung 23: Aufnahmen von EAHEC O104:H4 TY3730 mit REM

Die Bakterien adhäreren an mit Caco-2 Epithelzellen beschichteten Deckgläsern. Behandlung der Deckgläser wird in 3.4 erläutert. Die einzelnen Parameter (z.B. Maßstab) werden unter den Aufnahmen angegeben.

In den Aufnahmen von EAHEC TY3730 sind sehr wenig ausgeprägte Oberflächenstrukturen erkennbar. Flagellen wurden nicht beobachtet (Abbildung 23).

4.2.2 REM Aufnahmen von EHEC O157:H7 EDL933

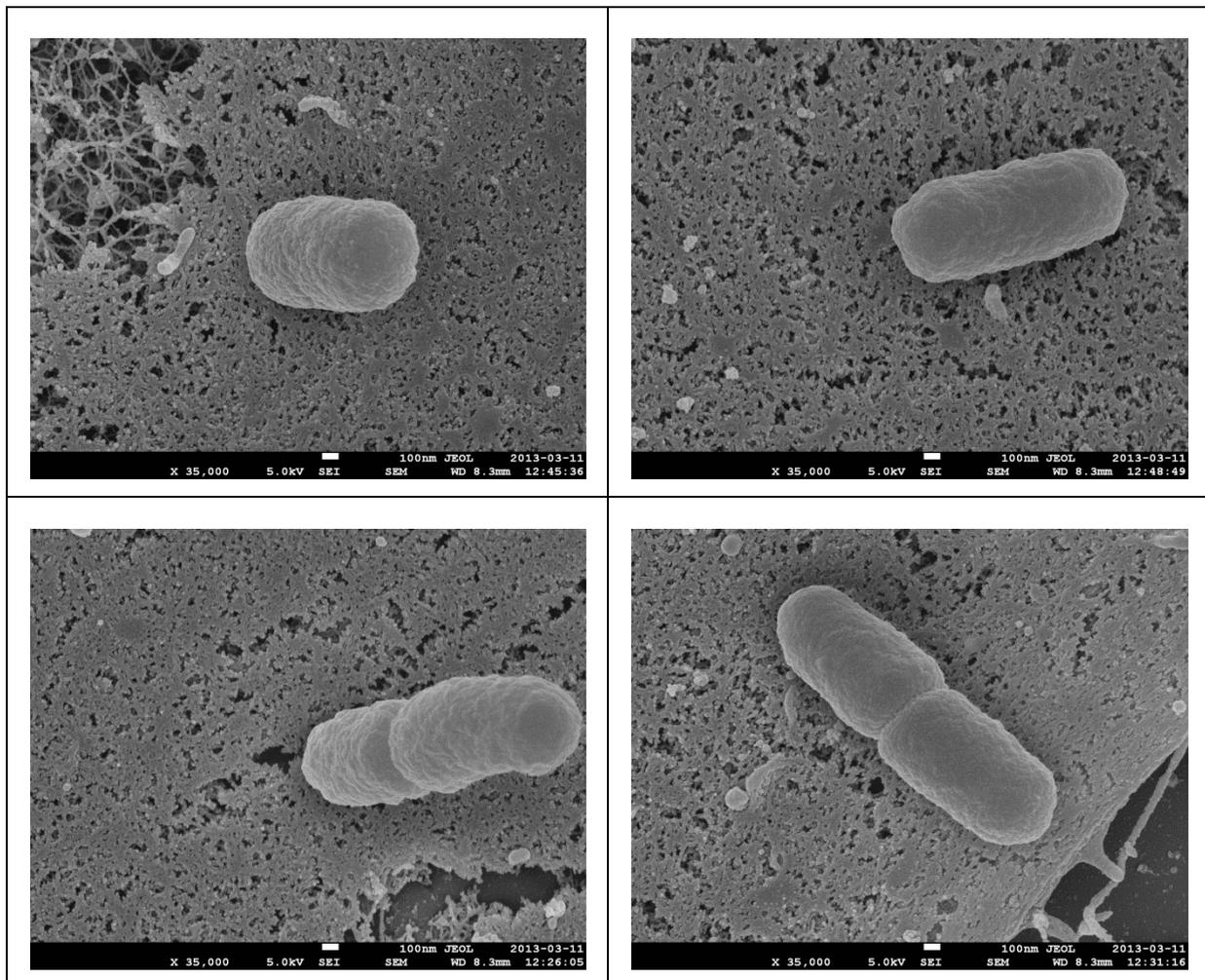


Abbildung 24: Aufnahmen von EHEC O157:H7 EDL933 mit REM

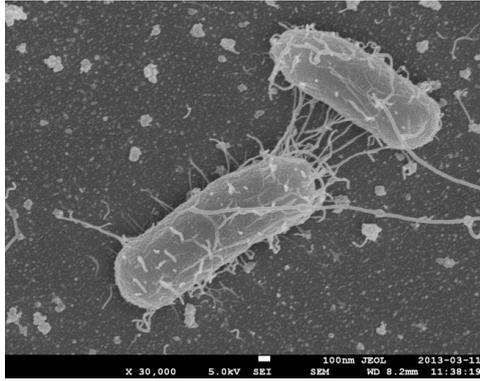
Die Bakterien adhäreren an mit Caco-2 Epithelzellen beschichteten Deckgläsern. Behandlung der Deckgläser wird in 3.4 erläutert. Die einzelnen Parameter (z.B. Maßstab) werden unter den Aufnahmen angegeben.

In den Aufnahmen von EHEC O157:H7 (Abbildung 24) sind keine Oberflächenstrukturen erkennbar. Aus Mangel an Oberflächenstrukturen wurden keine Aufnahmen mit Co-Kulturen durchgeführt.

4.2.3 REM Aufnahmen von EcN

Eine Aufnahme zum Vergleich von EcN und EHEC/EAHEC wurde von Karen Wolf zur Verfügung gestellt (Abbildung 25).

Bei den EM-Aufnahmen von EcN war im Gegensatz zu EHEC/EAHEC eine Vielzahl von Oberflächenstrukturen erkennbar. Deutlich erkennbar ist die Flagelle und und verschiedene Fimbrienstrukturen (Abbildung 25).



(Wolf, 2013)

Abbildung 25: Aufnahmen EcN mit REM

Die Bakterien adhäreren an mit T24 Epithelzellen beschichteten Deckgläsern. Behandlung der Deckgläser wird in 3.4 erläutert. Die einzelnen Parameter (z.B. Maßstab) werden unter den Aufnahmen angegeben. (Abbildung aus Wolf, 2013, Abb.: 52).

4.3 Einfluss von EcN auf die Adhäsion von pathogenen *E. coli* Stämmen

4.3.1 Adhäsion der Bakterienstämme in Einzelkultur

Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an Wirtszellen wird als wichtiger Schritt in der Etablierung einer Infektion angesehen. Ebenso wichtig ist die Adhäsion für die Kolonisierung durch probiotische Bakterien. Aus diesem Grund wurde zuerst die Adhäsionseffizienz vom probiotischen EcN und pathogenen *E. coli* bestimmt.

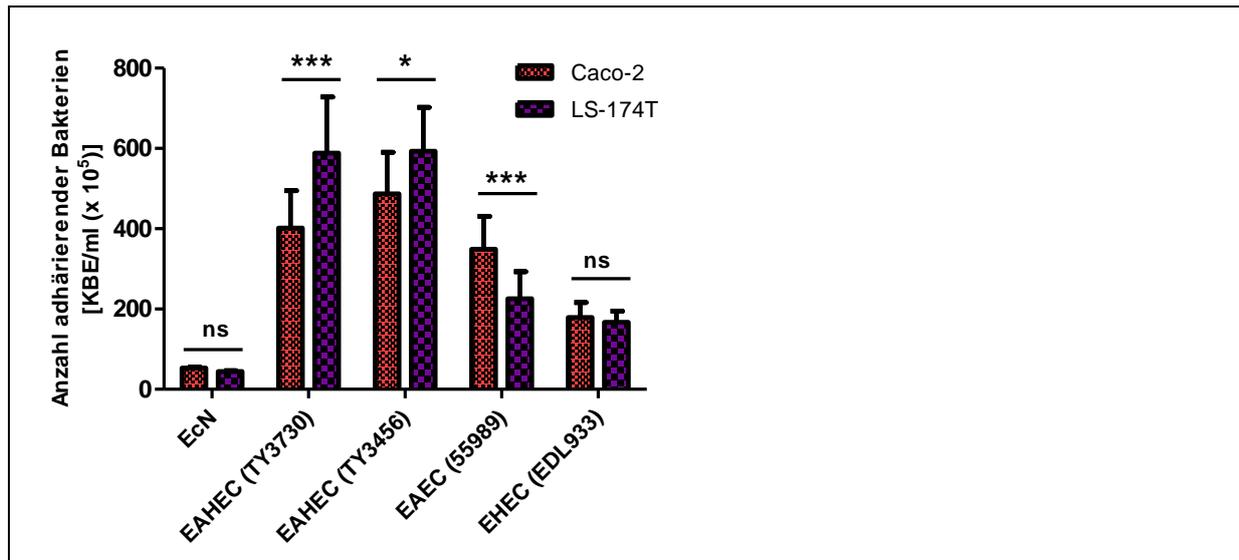


Abbildung 26: Anzahl der an Epithelzelllinien adhärrierenden Bakterien in Einzelkultur

Die Adhäsion verschiedener *E. coli* Stämme an die Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde bestimmt. (ns: nicht signifikant, **p* < 0,05, ****p* < 0,001)

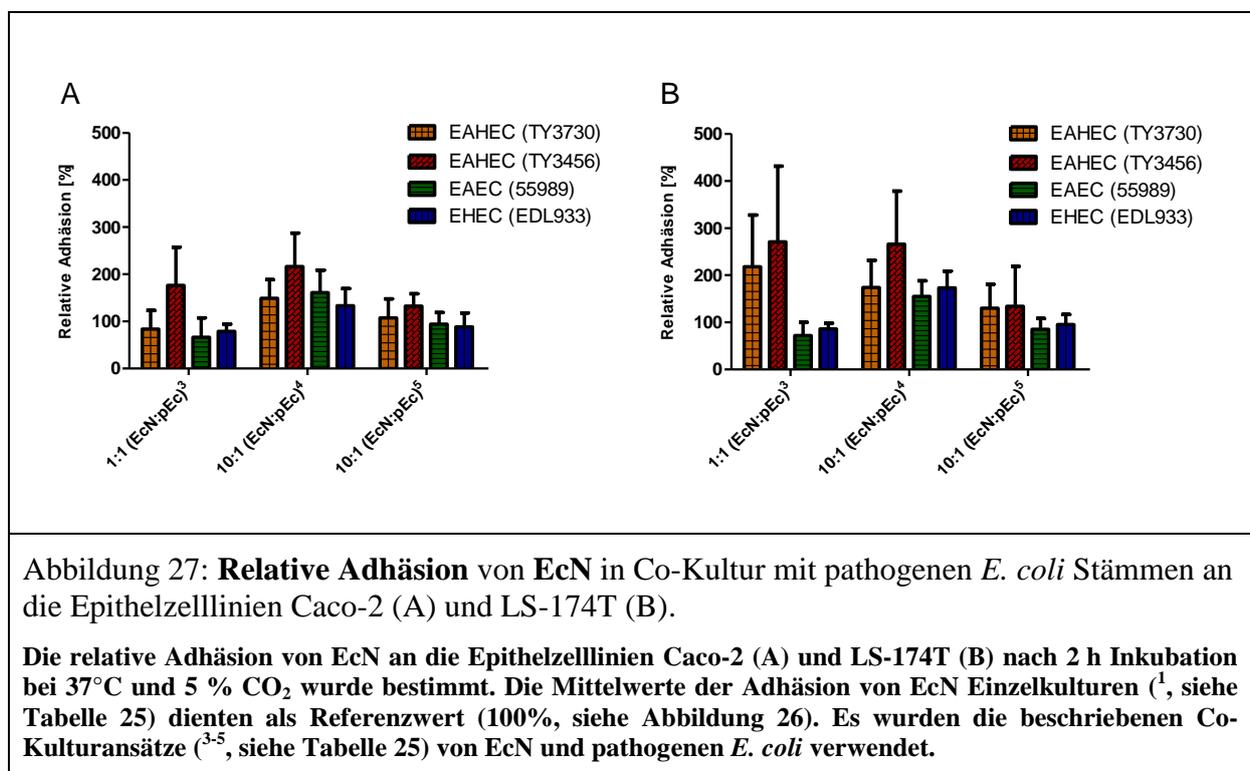
EcN wies in den Versuchen die niedrigste Adhäsionseffizienz auf (Caco-2: $53,2 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^5$ KBE/ml; LS-174T: $44,5 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$ KBE/ml). Die Adhäsion an die Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T war vergleichbar. Die höchste Anzahl an adhärenenten Bakterien wurde bei den beiden EAHEC Isolaten festgestellt (TY3730: Caco-2: $401,7 \times 10^5 \pm 93,1 \times 10^5$ KBE/ml; LS-174T: $588,3 \times 10^5 \pm 140,3 \times 10^5$ KBE/ml; TY3456: Caco-2: $486,7 \times 10^5 \pm 103,4 \times 10^5$ KBE/ml; LS-174T: $593,3 \times 10^5 \pm 108,7 \times 10^5$ KBE/ml). Die Adhäsionseffizienz des nahe verwandten Stammes EAEC 55989 war weniger ausgeprägt (Caco-2: $348,7 \times 10^5 \pm 82,5 \times 10^5$ KBE/ml; LS-174T: $225,7 \times 10^5 \pm 67,6 \times 10^5$ KBE/ml), aber dennoch höher als bei EHEC EDL933 (Caco-2: $179,2 \times 10^5 \pm 36,8 \times 10^5$ KBE/ml; LS-174T: $166,9 \times 10^5 \pm 28,0 \times 10^5$ KBE/ml). Ein signifikanter Unterschied der Adhäsion an die beiden Zelllinien konnte bei EAHEC TY3730, EAHEC TY3456 und EAEC 55989 festgestellt werden, während kein Unterschied bei EcN und EHEC EDL933 festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 26).

4.3.2 Adhäsion in Co-Kultur

4.3.2.1 Adhäsion von EcN in Co-Kultur mit pathogenen *E. coli* Stämmen

In weiteren Versuchen wurde untersucht, welchen Einfluss eine Co-Kultivierung von EcN und pathogenen *E. coli* Stämmen auf die Adhäsion der beiden co-kultivierten Stämme hat.

Zuerst wurde die Adhäsion von EcN in Co-Kultur im Vergleich zur Einzelkultur bestimmt. Die Adhäsionseffizienz von EcN an Epithelzellen wurde meist nur geringfügig von EAEC (55989) und EHEC (EDL933) beeinflusst (siehe Abbildung 27). Die Adhäsion von EcN in der 1:1 Co-Kultur mit EAHEC (TY3456) (Caco-2: 176 ± 81 %; LS-174T: 271 ± 161 %) und EAHEC (TY3730) (LS-174T: 218 ± 110 %) war erhöht. Diese Co-Kulturen wiesen, durch den Versuchsaufbau bedingt, eine hohe Varianz auf. Die Adhäsion von EcN in den 10:1 Co-Kulturen (⁴, siehe Tabelle 25) war in allen Ansätzen erhöht. Hierbei ist darauf zu achten, dass Einzelkulturen mit 10-fach niedrigerer Bakterienanzahl als Referenz dienten (^{1,4}, siehe Tabelle 25).



4.3.2.2 Adhäsion von pathogenen *E. coli* Stämmen in Co-Kultur mit EcN

Im Anschluss wurde die Adhäsion von pathogenen *E. coli* in Co-Kultur im Vergleich zur Einzelkultur bestimmt. Die Adhärenz der beiden EAHEC Stämme an Caco-2 Zellen war nach einer Ko-Inkubation mit EcN (³, 1:1) um 56 % bzw. 72% reduziert. Im Verhältnis von 10:1 fiel die Adhärenz bis auf 5 % (⁴, TY3730) und 13 % (⁴, TY3456) bzw. auf 25 % (⁵, TY3730) und 57 % (⁵, TY3456) ab. EcN hemmte die Adhärenz von EAEC an Caco-2 Zellen um 45 % (³, 1:1), >99 % (⁴, 10:1) und 70% (⁵, 10:1). Auch die Adhärenz von EHEC EDL933 wurde reduziert. Im Verhältnis von 1:1 konnte noch eine Adhärenz von 39 % (³) bzw. im Verhältnis von 10:1 von < 1 % (⁴) und 12 % (⁵) festgestellt werden (Abbildung 28).

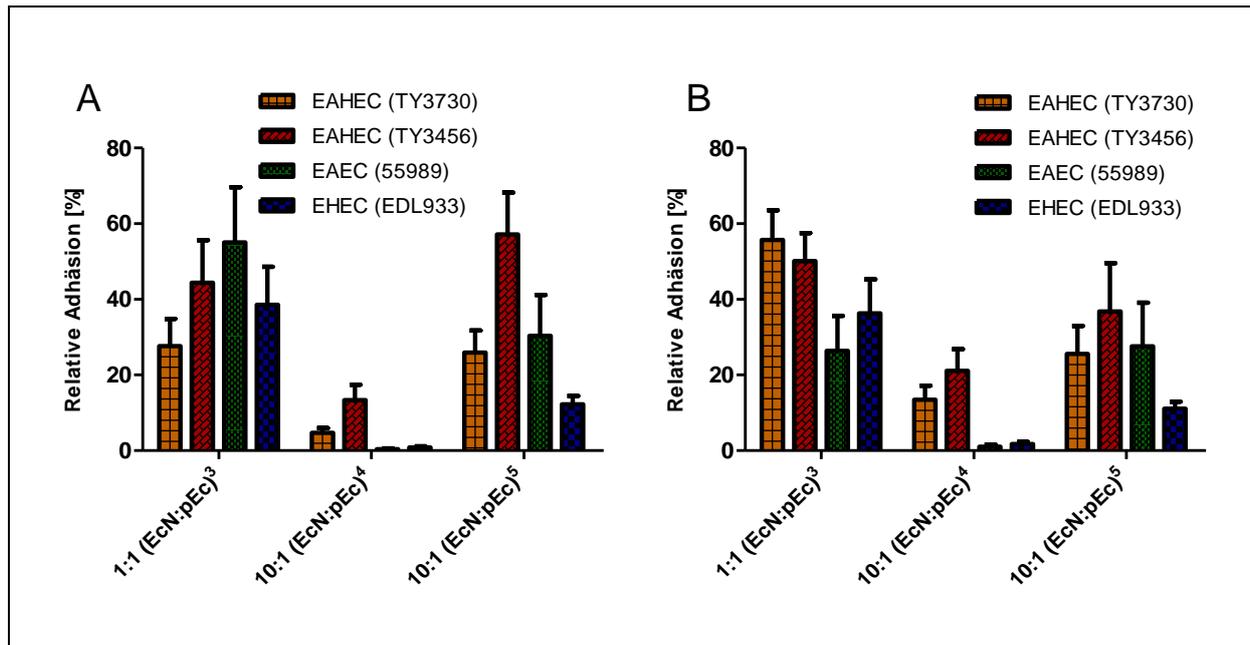


Abbildung 28: **Relative Adhäsion** von pathogenen *E. coli* Stämmen (**pEc**) in Co-Kultur mit EcN an die Epithelzelllinien Caco-2 (A) und LS-174T (B).

Die relative Adhäsion verschiedener *E. coli* Stämme an die Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde bestimmt. Die Mittelwerte der Adhäsion von pathogenen *E. coli* Einzelkulturen dienten als Referenzwert (100%, siehe Abbildung 26). Es wurden die beschriebenen Co-Kulturansätze (³⁻⁵, siehe Tabelle 25) von EcN und pathogenen *E. coli* verwendet. Alle Werte waren im Vergleich zur Einzelkultur signifikant niedriger mit $p < 0,0001$.

Im Vergleich zur starken Reduktion der Adhäsion beider EAHEC Stämme an Caco-2 Zellen in Gegenwart von EcN war diese Reduzierung an die Mucus produzierende Zelllinie LS-174T meist weniger stark ausgeprägt. Im Verhältnis von 1:1 wurde die Adhärenz um 44 % (³, TY3730) und 50 % (³, TY3456) reduziert. Eine Reduktion der Adhärenz um 87 % (⁴, TY3730) und 79 % (⁴, TY3456) bzw. um 74 % (⁵, TY3730) und 63 % (⁵, TY3456) konnte im Verhältnis von 10:1 beobachtet werden. Die Adhärenz von EAEC wurde auf 26 % (³, 1:1) bzw. auf 1 % (⁴, 10:1) und 28 % (⁵, 10:1) gehemmt. Die Minderung der Adhärenz von EHEC EDL933 an LS-174T Zellen und Caco-2 Zellen war vergleichbar. Für EDL933 zeigte sich eine Restadhärenz von 36 % (³, 1:1), 2 % (⁴, 10:1) und 11 % (⁵, 10:1) (Abbildung 28).

Die Ansätze zeigten eine signifikante, EcN-Dosis-abhängige Reduzierung der Adhärenz der pathogenen *E. coli* an die Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T (siehe Abbildung 28). Die Hemmung fiel bei Reduzierung der Bakterienzahl (10:1) schwächer aus (Vergleiche ^{4, 5}, Abbildung 28).

4.3.3 Adhäsion von EAHEC TY3730 in Co-Kultur mit SK22D

E. coli Nissle 1917 produziert unter anderem die Mikrozine M und H47, welche antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Um den Einfluss der Mikrozine auf die Hemmung der Adhäsion beurteilen zu können, wurde ein Vorversuch mit der mikrozin-negativen EcN-Mutante SK22D im Co-Kultivierungsversuch durchgeführt. Der Versuchsaufbau mit EcN und SK22D war identisch (siehe 3.5).

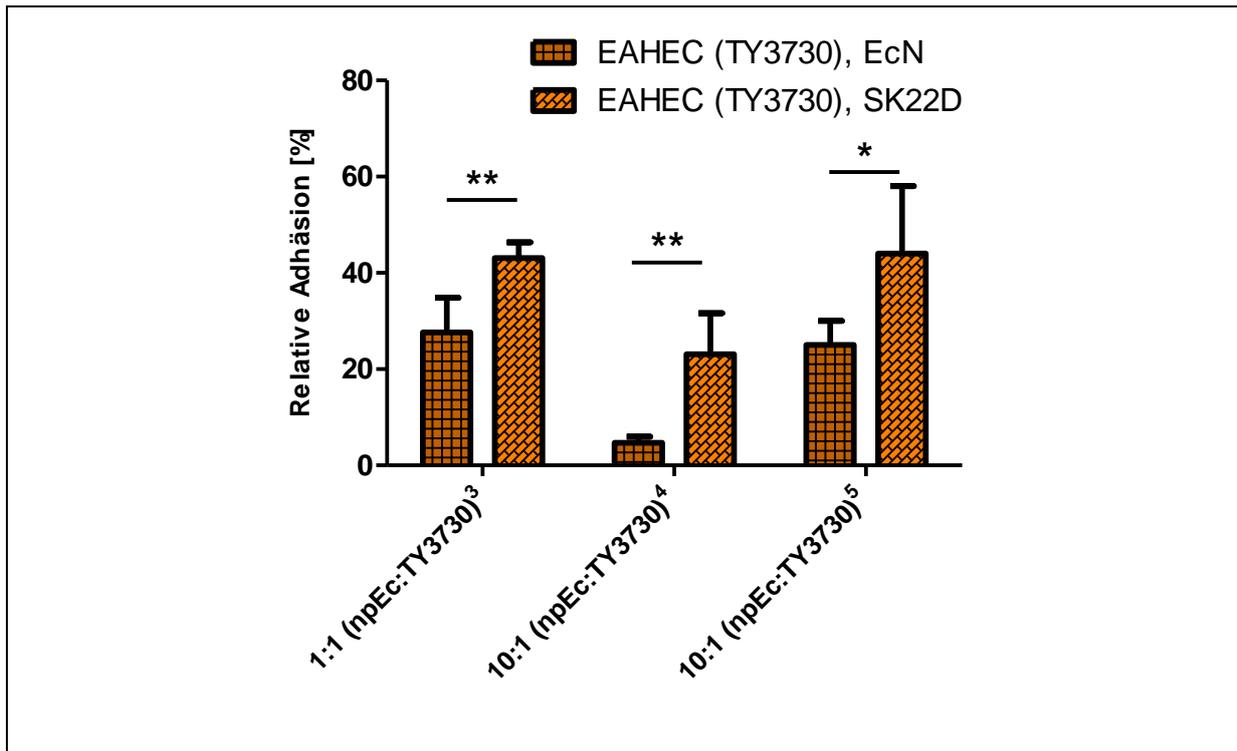


Abbildung 29: Vergleich der relativen Adhäsion von EAHEC TY3730 in Co-Kultur mit nicht pathogenen *E. coli* (EcN/SK22D) an die Epithelzelllinien Caco-2.

Die relative Adhäsion von EAHEC TY3730 an die Epithelzelllinie Caco-2 nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde bestimmt. Der Mittelwert der Adhäsion der EAHEC TY3730 Einzelkultur diente als Referenzwert (100%, siehe Abbildung 26). Gegenübergestellt werden die Co-Kulturansätze (³⁻⁵, siehe Tabelle 25) von EAHEC TY3730 mit EcN oder der mikrozin-negativen Mutante SK22D. Der Vorversuch wurde einmal als Vierfachansatz durchgeführt. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

SK22D reduzierte die Adhäsion von EAHEC TY3730 im Verhältnis von 1:1 auf 43 % (³, EcN: 28 %). Eine Reduktion der Adhärenz auf 23 % (⁴, EcN: 5 %) und 44 % (⁵, EcN: 25 %) konnte jeweils im Verhältnis von 10:1 beobachtet werden. Verglichen mit EcN war die Reduktion der Adhäsion damit weniger ausgeprägt. Ein signifikanter Unterschied aller Ansätze zur Einzelkultur und zur Co-Kultur mit EcN konnte festgestellt werden (Abbildung 29). Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Mikrozinen wurden von Kathrin Stelzner im Rahmen ihrer Masterarbeit („Studien zum Beitrag von Mikrozinen und weiteren Faktoren zur

antagonistischen Aktivität des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 Stammes gegen EHEC-Stämme“) durchgeführt.

4.3.4 Adhäsion von EAHEC TY3730 im 'Trans-Well' System

Um die Ursache der anti-adhäsiven Wirkung von EcN zu untersuchen, wurde eine Co-Kultivierung von EcN, SK22D oder MG1655 und EAHEC TY3730 unter räumlicher Trennung durch Filtereinsätze durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, ob sekretierte Faktoren oder Zellkontakt die anti-adhäsive Wirkung beeinflussen. Die 24-Kavitäten-Platten mit Caco-2 Epithelzellen und Bakterien wurden für 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert (siehe 3.6), anschließend gewaschen, mit Trypsin-EDTA behandelt und die Zellsuspension ausplattiert.

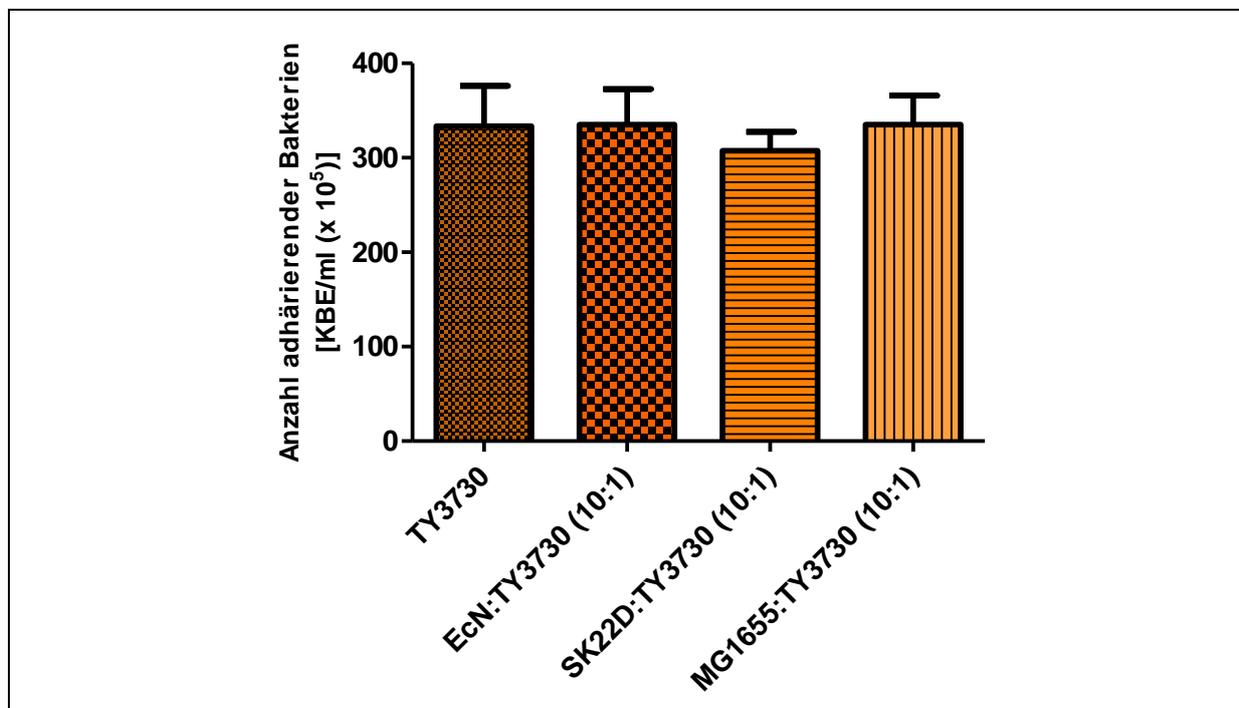


Abbildung 30: Anzahl der an Caco-2 Zellen adhärierenden EAHEC Bakterien im 'Trans-Well' System mit verschiedenen nicht pathogenen *E. coli* (npEc).

Die Adhäsion von EAHEC TY3730 an die Epithelzelllinien Caco-2 nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ im Trans-Well System wurde bestimmt. Eine räumliche Trennung der Bakterienstämme erfolgte durch Filtereinsätze. Hierbei wurde die 10-fache Menge an npEc in den Filtereinsatz gegeben, während sich EAHEC TY3730 im unteren Bereich mit den Epithelzellen befand. Als Kontrolle wurde Medium ohne Bakterien in den Filtereinsatz gegeben. Der Vorversuch wurde einmal als Vierfachansatz durchgeführt.

Es konnte kein Unterschied in der Anzahl an adhärierenden EAHEC TY3730 zwischen Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN, SK22D oder MG1655 festgestellt werden (Abbildung 30). Der Vorversuch wurde einmal als Vierfachansatz durchgeführt.

Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Zellkontakt und sekretierten Faktoren wurden von Kathrin Stelzner („Studien zum Beitrag von Mikrozininen und weiteren Faktoren zur antagonistischen Aktivität des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 Stammes gegen EHEC-Stämme“) im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

4.4 Einfluss von EcN auf das Wachstum von pathogenen *E. coli* Stämmen

Die Hemmung des Wachstums von pathogenen Mikroorganismen ist eine Eigenschaft, welche vielen Probiotika zugeschrieben wird. Wir wollten wissen, ob EcN das Wachstum der in dieser Arbeit verwendeten pathogenen *E. coli* (pEc) Stämme beeinflusst. Dazu wurden die Zellzahlen (KBE) der Bakterien zu Beginn des Experiments (0 h) und 2, 5 und 24 h nach Inokulierung bestimmt. Dies erfolgte sowohl für die Einzelkulturen, als auch für die Co-Kulturen von EcN und pEc. In diesem Versuchsansatz (siehe 3.5) wurden die Bakterien jeweils zu 1 ml DMEM Medium gegeben, welches einen 'Monolayer' der Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T bedeckte. Die Epithelzellen hatten keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien, was schließlich auch von Kathrin Stelzner (2013) bestätigt werden konnte. Da der Kurvenverlauf mit Caco-2 und LS-174T Zellen identisch war, werden hier nur die Daten der Versuche mit Caco-2 Zellen gezeigt. Es wurden jedoch im Zuge der Adhäsionsversuche auch Wachstumsversuche mit LS-174T Zellen durchgeführt, welche hier nicht gezeigt werden.

Die Einzelkulturen der EAHEC Isolate und des EAEC Stammes zeigten im Vergleich zu EcN geringfügig erniedrigte Keimzahlen (Abbildung 31: A und E; Abbildung 32: E). Die Zellzahlen von EHEC EDL933 waren zu allen untersuchten Zeitpunkten fast identisch mit denen der EcN Kultur (Abbildung 32: A).

In den Co-Inkubationsversuchen wurden EcN und die pathogenen *E. coli* Stämme im Verhältnis von 1:1 und 10:1 inokuliert. Obwohl das Wachstum von EAHEC TY3730 nicht von EcN gehemmt wurde, zeigten beide Stämme in Co-Kultur nach 5 und 24 h im Vergleich zur Einzelkultur erniedrigte Keimzahlen (Abbildung 31: A und B). Bei Inokulierung mit der 10-fachen Menge an EcN (⁴; Abbildung 31: C) zeigte EAHEC TY3730 im Vergleich mit den Keimzahlen der Einzelkultur reduziertes Wachstum. Das Verhältnis von EcN:EAHEC TY3730 nach 24 h war jedoch nur noch bei 2,3:1.

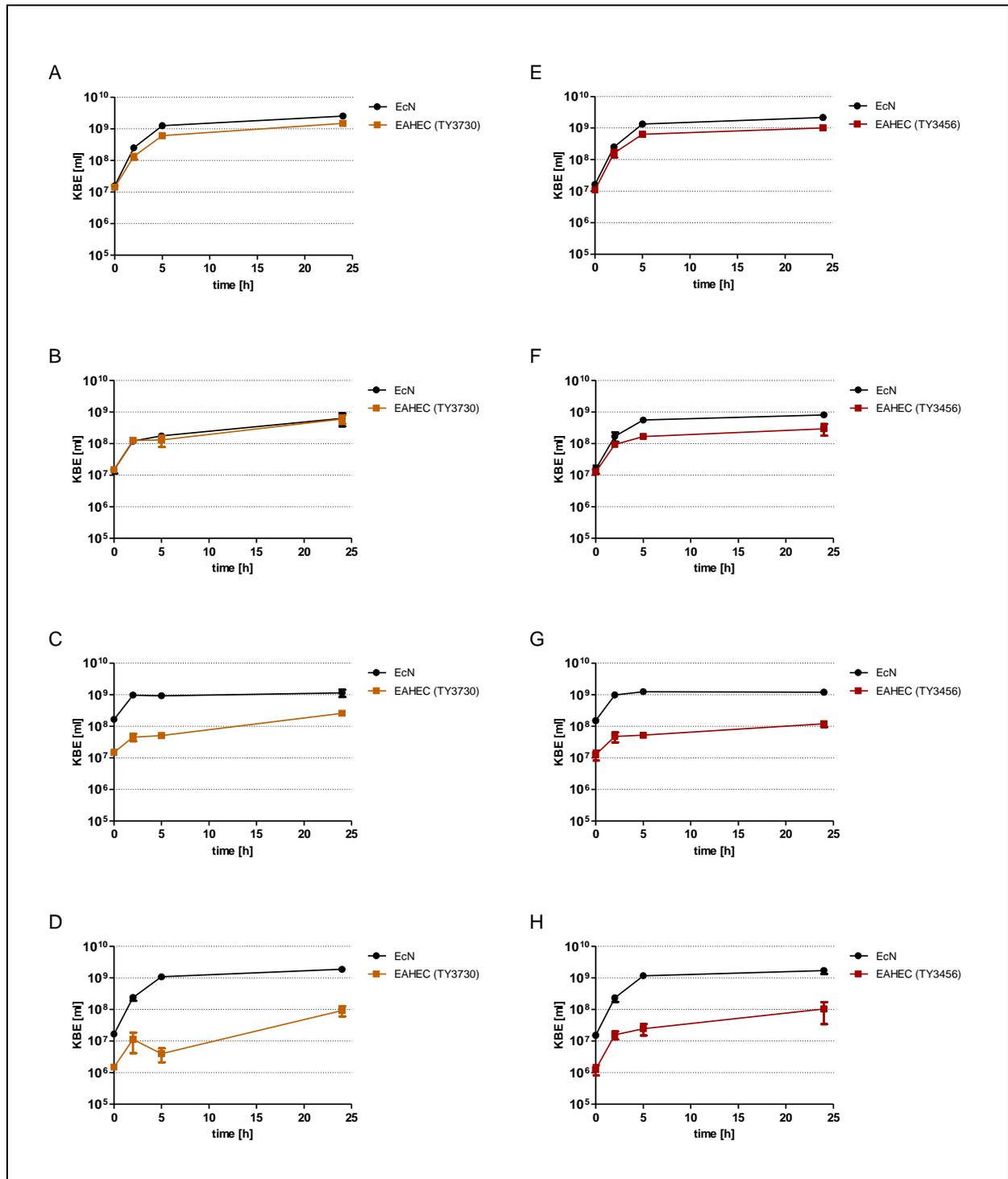


Abbildung 31: Wachstumskurven von EcN (●) oder pathogenen *E. coli* (■) in Einzelkulturen oder als Co-Kultur

(A) EcN und EAHEC TY3730 in Einzelkultur. (B) EcN und EAHEC TY3730 in Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 (³). (C) EcN und EAHEC TY3730 im Verhältnis von 10:1 (⁴). (D) EcN und EAHEC TY3730 im Verhältnis von 10:1 (⁵). (E) EcN und EAHEC TY3456 in Einzelkultur. (F) EcN und EAHEC TY3456 in Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 (³). (G) EcN und EAHEC TY3456 im Verhältnis von 10:1 (⁴). (H) EcN und EAHEC TY3456 im Verhältnis von 10:1 (⁵). Die verwendeten Inokula werden in Tabelle 25 aufgeführt.

Bei Inokulierung mit einer geringeren Bakterienmenge im Verhältnis 10:1 (⁵; Abbildung 31: D) zeigt sich eine deutliche Reduzierung der Keimzahl von EAHEC TY3730

(2 h: $1,1 \times 10^7$ KBE/ml; 5 h: $4,0 \times 10^6$ KBE/ml) durch EcN nach der 2 h - Messung. Die Keimzahl von EAHEC TY3730 erholte sich anschließend im Lauf der restlichen 24 h auf $9,4 \times 10^7$ KBE/ml. Das Verhältnis von EcN:EAHEC TY3730 nach 24 h lag hier bei 20:1.

Im Gegensatz zu EAHEC TY3730 zeigte EAHEC TY3456 im Verhältnis 1:1 bereits eine leichte Reduzierung des Wachstums. Die Zellzahlen von EAHEC TY3456 nach 5h und 24h waren niedriger als in der Einzelkultur (Abbildung 31: E und F). Das Verhältnis EcN:EAHEC nach 24 h lag bei 2,7:1. Bei Inokulierung im Verhältnis 10:1 zeigte sich bei beiden Bakterienmengen eine ähnliche Reduzierung des Wachstums. Die Lebendkeimzahl nach 24 h war kleiner als in Einzelkultur oder im Verhältnis von 1:1. Das Verhältnis von EcN:EAHEC TY3456 lag nach 24 h bei 10:1 (Abbildung 31: G; ⁴) und 16,6:1 (Abbildung 31: H; ⁵).

Wachstum von EHEC EDL933 und EcN in Einzelkultur war nahezu identisch (Abbildung 32: A). Bei Co-Kultivierung zeigte EHEC EDL933 allerdings nur während der ersten 2 Stunden einen Zuwachs der Lebendkeimzahl (Abbildung 32: B, C, D). Nach 2 Stunden reduzierte sich die Keimzahl von EHEC EDL933 auf Werte, die mit dem eingesetzten Inokulum vergleichbar waren. Das Verhältnis von EcN:EHEC lag nach 24 Stunden bei 144:1 (³, 1:1), bzw. 77:1 (⁴, 10:1) und 1042:1 (⁵, 10:1) (siehe Abbildung 32).

EAEC Stamm 55989 zeigte im Vergleich mit der EcN Einzelkultur ein leicht reduziertes Wachstum (siehe Abbildung 32 E). In der 1:1 Co-Kultur wurde das Wachstum von EAEC 55989 während der ersten 2 Stunden nicht beeinflusst. Im Anschluss kam es allerdings zu einer drastischen Reduzierung der EAEC Lebendkeimzahl von $1,2 \times 10^8$ KBE/ml auf $2,4 \times 10^6$ KBE/ml. Nach 5 Stunden erholte sich das Wachstum etwas, die im Inokulum eingesetzte Keimzahl wurde allerdings auch nach 24 h nicht erreicht. Im Verhältnis 10:1 (⁵, Abbildung 32 H) zeigte sich ein sehr ähnlicher Verlauf der Wachstumskurve mit Abfall und anschließender Regeneration. Inokulierung im Verhältnis 10:1 (⁴, Abbildung 32 G) resultierte dagegen im Abfall der Lebendkeimzahl bei 2 h, welche nach 5 Stunden ein stabiles Niveau von etwa 10 % des Ausgangswertes erreichte.

EHEC EDL933 und EAEC 55989 wurden offensichtlich durch EcN, auch schon im Verhältnis 1:1, nach 2-stündiger Co-Inkubation getötet. Im Gegensatz dazu zeigten die EAHEC Stämme nur leicht reduziertes Wachstum in Gegenwart von EcN.

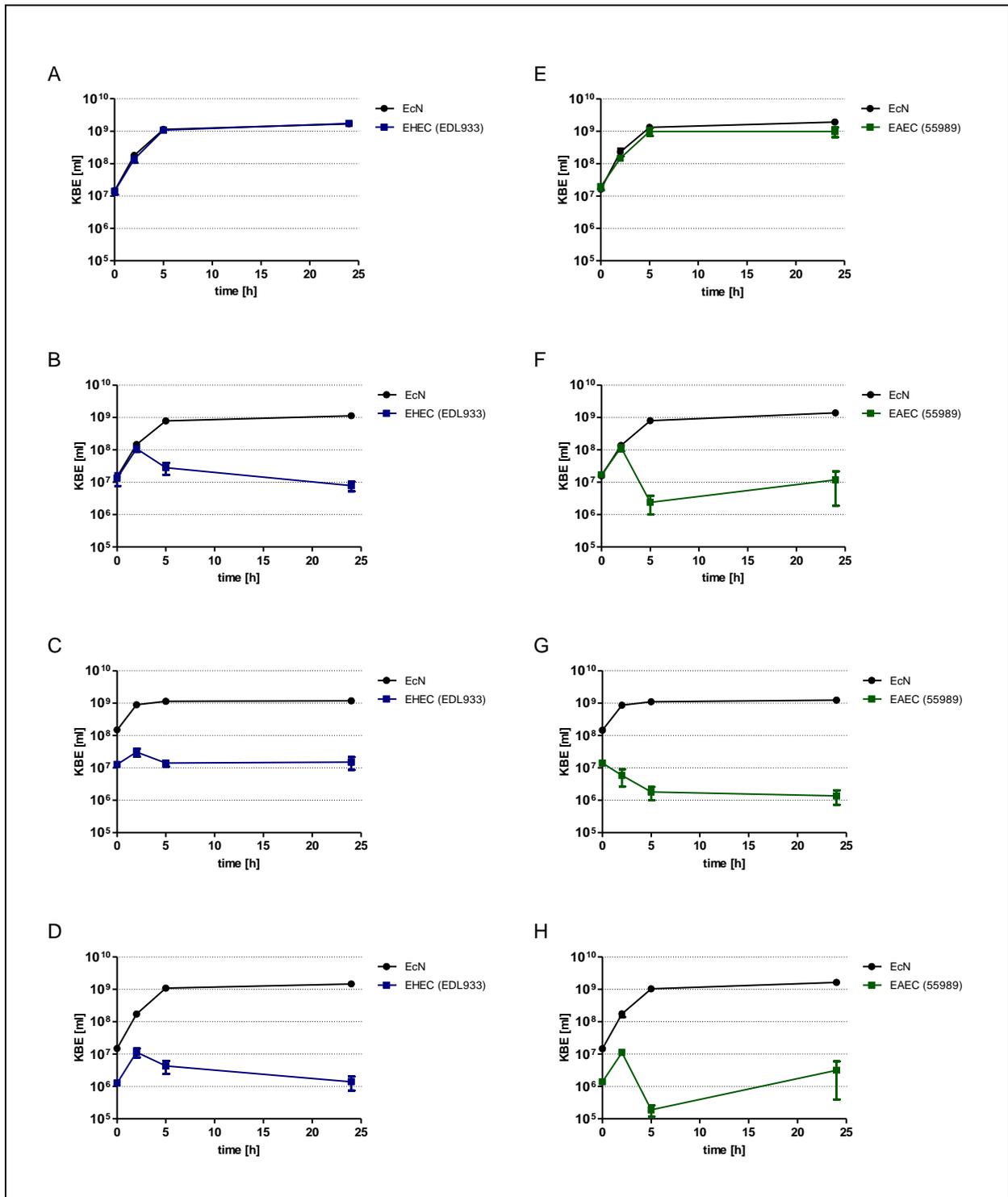


Abbildung 32: Wachstumskurven von EcN (●) oder pathogenen *E. coli* (■) in Einzelkulturen oder als Co-Kultur

(A) EcN und EHEC EDL933 in Einzelkultur. (B) EcN und EHEC EDL933 in Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 (³). (C) EcN und EHEC EDL933 im Verhältnis von 10:1 (⁴). (D) EcN und EHEC EDL933 im Verhältnis von 10:1 (⁵). (E) EcN und EAEC 55989 in Einzelkultur. (F) EcN und EAEC 55989 in Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 (³). (G) EcN und EAEC 55989 im Verhältnis von 10:1 (⁴). (H) EcN und EAEC 55989 im Verhältnis von 10:1 (⁵). Die verwendeten Inokula werden in Tabelle 25 aufgeführt.

4.5 Einfluss von SK22D auf das Wachstum von pathogenen *E. coli* Stämmen

Um den Einfluss der von EcN gebildeten Mikrozine auf das Wachstum von pathogenen *E. coli* Stämmen beurteilen zu können, wurde ein Vorversuch mit der mikrozin-negativen EcN-Mutante SK22D durchgeführt. Der Versuchsaufbau mit EcN und SK22D war identisch (siehe 3.5).

Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Mikrozinen wurden von Kathrin Stelzner („Studien zum Beitrag von Mikrozinen und weiteren Faktoren zur antagonistischen Aktivität des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 Stammes gegen EHEC-Stämme“) durchgeführt.

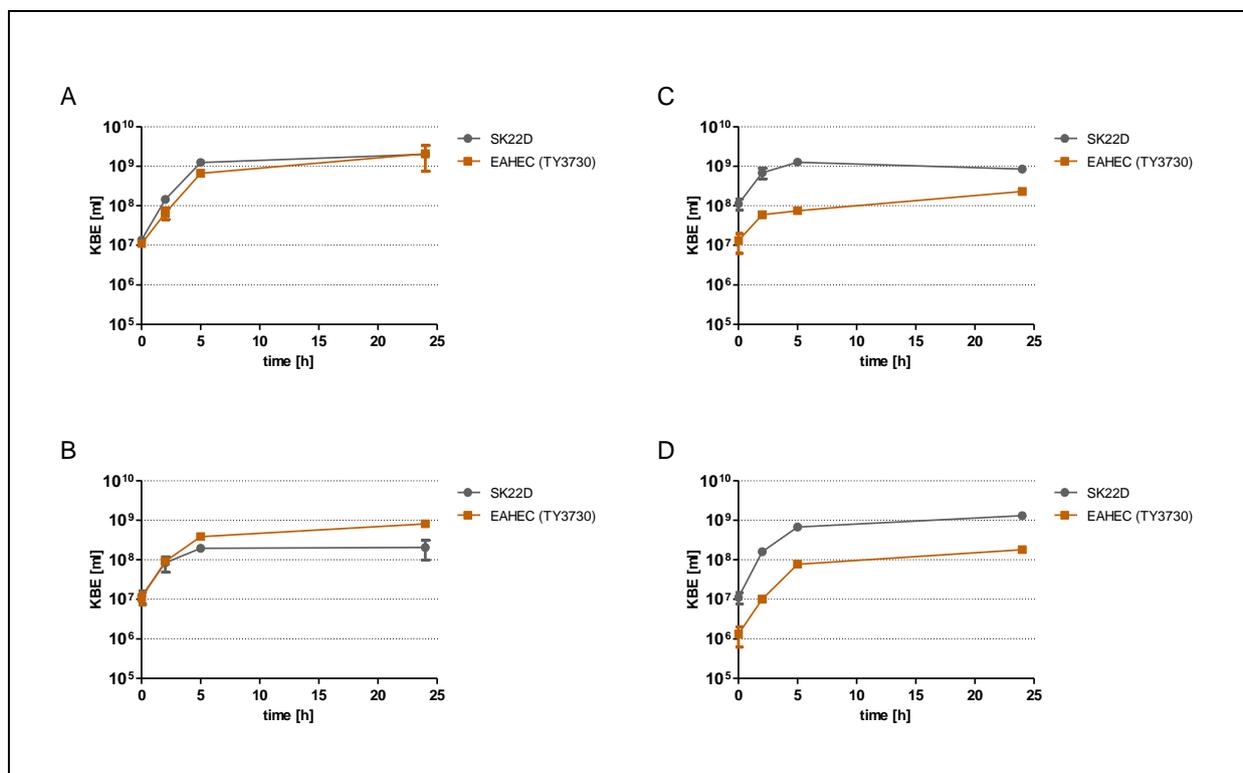


Abbildung 33: Wachstumskurven von SK22D (●) und EAHEC TY3730 (■) in Einzelkulturen oder als Co-Kultur

(A) SK22D und EAHEC TY3730 in Einzelkultur. (B) SK22D und EAHEC TY3730 in Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 (³). (C) SK22D und EAHEC TY3730 im Verhältnis von 10:1 (⁴). (D) SK22D und EAHEC TY3730 im Verhältnis von 10:1 (⁵). Die verwendeten Inokula werden in Tabelle 25 aufgeführt. Der Vorversuch wurde einmal als Doppelbestimmung durchgeführt. Wegen der geringen Anzahl an Werten wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

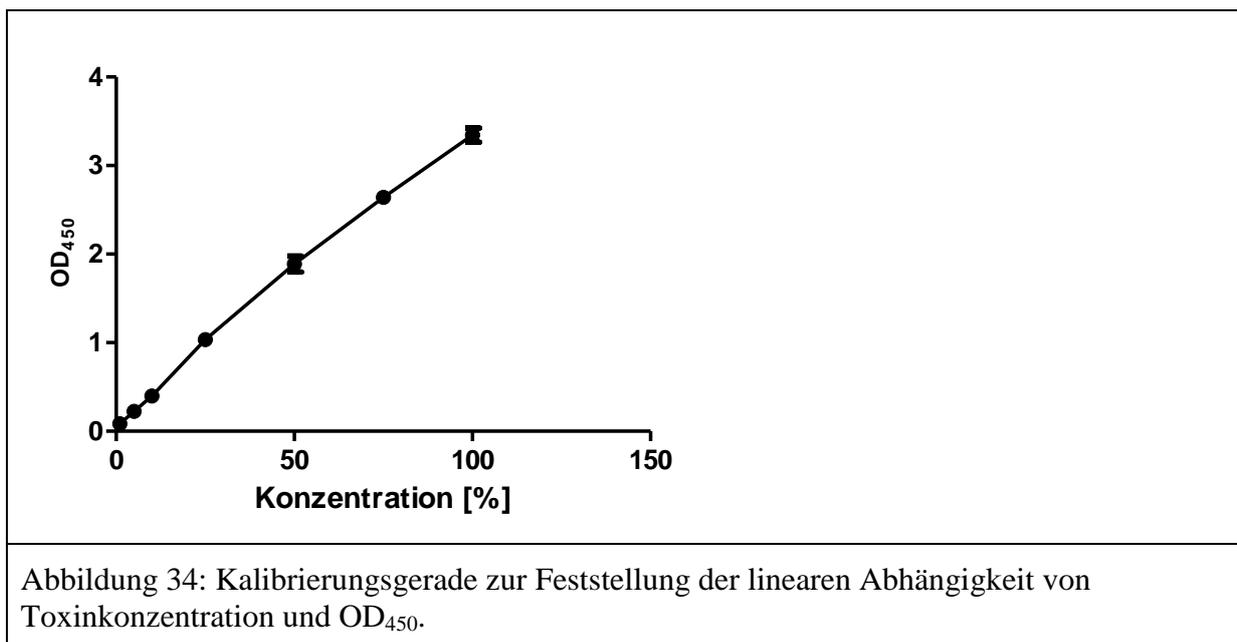
Das Wachstum von SK22D und EAHEC TY3730 in Einzelkultur war sehr ähnlich (Abbildung 33 A). Im Verhältnis von 1:1 zeigte sich ein nahezu unverändertes Wachstum von EAHEC TY3730 (Abbildung 33 B). Allerdings konnte eine Hemmung des Wachstums von SK22D beobachtet werden. Nach 24 Stunden Co-Inkubation änderte sich das Verhältnis von anfänglichen 1:1 auf 1:4 (SK22D:TY3730) zugunsten von EAHEC TY3730. Eine Co-

Inkubation im Verhältnis 10:1 hatte keinen Einfluss auf das Wachstum von EAHEC TY3730. Obwohl nicht die Lebendkeimzahlen der Einzelkulturen erreicht wurden, änderte sich das Verhältnis von SK22D:TY3730 kaum, bzw. zu Gunsten von EAHEC TY3730 (Abbildung 33 C; 10:1 → 3,7:1).

4.6 Quantifizierung der Shiga-Toxin-Produktion

4.6.1 Kalibrierungsgerade

Die Verwendung eines ELISA Kits zur Messung der Toxinmenge in den Proben war abhängig von einem direkten Zusammenhang zwischen der Toxinkonzentration und der im ELISA Test gemessenen OD_{450} . Um eine lineare Abhängigkeit der im ELISA gemessenen Werte sicherzustellen, wurde zuerst eine Kalibrierungsgerade angefertigt. Hierzu wurden Verdünnungen (1, 5, 10, 20, 50, 75 %) der im ELISA Kit mitgelieferten Positivkontrolle in H_2O hergestellt und der Test durchgeführt (siehe 3.7.2).



4.6.2 Shiga-Toxin Produktion in DMEM – Medium

Der wahrscheinlich wichtigste Virulenzfaktor von EHEC Stämmen ist das Shiga Toxin, welches im Wirtsorganismus massive Schäden hervorruft, die schließlich zum Tod führen können. Wir waren daher an den Auswirkungen einer Co-Inkubation von EcN und Shiga-Toxin-produzierenden Stämmen auf die Toxinproduktion interessiert. In dieser Arbeit wurden sowohl Stämme untersucht die Stx1 (O26:H11, O104:H4, O145:H25) bilden, als auch

Stämme die Stx2 (O103:H2, O111:H-) produzieren. Der EHEC Stamm EDL933 kann beide Toxinvarianten (Stx1/Stx2) produzieren. Zur Untersuchung des Einflusses der von EcN produzierten Mikroazine wurden Co-Kulturen mit der Mikroazin-negativen Mutante SK22D durchgeführt. Der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 diente als weitere Kontrolle der Versuche.

Zunächst wurde die Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium untersucht, da hier das Wachstum der Bakterienstämme in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN (SK22D) bereits untersucht wurde (siehe 4.4). Die Messung der Shiga Toxin Menge erfolgte mit dem RIDASCREEN® Verotoxin ELISA Kit (R-Biopharm) bei 450 nm. In jedem Versuch wurde eine im Kit mitgelieferte Positivkontrolle, eine Negativkontrolle mit Medium ohne Bakterien, eine Kontrolle der npEc Stämme (negativ) und eine Referenzkontrolle (Einzelkultur pEc) mitgeführt. Co-Kulturen wurden im Verhältnis 1:1 und 10:1 (siehe Tabelle 26) eingesetzt. Es wurde hier, soweit nicht anders angegeben, die Gesamtproduktion von Shiga Toxin nach 24 h Inkubation bei 37°C und 0 % CO₂ bestimmt.

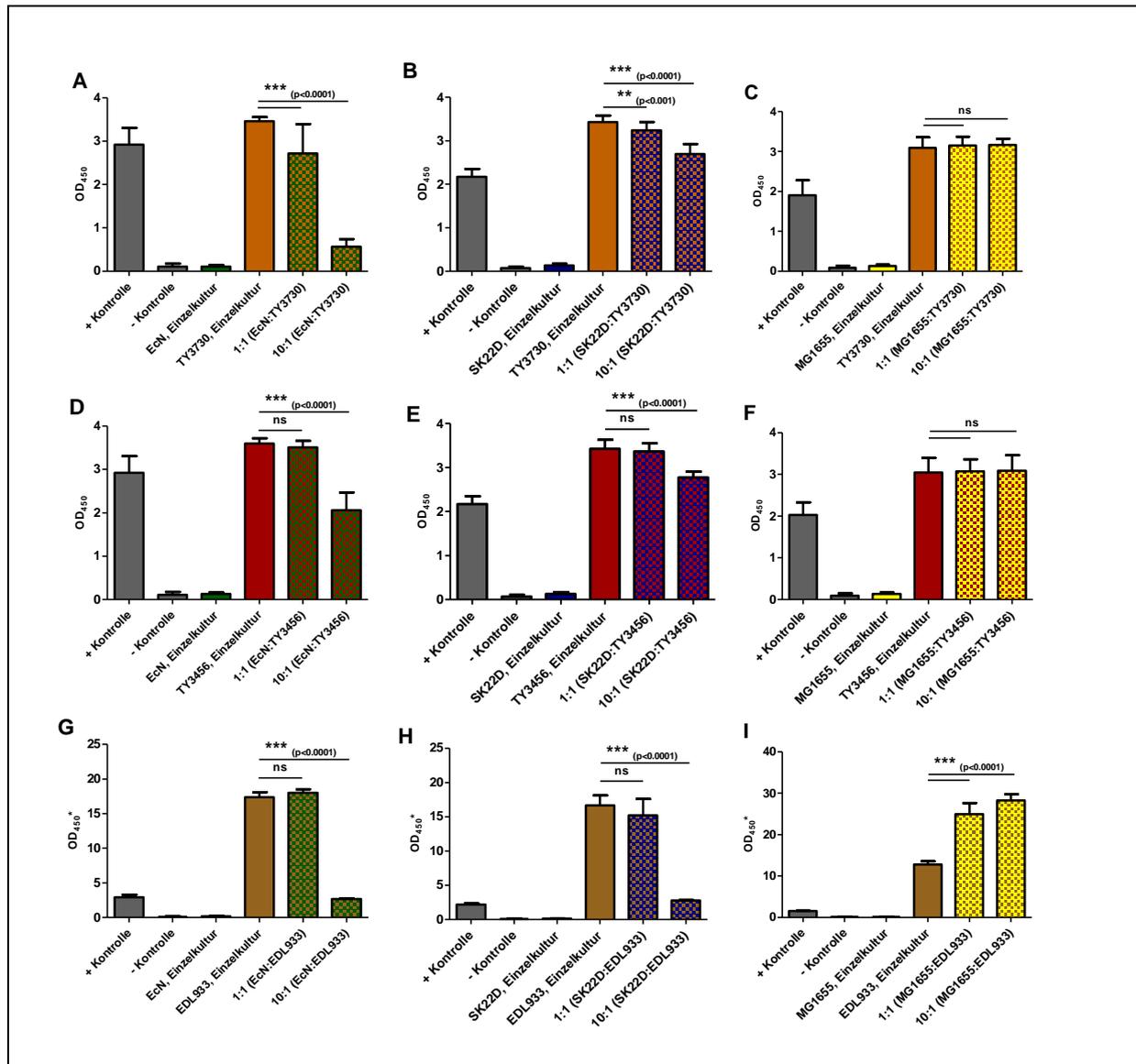


Abbildung 35: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion der EAHEC Stämme TY3730 und TY3456 und des EHEC Stammes EDL933 wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN, der Mikrozin-defizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 in DMEM-Medium bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung. (ns: nicht signifikant, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

(A) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit EcN (■). (B) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit SK22D (■). (C) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit MG1655 (■).

(D) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit EcN (■). (E) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit SK22D (■). (F) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit MG1655 (■).

(G) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit EcN (■). (H) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit SK22D (■). (I) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit MG1655 (■).

Bei Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3730 wurde eine Dosis-abhängige Reduktion der Stx2 Produktion in 24 h um 21 % (1:1) und 83 % (10:1), im Vergleich zur Einzelkultur (EK), festgestellt (Abbildung 35 A). Co-Inkubation mit SK22D resultierte in einer weniger ausgeprägten Reduktion der Stx2 Produktion um bis zu 21 % im Verhältnis von 10:1 (Abbildung 35 B). Eine Co-Inkubation mit MG1655 hatte keinen Einfluss auf die Stx2 Produktion von EAHEC TY3730 (Abbildung 35 C).

Die Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3456 zeigte nur im Verhältnis 10:1 eine signifikante Reduktion der Stx2 Produktion auf 58 % des Vergleichswertes (EK) (Abbildung 35 D). SK22D reduzierte die Shiga-Toxin Produktion im Verhältnis 10:1 auf 81 % (Abbildung 35 E). Eine Co-Inkubation mit MG1655 hatte keinen Einfluss auf die Stx2 Produktion von EAHEC TY3456 (Abbildung 35 F).

Die Co-Inkubation von EcN bzw. SK22D mit EDL933 im Verhältnis von 1:1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Stx1/2 Produktion von EHEC EDL933 (Abbildung 35 G und H). Eine Inkubation im Verhältnis 10:1 resultierte dagegen in einer sehr ähnlichen Reduktion auf 15 % (EcN) und 16 % (SK22D) der Toxinmenge in Einzelkultur (Abbildung 35 H). Co-Inkubation von EDL933 mit MG1655 führte zu einer unerwarteten, drastischen Dosis-abhängigen Erhöhung der Toxinmenge auf 195 % (1:1) und 221 % (10:1) des Referenzwertes (Abbildung 35 I).

Wurde EcN mit dem EHEC O26:H11 (1530/99) inkubiert, so wurde eine Dosis-abhängige Reduktion der Stx2 Produktion auf 51 % (1:1) und 12 % (10:1) beobachtet (Abbildung 36 A). Co-Inkubation im Verhältnis 1:1 und 10:1 mit SK22D erhöhte die Stx2 Produktion in 24 h leicht auf 119 % (1:1, 10:1) des Referenzwertes (Abbildung 36 B). MG1655 hatte keinen Einfluss auf die Shiga-Toxin Produktion.

Bei den Ergebnissen der Shiga-Toxin Mengenbestimmung (Stx1) von EHEC O103:H2 (5714/96) (Abbildung 36 D-F) fällt zunächst eine teils recht hohe Varianz der Werte sowohl in der Einzelkultur, als auch in Co-Kultur auf. EcN reduzierte die Stx1 Produktion im Verhältnis 10:1 in Co-Kultur mit EHEC O103:H2 um 80 %, nicht aber im Verhältnis 1:1. Eine Co-Inkubation mit SK22D oder MG1655 resultierten in einer Dosis-abhängigen Reduktion der Stx1 Produktion von EHEC O103:H2 (Abbildung 36 D-F).

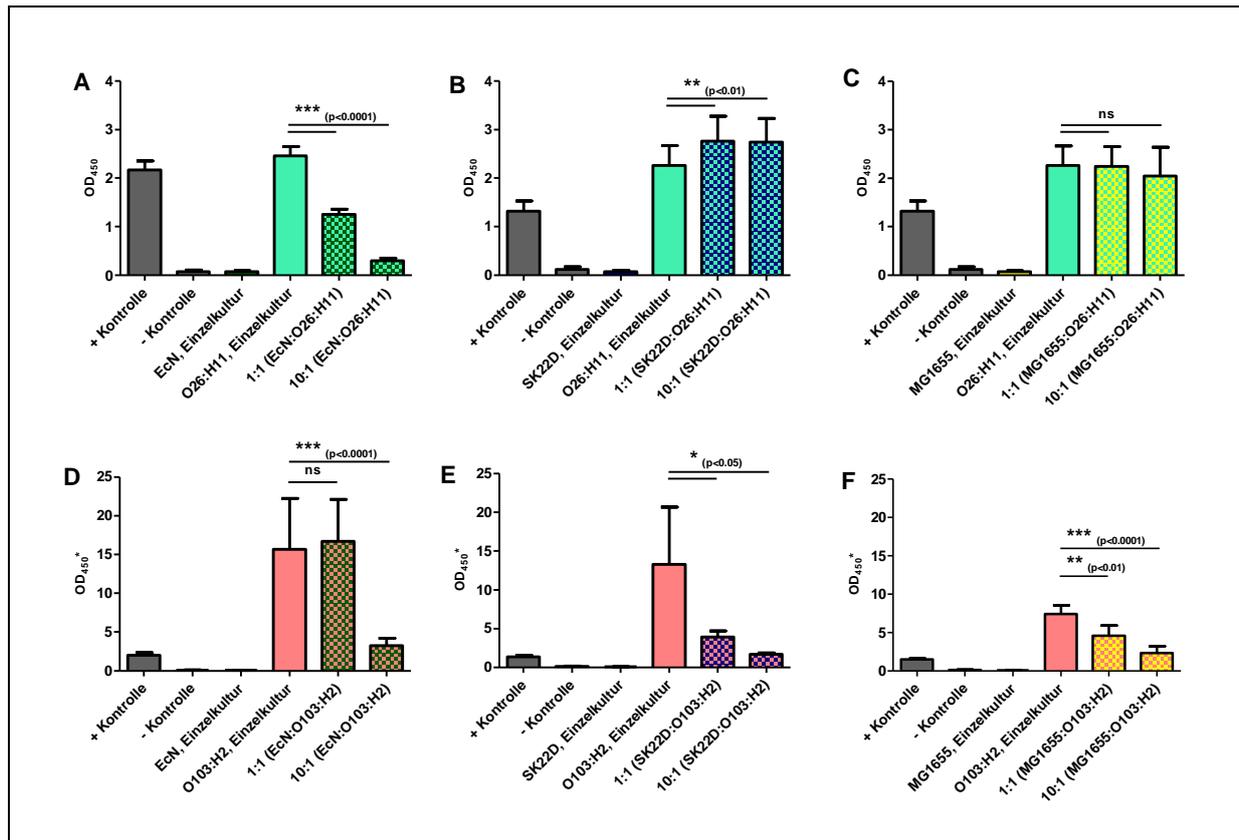


Abbildung 36: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion der EHEC Stämme des Serotypes O26:H11 und O103:H2 wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN, der Mikrozin-defizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 in DMEM-Medium bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung. (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$), OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

(A) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O26:H11 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit EcN (■). (B) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O26:H11 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit SK22D (■). (C) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O26:H11 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit MG1655 (■).

(D) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O103:H2 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit EcN (■). (E) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O103:H2 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit SK22D (■). (F) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O103:H2 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit MG1655 (■).

Die Stx1 Produktion von EHEC O111:H⁻ (1637/77) wurde von allen untersuchten Stämmen (EcN, SK22D, MG1655) abhängig von den eingesetzten Verhältnissen (1:1, 10:1) um bis zu 90 %, im Vergleich mit der Einzelkultur, gehemmt (Abbildung 37 A-C).

Die Co-Inkubation von EHEC O145:H25 (4392/97) mit EcN oder SK22D reduzierte die Produktion von Stx2 auf bis zu 12 % (EcN, 1:1) (Abbildung 37 D, E). Durch eine sehr hohe Varianz im Versuch mit MG1655 (Abbildung 37 F) kann keine qualifizierte Aussage über den

Einfluss auf die Stx2 Produktion getroffen werden. Eine Wiederholung der Versuche war durch einen Lieferstopp des DMEM Mediums (siehe 7.1) nicht möglich.

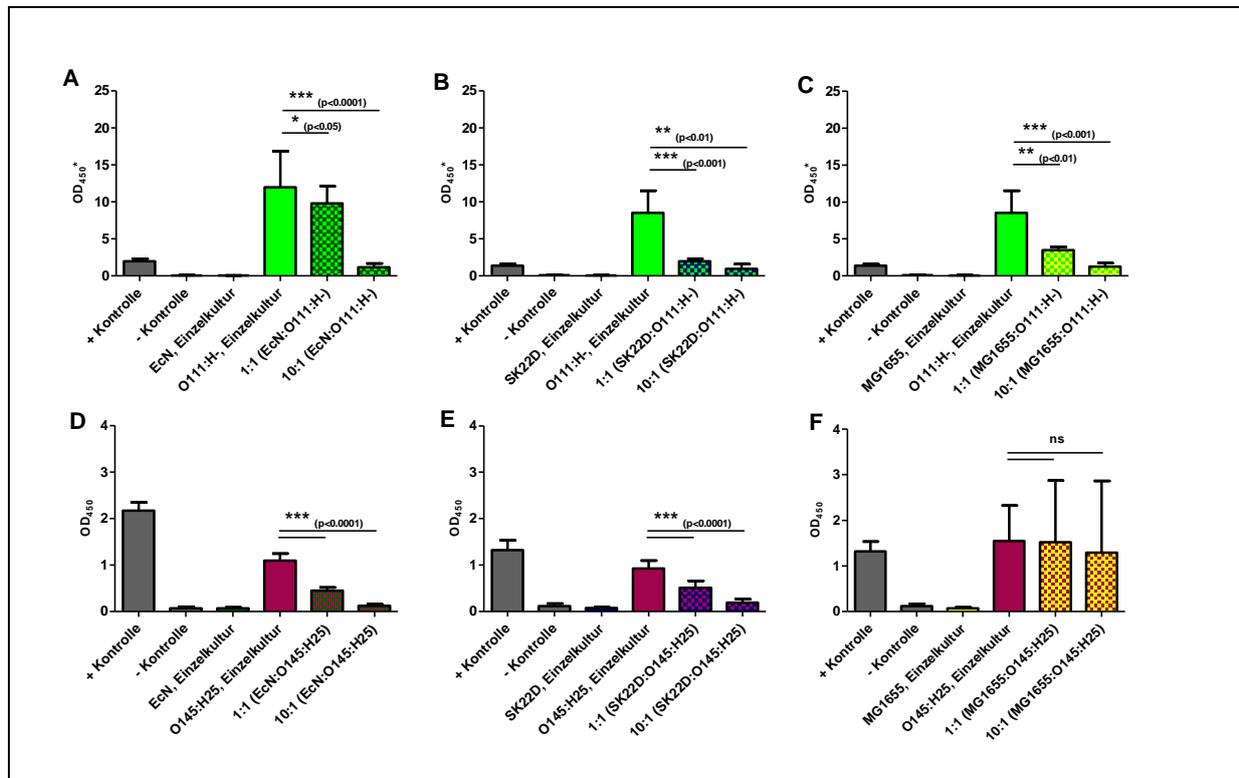


Abbildung 37: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion der EHEC Stämme des Serotypes O111:H⁷ und O145:H25 wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN, der Mikrozin-defizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 in DMEM-Medium bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$), OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

(A) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O111:H⁷ (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit EcN (■). (B) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O111:H⁷ (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit SK22D (■). (C) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O111:H⁷ (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit MG1655 (■).

(D) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O145:H25 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit EcN (■). (E) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O145:H25 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit SK22D (■). (F) Shiga-Toxin Produktion von EHEC O145:H25 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1⁽⁴⁾ mit MG1655 (■).

EcN reduzierte in allen getesteten EHEC/EAHEC Stämmen in Co-Kultur die Shiga-Toxin Produktion. Dies kann in manchen Fällen (TY3456, TY3730, O26:H11) teilweise auf die Produktion von Mikrozin zurückgeführt werden.

4.6.3 Shiga-Toxin Produktion in LB – Medium

Anschließend wurde die Shiga-Toxin Produktion in einem Standardmedium (LB), welches kein FBS enthielt, getestet. In jedem Versuch wurde wie bei 4.6.2 eine im Kit mitgelieferte Positivkontrolle, eine Negativkontrolle mit Medium ohne Bakterien, eine Kontrolle der npEc Stämme (negativ) und eine Referenzkontrolle (Einzelkultur pEc) mitgeführt. Co-Kulturen wurden im Verhältnis 1:1 und 10:1 ⁽⁴⁾ (siehe Tabelle 26) eingesetzt. Es wurde hier, soweit nicht anders angegeben, die Gesamtproduktion von Shiga Toxin nach 24 h Inkubation bei 37°C und 0 % CO₂ bestimmt.

Bei Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3730 in LB-Medium wurde eine Dosis-abhängige Reduktion der Stx2 Produktion in 24 h auf 73 % (1:1) und 23 % (10:1, ⁴), im Vergleich zur Einzelkultur (EK), festgestellt. Eine vergleichbare Reduktion der Stx2 Produktion war bei Co-Inkubation mit SK22D zu beobachten. (Abbildung 38 A, B).

Die Reduktion der Stx2 Produktion bei Co-Inkubation von EcN oder SK22D mit EAHEC TY3456 in LB-Medium war weniger ausgeprägt als bei TY3730. Es wurde hier eine maximale Reduktion von 40 % (10:1, SK22D) erzielt. Es konnten keine Unterschiede zwischen Co-Inkubation mit EcN oder SK22D festgestellt werden (Abbildung 38 C, D).

Auch bei Inkubation von EcN oder SK22D mit EHEC EDL933 in LB-Medium konnte kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der Stx1/2 Produktion zwischen EcN oder SK22D festgestellt werden. Im Verhältnis von 1:1 erfolgte eine Reduktion auf 76 %, im Verhältnis 10:1 ⁽⁴⁾ auf 10 % der Toxinmenge der Einzelkultur (Abbildung 38 E, F).

Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche mit DMEM-Medium und LB-Medium, so fällt auf, dass im Gegensatz zur Co-Inkubation mit DMEM-Medium bei Co-Inkubation mit LB-Medium keine Unterschiede zwischen Co-Kulturen mit EcN oder SK22D auftreten. Der im DMEM-Medium beobachtete Einfluss der Mikroazine auf die Stx Hemmung scheint im LB-Medium damit keine Rolle zu spielen. Die Reduktion der Shiga-Toxin Produktion ist in LB-Medium zudem ausgeprägter als in DMEM-Medium und schon bei 1:1 Verhältnissen signifikant.

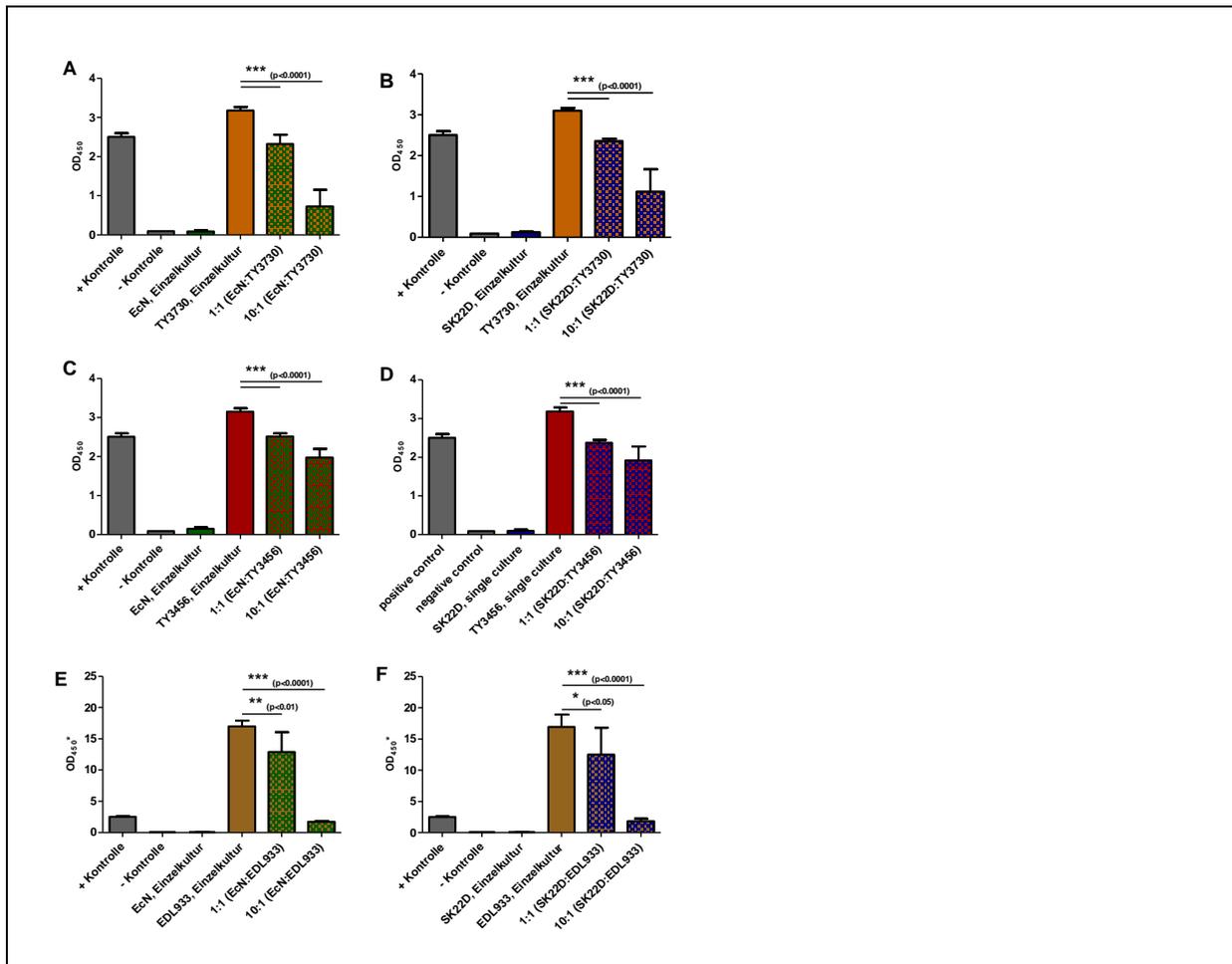


Abbildung 38: Shiga-Toxin Produktion in LB-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion der EAHEC Stämme TY3730 und TY3456 und des EHEC Stammes EDL933 wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN und der Mikrozin-defizienten EcN Mutante SK22D in LB-Medium bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$), OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

(A) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (d) mit EcN (■). (B) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (d) mit SK22D (■).

(C) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (d) mit EcN (■). (D) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (d) mit SK22D (■).

(E) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (d) mit EcN (■). (F) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (d) mit SK22D (■).

4.6.4 Shiga-Toxin Produktion in SCeM – Medium

Beim SCeM-Medium handelt es sich um ein Medium, welches die Umgebung des Kolons widerspiegeln soll. Dieses Medium wurde in Proteomanalysen von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 verwendet (Polzin et al., 2013). Ein wichtiger Bestandteil dieses Mediums sind unter anderem Gallensalze.

Bei Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3730 wurde eine Dosis-abhängige Reduktion der Stx2 Produktion in 24 h um 19 % (1:1) und 73 % (10:1, ⁴), im Vergleich zur Einzelkultur (EK), festgestellt. Dies ist vergleichbar mit den Werten, die mit DMEM-Medium oder LB-Medium erzielt wurden (siehe Abbildung 35 und Abbildung 38).

Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3456 resultierte in einem Abfall der Toxinmenge nach 24 h um 19 % (1:1) und 63 % (10:1, ⁴). Die Reduktion der Shiga-Toxin Produktion fiel hier höher aus als in LB- oder DMEM-Medium (Abbildung 39).

Die Shiga-Toxin Produktion von EHEC EDL933 in SCEM-Medium in Einzelkultur war im Vergleich mit der Einzelkultur in LB- und DMEM-Medium stark erhöht. Eine genaue qualitative Aussage über die Toxinmenge nach Verwendung unterschiedlicher ELISA Platten ist nicht möglich. In Anbetracht der relativ niedrigen Positivkontrolle und der niedrigen Varianz scheint dennoch eine Erhöhung der Shiga-Toxin Produktion im Vergleich mit LB- und DMEM-Medium um mindestens 60 % vorzuliegen. Ausgehend von der Einzelkultur reduzierte EcN in Co-Kultur mit EDL933 auch diese erhöhte Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium um 56 % (1:1) und 92 % (10:1, ⁴) (Abbildung 39).

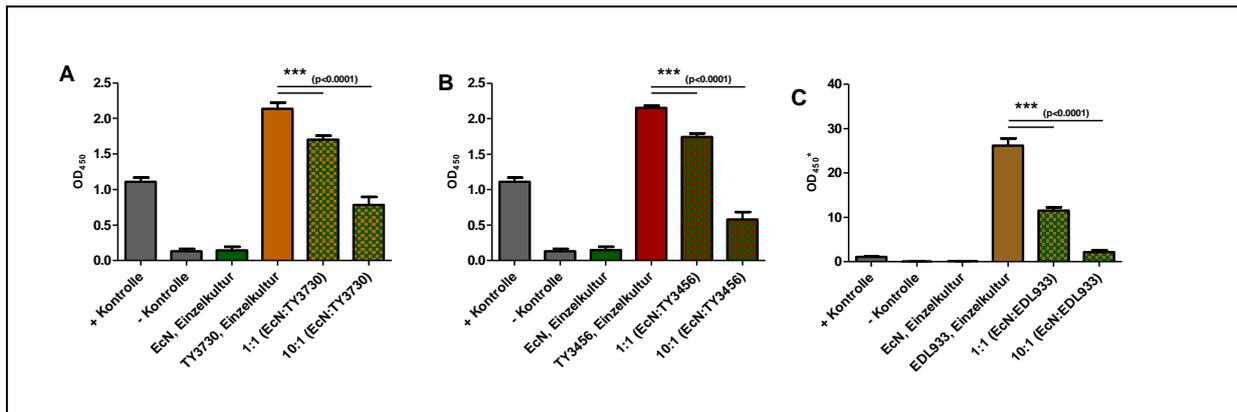


Abbildung 39: Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion der EAHEC Stämme TY3730 und TY3456 und des EHEC Stammes EDL933 wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN in SCEM-Medium bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung. (***) $p < 0,0001$, OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

(A) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit EcN (■). (B) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit EcN (■). (C) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (4) mit EcN (■).

4.6.5 Einfluss der Deletion von AI-2 auf die Shiga-Toxin Produktion in DMEM – Medium

Quorum sensing Systeme werden von *E. coli* benutzt, um Signale zwischen den Bakterien zu übertragen. Diese können unter anderem auch die Shiga Toxin Bildung beeinflussen (Sperandio et al., 2001). Hier sollte der Einfluss einer Deletion von AI-2 in EcN (EcN::*luxS*) (Jacobi et al., 2012) auf die Reduktion der Shiga Toxin Bildung von EAHEC untersucht werden. Als Medium wurde das Zellkulturmedium DMEM verwendet. In jedem Versuch wurde eine im Kit mitgelieferte Positivkontrolle, eine Negativkontrolle mit Medium ohne Bakterien, eine Kontrolle der npEc Stämme (negativ) und eine Referenzkontrolle (Einzelkultur pEc) mitgeführt. Co-Kulturen wurden im Verhältnis 1:1 und 10:1 (4) (siehe Tabelle 26) eingesetzt. Es wurde hier, soweit nicht anders angegeben, die Gesamtproduktion von Shiga Toxin nach 24 h Inkubation bei 37°C und 0 % CO₂ bestimmt.

Die statistische Auswertung der Daten der Co-Kultivierung mit EcN oder EcN::*luxS* und den EAHEC Isolaten TY3730 und TY3456 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Ergebnissen (Vergleich: Abbildung 35 und Abbildung 40). Eine Deletion von AI-2 in EcN hat somit keinen Einfluss auf die Reduktion der Shiga Toxin Produktion von EAHEC durch Co-Inkubation mit EcN.

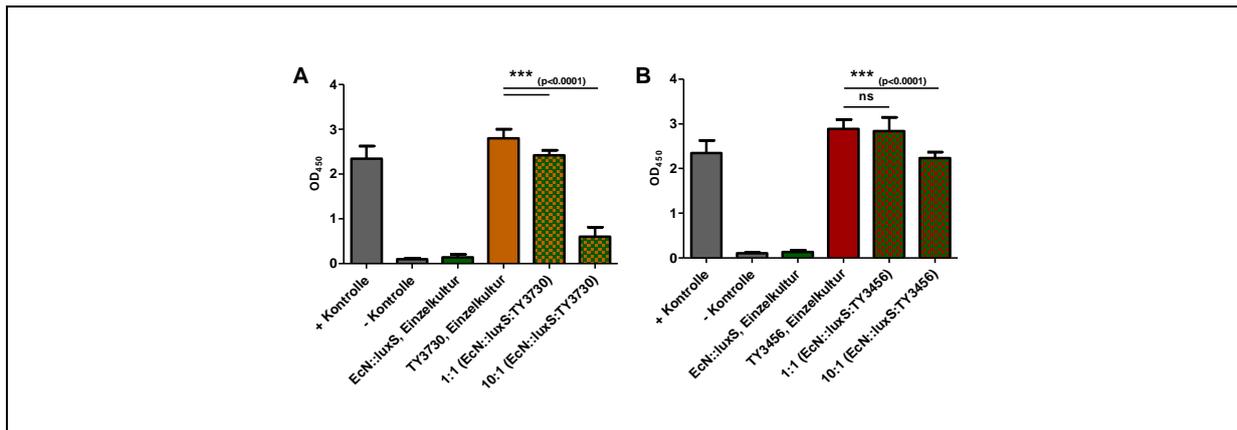


Abbildung 40: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium in Co-Kultur mit EcN::luxS

Die Shiga-Toxin Produktion der EAHEC Stämme TY3730 und TY3456 und des EHEC Stammes EDL933 wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN::luxS in DMEM-Medium bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung (ns: nicht signifikant, *** $p < 0,0001$)

(A) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (⁴) mit EcN (■). (B) Shiga-Toxin Produktion von TY3456 (■) in Einzelkultur und Co-Kultur (■) im Verhältnis von 1:1 und 10:1 (⁴) mit EcN (■).

4.6.6 Einfluss von Acetat auf die Shiga-Toxin Produktion in DMEM – Medium

2011 konnte in einer Publikation in Nature gezeigt werden, dass *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217 gegen eine Infektion durch *E. coli* O157:H7 (Stx2) schützen kann (Fukuda et al., 2011). Acetat soll hierbei für die Schutzwirkung verantwortlich sein. Uns interessierte daher, ob Acetat für die Reduktion der Shiga-Toxin Produktion in den Stämmen EDL933 und TY3730 durch EcN verantwortlich sein könnte. EcN produziert nach Inkubation in Standard-I Nährbouillon Acetat in der Konzentration von 1,41 mM (Quelle: Ardeypharm, persönliche Kommunikation). Da die Acetat-Konzentrationen in DMEM-Medium nach Inkubation mit EcN nicht bekannt sind, wurden die bei Fukuda angegebenen Acetat-Konzentrationen von 0, 2, 5 und 10 mM verwendet. Die Gesamtproduktion von Shiga Toxin nach 24 h Inkubation bei 37°C und 0 % CO₂ wurde bestimmt.

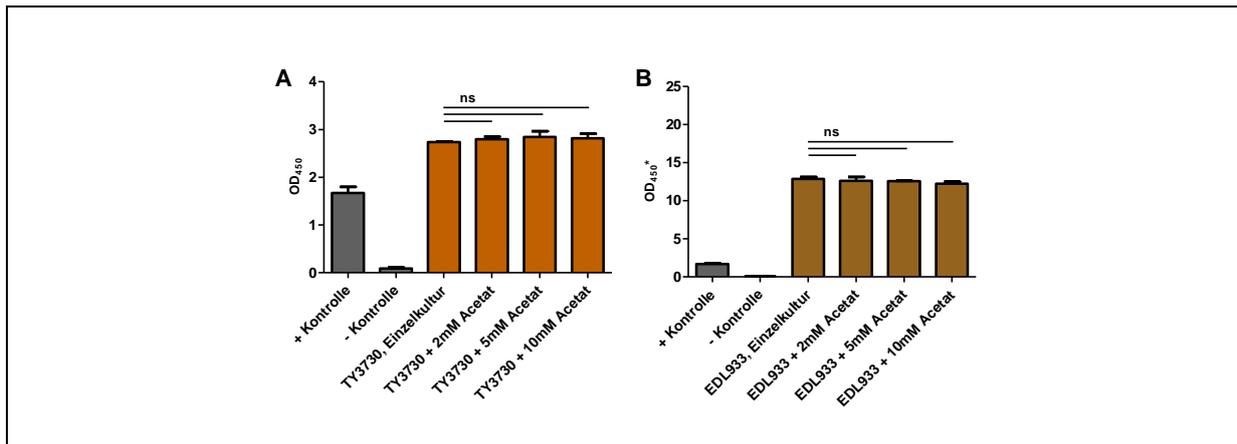


Abbildung 41: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium mit Acetat

Die Shiga-Toxin Produktion des EAHEC Stammes TY3730 und des EHEC Stammes EDL933 wurden in Einzelkultur mit unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen in DMEM-Medium bestimmt. Der Vorversuch wurde einmal als Vierfachansatz durchgeführt. OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt. (ns: nicht signifikant)

(A) Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur mit unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen. (B) Shiga-Toxin Produktion von EDL933 (■) in Einzelkultur mit unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Shiga-Toxin Produktion durch Zugabe von Acetat erzielt werden. Dies war sowohl mit TY3730, als auch mit EHEC EDL933 der Fall.

4.6.7 Einfluss von EcN auf die Sekretion von Shiga-Toxin in SCEM – Medium

Hier sollte der Einfluss einer Co-Kultivierung von EcN auf die Sekretion von Shiga-Toxin durch EAHEC TY3730 in SCEM-Medium untersucht werden. Dazu wurden Einzelkulturen von TY3730 und Co-Kulturen im Verhältnis 10:1 (siehe Tabelle 25) mit EcN (EcN:TY3730) für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Trennung von Zellsediment und Überstand erfolgte der Zellaufschluss durch Polymyxin-Behandlung. Der Versuch wurde dreimal unabhängig als Vierfachansatz durchgeführt.

Die Versuche zeigten, dass sich der Großteil des produzierten Shiga-Toxins im Zellüberstand befindet. Nur ca. 6 % des Shiga-Toxins konnte im Bakteriensediment nachgewiesen werden. Nach Co-Kultivierung mit EcN im Verhältnis 10:1 kam es nicht zu einer Anreicherung des Shiga-Toxins im Bakteriensediment. Die Shiga-Toxin Menge wurde sowohl im Überstand, als auch im Sediment nach Co-Kultivierung mit EcN in SCEM-Medium reduziert. Eine Hemmung des Verotoxin ELISA durch Polymyxin konnte zudem nicht beobachtet werden.

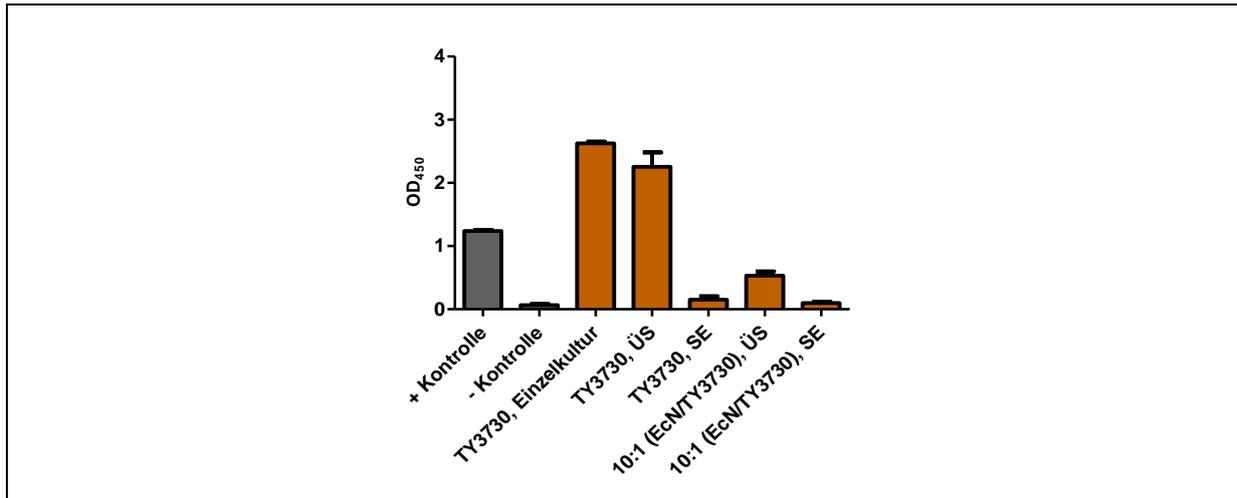


Abbildung 42: Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion des EAHEC Stammes TY3730 wurde in Einzelkultur (■) in SCEM-Medium bestimmt. Shiga-Toxin Menge in Überstand (ÜS) und Bakteriensediment (SE) wurde bestimmt. Der Versuch wurde dreimal als Vierfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung.

4.6.8 Shiga-Toxin Produktion nach Induktion durch Mitomycin C in SCEM – Medium

Mitomycin C wird benutzt, um über die SOS-Antwort die Shiga-Toxin Produktion zu induzieren. Die Fragestellung war, ob Co-Kultivierung mit EcN auch die Produktion von Shiga-Toxin nach Induktion mit Mitomycin C reduzieren kann. Dazu wurden Einzelkulturen von TY3730 und Co-Kulturen im Verhältnis 10:1 (siehe Tabelle 25) mit EcN (EcN:TY3730) für 24 h bei 37°C inkubiert. Induktion mit 2 µg/ml Mitomycin C erfolgte zum Zeitpunkt t=0h, t=2h und t=5h. Die nicht induzierte Einzelkultur von TY3730 diente als Referenzwert. Die Co-Kulturen wurden vor der Induktion hergestellt. Die Versuche wurden dreimal als Vierfachansatz durchgeführt.

Induktion der TY3730 Einzelkultur zum Zeitpunkt t=0h resultierte in einer Erhöhung der Shiga-Toxin Produktion auf 380 % der nicht induzierten Einzelkultur (Abbildung 43). Die nun folgenden Vergleiche verweisen auf die induzierte Einzelkultur von TY3730.

Bei Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3730 wurde eine Reduktion der Stx2 Produktion nach 24 h und einer Induktion bei t=0h um 45 % (10:1) festgestellt (Abbildung 43). Induktion der Co-Kultur nach 2 h Wachstum resultierte in einer Hemmung der Toxinproduktion um 76 %. Eine Induktion mit Mitomycin C nach 5 h Wachstum führte zu einer Reduktion der Shiga-Toxin Produktion um 86 % und lag damit sogar bei 53 % der nicht induzierten Einzelkultur.

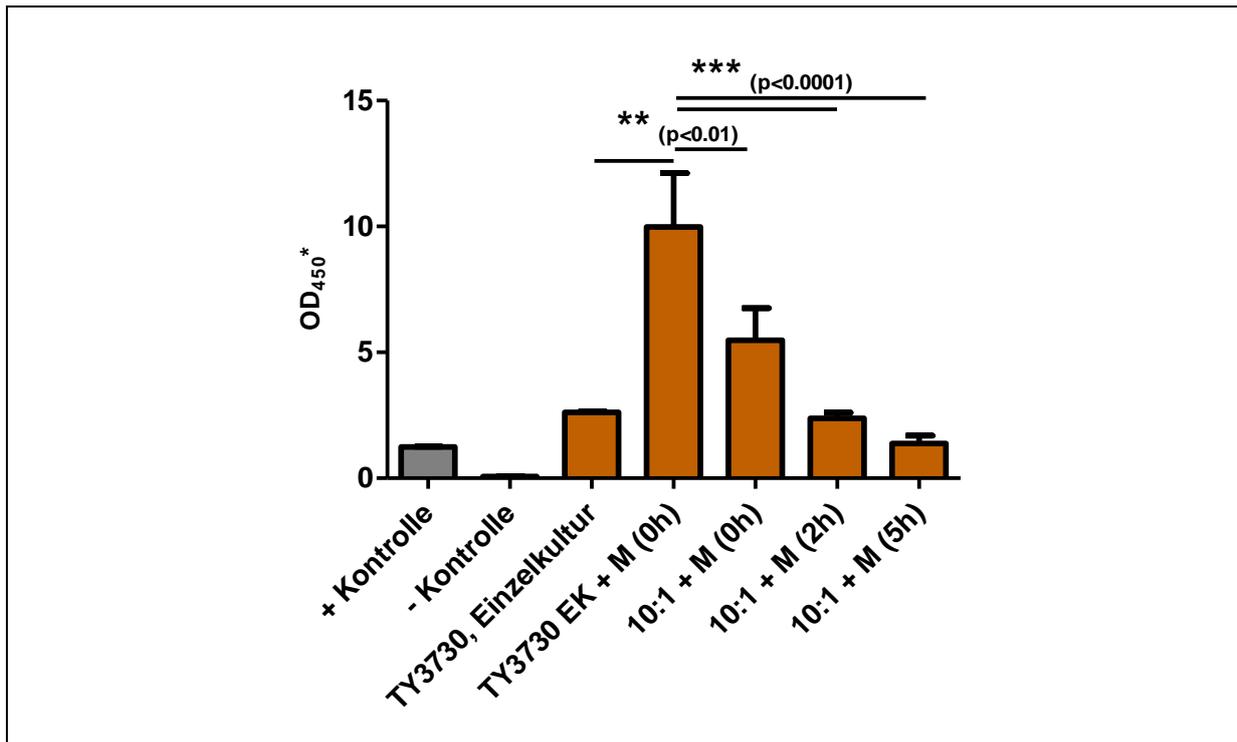


Abbildung 43: Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium mit und ohne Mitomycin C

Die Shiga-Toxin Produktion des EAHEC Stammes TY3730 wurde in Einzelkultur mit SCEM-Medium bestimmt. Nach 0, 2 und 5 h wurde die Shiga-Toxin Produktion durch Mitomycin C in Einzelkultur (EK) von TY3730 oder als Co-Kultur im Verhältnis 10:1 (4) induziert. Der Versuch wurde dreimal als Vierfachansatz durchgeführt. Shiga-Toxin Produktion von TY3730 (■) in Einzelkultur. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$), OD₄₅₀*: Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

Eine Co-Kultur mit EcN hemmt somit nicht nur die Shiga-Toxin Produktion in nicht-induzierten EAHEC Bakterien, sondern auch in mit Mitomycin C induzierten Bakterien. Hierbei ist vor allem die Abhängigkeit vom Induktionszeitpunkt hervorzuheben.

4.6.9 Bestimmung der Stx Produktion durch Verwendung von lumineszenten Reporter Stämmen

Das C-P Reporter System ermöglicht eine Beobachtung der Shiga-Toxin Expression in Echtzeit. Hierbei ist zu beachten, dass in diesem System DMEM mit 50 µg/ml Ampicillin verwendet wurde. Dies führt in den Bakterien bereits zu einer Induktion der Shiga-Toxin Produktion und somit sind die Ergebnisse nicht mehr direkt mit den Ergebnissen der Verotoxin ELISAs (siehe Abbildung 35) vergleichbar. Gemessen wurden in der Maßeinheit der Lumineszenzmessung 'counts per second' (CPS).

Die Expression von Shiga-Toxin 1 im E1 Expressionssystem (siehe 3.7.4.1) zeigt in Einzelkultur nach 5,5 h ein Maximum von etwa 14.000 CPS. Die CPSs fallen danach rapide

ab und erreichen bei 12 h ein Minimum von 550 CPS. Anschließend erfolgt ein leichter Anstieg, welcher in ein Plateau von 2700 CPS nach 18 h mündet, was bis zum Ende der 24 h Messung beibehalten wird (Abbildung 44).

Die Co-Kultur von EcN und E1 im Verhältnis von 1:1 resultiert in einem Maximum von 600 CPS nach 3,5 h (siehe Abbildung 44). Die CPS fallen danach ab und erreichen nach 5 h Werte, die im Bereich der Negativkontrolle liegen. Im Vergleich mit der Einzelkultur kommt es im Verhältnis 1:1 zu einer drastischen Reduzierung der Stx1 Expression in den 24 h der Messung.

Die Co-Kultur von SK22D und E1 im Verhältnis von 1:1 ergibt mit der EcN Co-Kultur vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 44). Allerdings zeigt sich im Abschnitt von 8 – 14 h ein leichtes Plateau von 300 CPS, was nach 14 h wieder verschwindet.

Die Co-Kultur von MG1655 und E1 im Verhältnis von 1:1 ergibt einen mit der Einzelkultur vergleichbaren Kurvenverlauf. Das Maximum bei 5,5 h ist mit 9800 CPS etwas niedriger als bei der Einzelkultur und das Plateau (2700 CPS) bildet sich bereits bei 12 h – 16 h aus. Danach fallen die CPS wieder auf 900 CPS (24h) ab (siehe Abbildung 44).

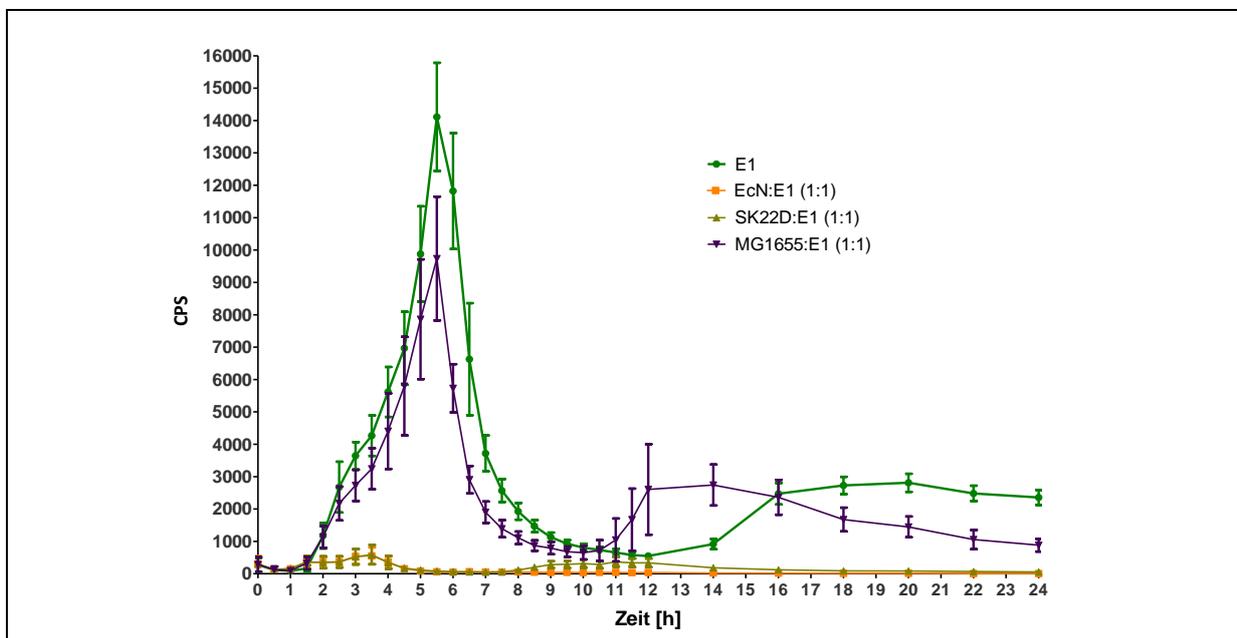


Abbildung 44: Expression von Shiga-Toxin 1 im E1 C-P Expressionssystem (EK + 1:1)

Die Shiga-Toxin Expression des E1 C-P Expressionssystems in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN, der Mikrozin-defizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 im Verhältnis 1:1 in DMEM-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde über 24 h bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Achtfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. (CPS = Counts per second; Maßeinheit zur Lumineszenzmessung)

Die Co-Kultivierung von E1 mit EcN oder SK22D im Verhältnis 10:1 ⁽⁴⁾ resultiert in einem drastischen Abfall von 270 CPS (0h) auf das Niveau der Negativkontrolle (0-20 CPS) und ändert sich während der nächsten 24 h kaum merklich. Bei Co-Kultivierung mit MG1655 kommt es zu einem Maximum nach 4,5 h bei 3.800 CPS. Der Kurvenverlauf ähnelt der Einzelkultur mit einem zweiten Maximum (12h, 1.400 CPS) und anschließendem Abfall der CPS auf 280 CPS nach 24 h (siehe Abbildung 45).

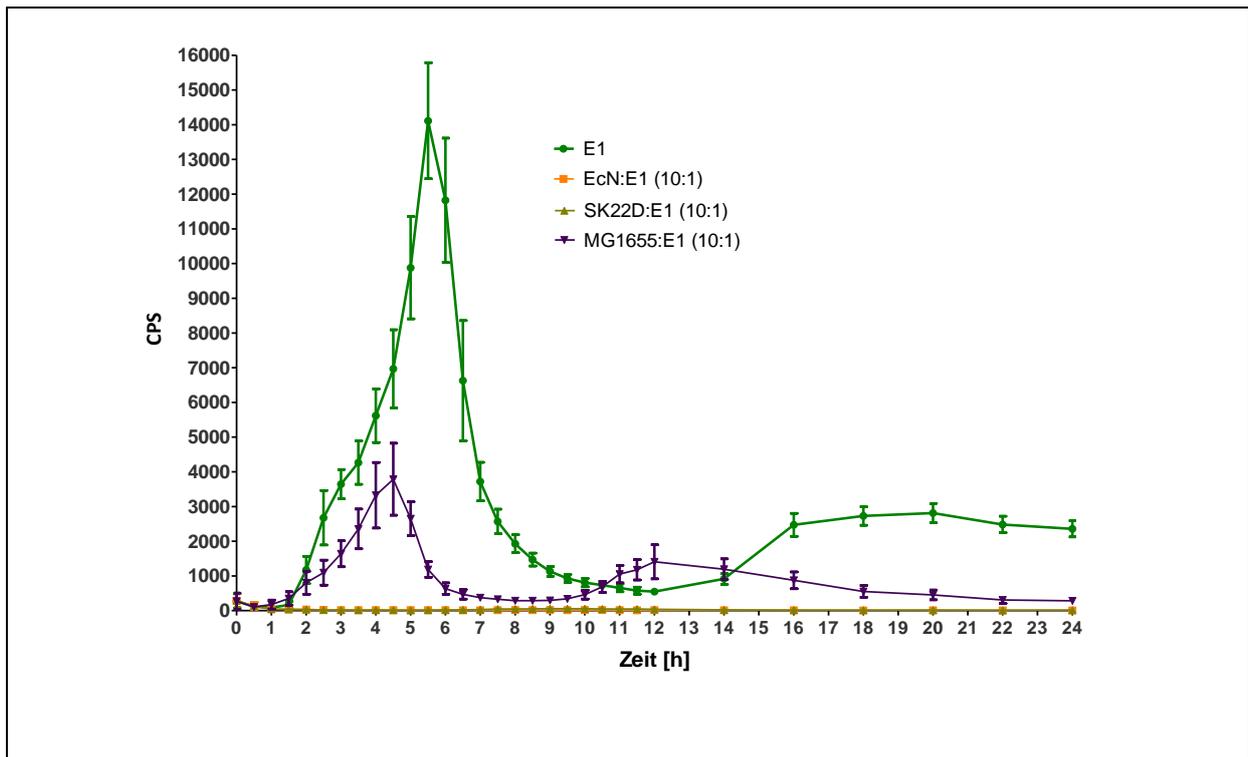


Abbildung 45: Expression von Shiga-Toxin 1 im E1 C-P Expressionssystem (EK + 10:1)

Die Shiga-Toxin Expression des E1 C-P Expressionssystems in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN, der Mikrozin-defizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 im Verhältnis 10:1 in DMEM-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde über 24 h bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Achtfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. (CPS = Counts per second; Maßeinheit der Lumineszenzmessung)

Die Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 Expressionssystem zeigt in Einzelkultur nach 9,0 h ein Maximum von etwa 85.000 CPS. Die CPS fallen danach rapide ab und erreichen bei 14 h ein Minimum von 37.000 CPS. Anschließend erfolgt ein erneuter Anstieg auf 69.000 CPS nach 16 h. Die CPS fielen dann wiederum auf 16.000 CPS (24h) ab (siehe Abbildung 46).

In Co-Kultur fällt zunächst auf, dass die Werte sehr viel niedriger ausfallen als in Einzelkultur. Der Kurvenverlauf mit Maximum, Minimum und zweitem Maximum in Co-Kultur und Einzelkultur ist vergleichbar. Co-Kultivierung mit EcN und E2 im Verhältnis 1:1 resultiert in einem Maximum von 450 CPS nach 3 h, einer Reduzierung der CPS auf etwa 50

CPS nach 6 h und einem anschließenden langsamen graduellen Abfall der CPS auf 10 CPS, was bereits im Bereich der Negativkontrolle (0-20 CPS) liegt (Abbildung 47). Die Kurvenverläufe nach Co-Kultivierung mit SK22D und MG1655 im Verhältnis 1:1 mit E2 fallen sehr ähnlich aus. Die Maxima liegen etwas höher bei 560 CPS (3,5h) für SK22D und bei 820 CPS (4h) für MG1655 (siehe Abbildung 47).

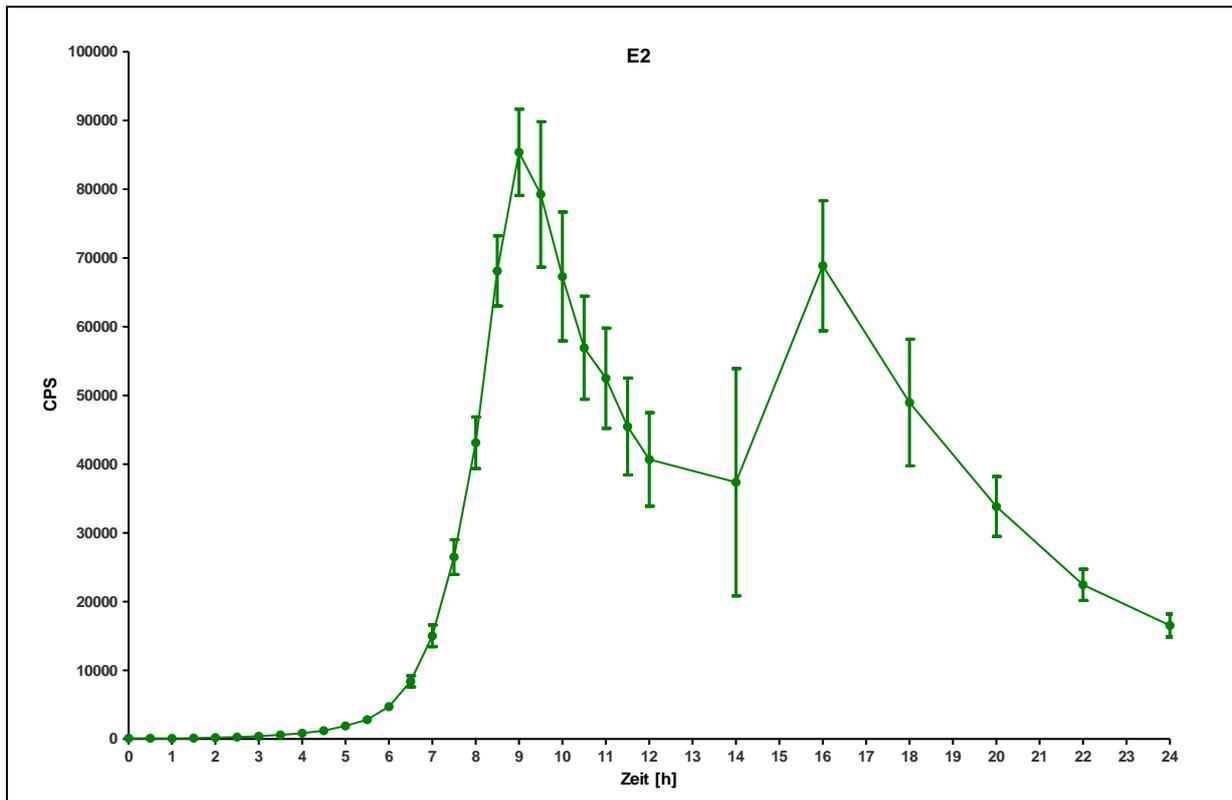


Abbildung 46: Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 C-P Expressionssystem (EK)

Die Shiga-Toxin Expression des E2 C-P Expressionssystems in Einzelkultur in DMEM-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde über 24 h bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Ansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Achtfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. (CPS = Counts per second; Maßeinheit der Lumineszenzmessung)

Der Kurvenverlauf ist auch im Verhältnis 10:1 (⁴) npEc (EcN, SK22D, MG1655) zu E2 sehr ähnlich dem Verlauf der Kurven im Verhältnis 1:1. Maxima liegen bei 220 CPS (EcN, 2h), 260 CPS (SK22D, 2h) und 600 CPS (MG1655, 4h) und damit nochmal deutlich unter den Maxima im Verhältnis 1:1.

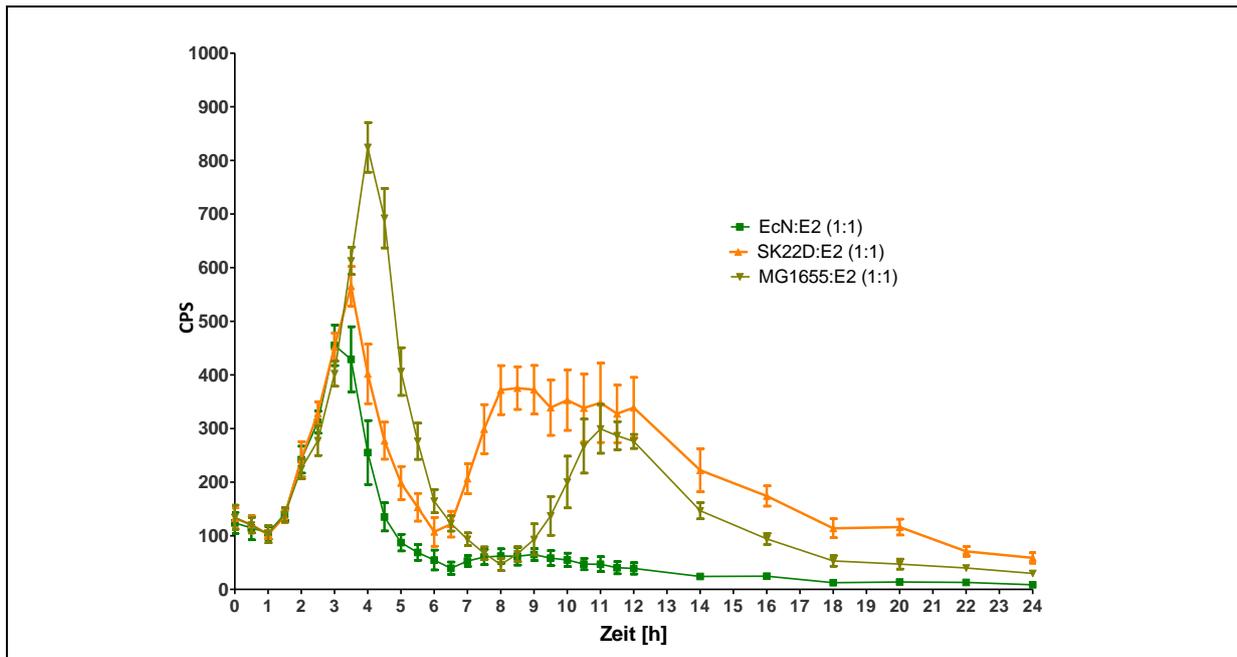


Abbildung 47: Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 C-P Expressionssystem (1:1)

Die Shiga-Toxin Expression des E2 C-P Expressionssystems in Co-Kultur mit EcN, der Mikrozindefizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 im Verhältnis 1:1 in DMEM-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde über 24 h bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Achtfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. (CPS = Counts per second; Maßeinheit der Lumineszenzmessung)

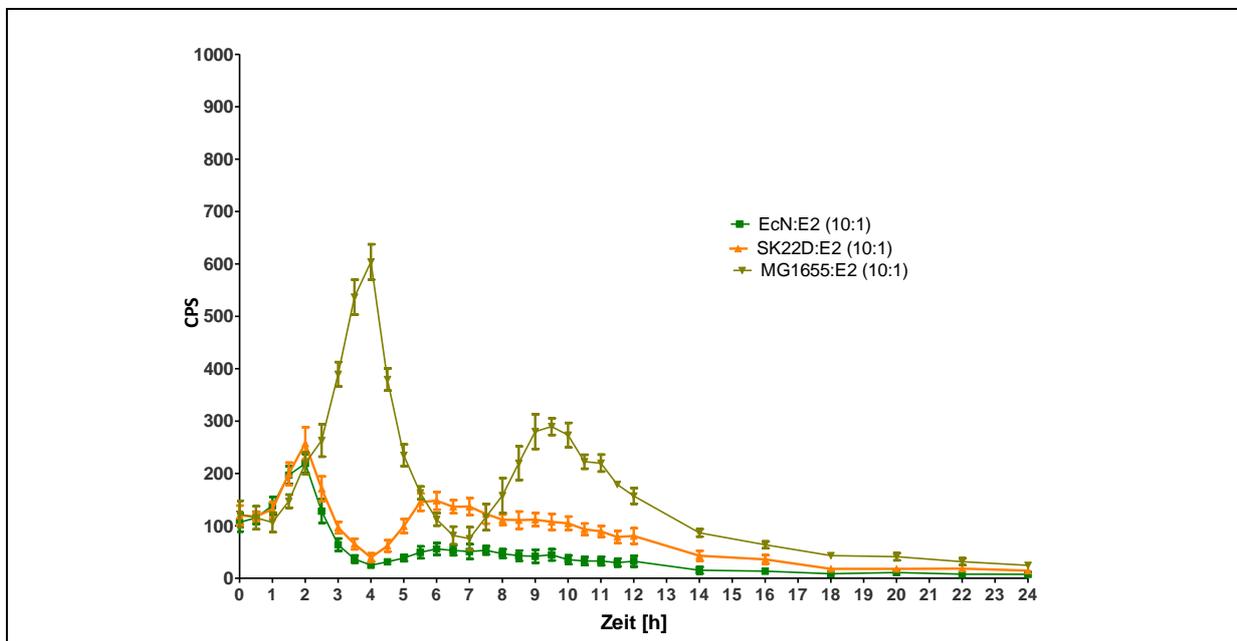


Abbildung 48: Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 C-P Expressionssystem (10:1)

Die Shiga-Toxin Expression des E2 C-P Expressionssystems in Co-Kultur mit EcN, der Mikrozindefizienten EcN Mutante SK22D und MG1655 im Verhältnis 10:1 in DMEM-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde über 24 h bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden dreimal unabhängig als Achtfachansatz durchgeführt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung. (CPS = Counts per second; Maßeinheit der Lumineszenzmessung)

Im Vergleich zur Einzelkultur sind alle Kurvenverläufe in Co-Kulturen im E2 Expressionssystem sehr viel niedriger. Dennoch können feine Unterschiede zwischen den Co-Kulturen mit EcN, SK22D oder MG1655 festgestellt werden, sodass eine Reduktion der *stx* Expression mit EcN oder SK22D deutlich stärker war als mit MG1655.

4.6.10 Shiga-Toxin ELISAs von biolumineszenten Reporter Stämmen

Die biolumineszenten Reporter Stämme werden in den C-P Reporterversuchen durch die Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin induziert. Hier sollte geklärt werden, welche Auswirkungen das Antibiotikum auf die Stx Produktion in den C-P Systemen E1 (Stx1) und E2 (Stx2) hat. Des Weiteren sollten die Auswirkungen der Deletion der Lyse-Gene in E2 untersucht werden. Dazu wurde der Verlauf der Stx Produktion durch Verotoxin ELISAs bestimmt. Zusätzlich wurden die Effekte der Co-Kultivierung von E1 oder E2 mit EcN untersucht. Die Versuche hierzu wurden einmal als Vierfachansatz durchgeführt. Eine Wiederholung der Versuche war durch einen Lieferstopp des DMEM Mediums (siehe 7.1) nicht möglich.

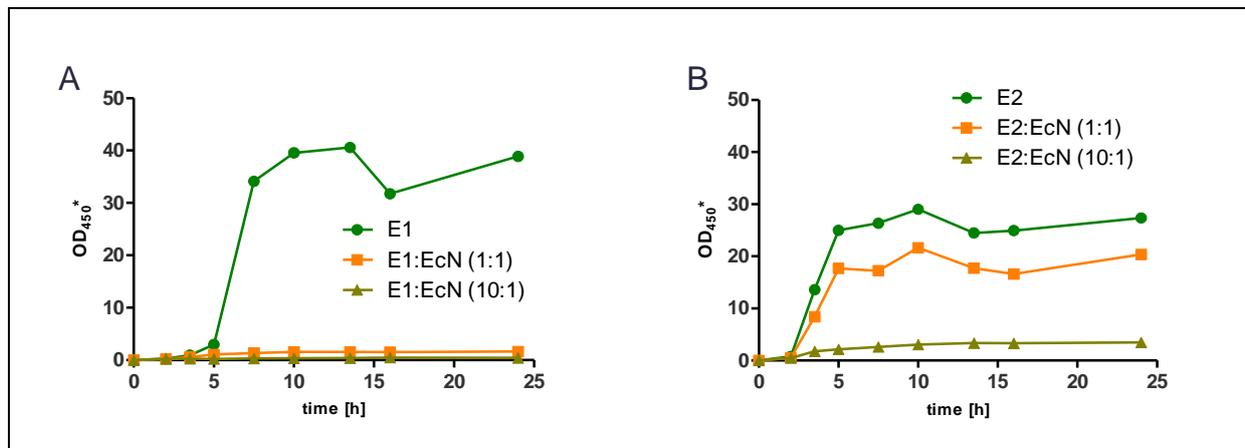


Abbildung 49: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium

Die Shiga-Toxin Produktion der EHEC EDL933 C-P Expressionssysteme E1 (A) und E2 (B) wurden in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN in DMEM-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin mit Stx ELISA bestimmt. Es wurden die in Tabelle 26 beschriebenen Co-Kulturansätze verwendet. Die Versuche wurden einmal als Vierfachansatz durchgeführt. OD_{450}^* : Proben wurden vor Messung 1:10 verdünnt.

In Einzelkultur zeigt sich eine erheblich höhere Stx Produktion mit E1 und E2 im Vergleich zum Elternstamm EDL933 (siehe Abbildung 35), was die Induktion durch Ampicillin bestätigt. Des Weiteren zeigte sich ein Unterschied in der Stx Produktion zwischen E1 und E2. E2 produzierte nur etwa 70 % der Shiga-Toxin Menge von E1 nach 24 h, was mit der Deletion der Lyse-Gene zusammenhängen könnte (Abbildung 49).

Die Co-Kultur von EcN und E1 zeigte eine drastische Reduzierung der Shiga-Toxin Menge auf 1 % (10:1) ⁽⁴⁾ der Einzelkultur. Die Co-Kultur von EcN und E2 zeigt einen weniger ausgeprägten Abfall der Shiga-Toxin Menge nach 24 h. Hier wurde eine EcN-Dosisabhängige Reduzierung von Stx1/2 um 26 % (1:1) und 87 % (10:1) ⁽⁴⁾ festgestellt (Abbildung 49 B).

4.7 Versuche mit Shiga Toxin Phagen

4.7.1 Ergebnisse der *stx*-PCR

Die *stx1* und *stx2* Gene von isolierten Shiga Toxin Phagen oder im Wirts-Chromsomen inserierten Phagen wurden durch *stx*-PCR nachgewiesen. Der Nachweis von *stx1* erfolgt mit den Primern KS7 und KS (Zhang et al., 2002). Für *stx2* wurden die Primer LP43 und LP44 verwendet (Bielaszewska et al., 2011).

Tabelle 36: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von *stx2*.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
Template	1 µl	Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
2x Taq PCR Master Mix	12,5 µl	Denaturierung	94°C	60 s	30
LP43 (10 pmol/ µl)	1 µl	Annealing	57°C	60 s	
LP44 (10 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	60 s	
dH ₂ O	ad 25 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1

Die erwartete Größe der amplifizierten PCR-Produkte bei *stx2*-PCR lag bei 584 bp, was den Banden im Agarosegel entsprach.

Tabelle 37: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von *stx1*.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
Template	1 µl	Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
2x Taq PCR Master Mix	12,5 µl	Denaturierung	94°C	60 s	30
KS7 (10 pmol/ µl)	1 µl	Annealing	58°C	60 s	
KS8 (10 pmol/ µl)	1 µl	Elongation	72°C	60 s	
dH ₂ O	ad 25 µl	Finale Elongation	72°C	10 min	1

Die erwartete Größe der amplifizierten PCR-Produkte bei *stx1*-PCR lag bei 283 bp, was den Banden im Agarosegel entsprach.

Als erste Positivkontrolle diente der Bakterienstamm, aus dem die jeweiligen Phagen isoliert wurden. Dazu wurden 100 µl ÜNK aufgekocht (100°C, 10 min) und 1 µl als Template verwendet. Als zweite Positivkontrolle wurde 1 µl des jeweiligen Phagenisolates (siehe 3.8.1) verwendet. Die Negativkontrolle enthielt als Template 1 µl dH₂O.

Zur Herstellung der Templates der Proben wurden zunächst Phagen-Plaque-Agarplatten (siehe 3.8.2) hergestellt. Hierzu wurden die Bakterienstämme EcN, MG1655, HB101 und DH5α mit Phagen infiziert. Von den Agarplatten mit infizierten Bakterien wurde mit Impfösen ein Abstrich abgenommen, in 1 ml dH₂O resuspendiert und dreimal mit dH₂O gewaschen. Die Proben wurden anschließend aufgekocht (100°C, 10 min) und 1 µl als Template für die PCR verwendet. Der *E. coli* Stamm EDL933 enthält sowohl Gene für Stx1, als auch Gene für Stx2 in seinem Chromosom. Hier wurden beide *stx*-PCRs (siehe Tabelle 36 und Tabelle 37) durchgeführt.

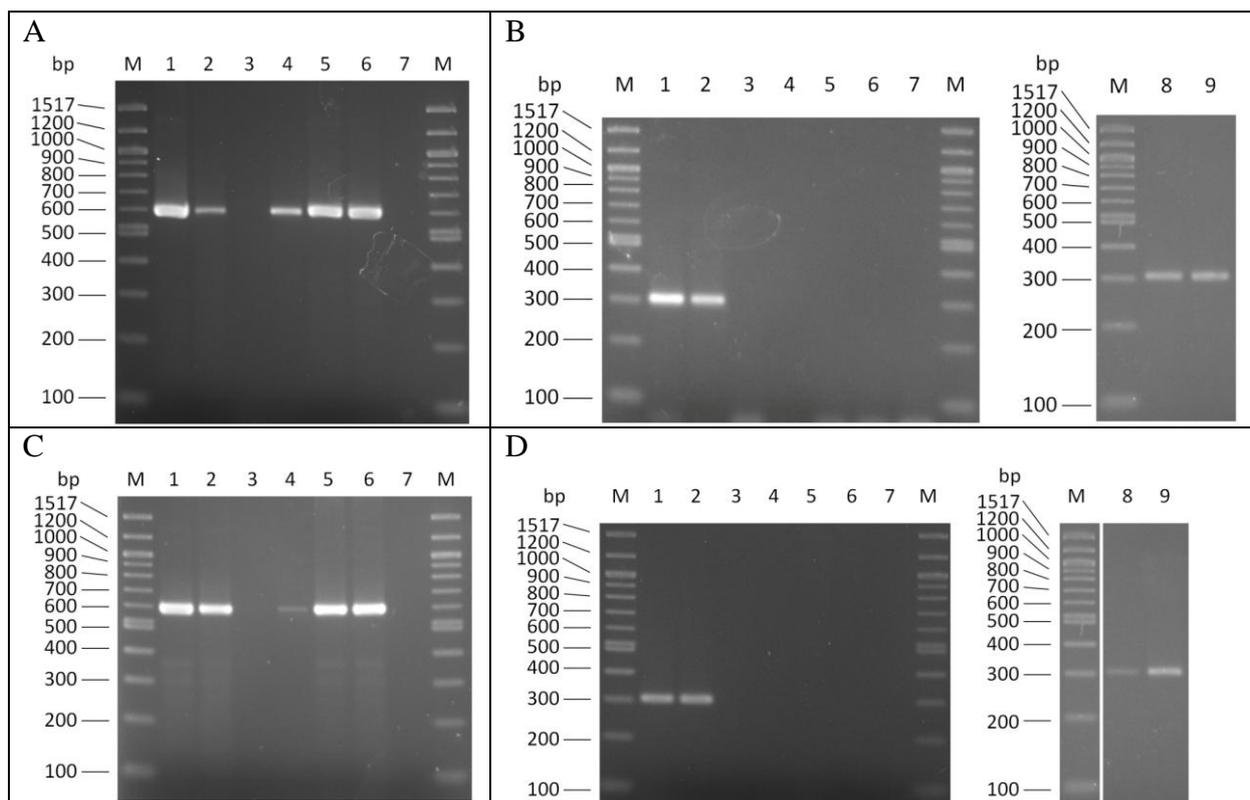


Abbildung 50: Agarosegel mit PCR-Produkten der *stx2*- und *stx1*-PCR

M: 100 bp DNA-Leiter (NEB); **Spur 1:** Bakterienlysat; **Spur 2:** Phagenisolat; **Spur 3:** EcN infiziert mit Phagenisolat; **Spur 4:** MG1655 infiziert mit Phagenisolat; **Spur 5:** HB101 infiziert mit Phagenisolat; **Spur 6:** DH5α infiziert mit Phagenisolat; **Spur 7:** Negativkontrolle dH₂O. **Spur 8:** Phagenisolat mit DNase Behandlung; **Spur 9:** Phagenisolat ohne DNase Behandlung.

Durchgeführt wurden *stx2*-PCRs (A, C) mit den Primern LP43 und LP44 und *stx1*-PCRs (B, D) mit den Primern KS7 und KS8; Es wurden jeweils Phagenisolate aus EHEC O157:H7 EDL933 (A, B), EHEC O26:H11 1530/99 (C) und EHEC O103:H2 5714/96 (D) verwendet.

Der PCR-Screen auf *stx2* DNA (Abbildung 50 A) zeigte, dass die Isolierung von *stx2*-Phagen aus EHEC O157:H7 EDL933 erfolgreich war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MG1655, HB101 und DH5 α mit diesen Phagen infiziert werden konnten, was bei EcN nicht der Fall war.

Der PCR-Screen (Abbildung 50 B) zeigte, dass keiner der getesteten Bakterienstämme (EcN, MG1655, HB101, DH5 α) durch die *stx1*-Phagen aus EHEC O157:H7 EDL933 infiziert werden konnte. Im Bakterienlysat und den isolierten *stx1* Phagen war *stx1*-DNA nachweisbar (Abbildung 50 B, Spur 1+2).

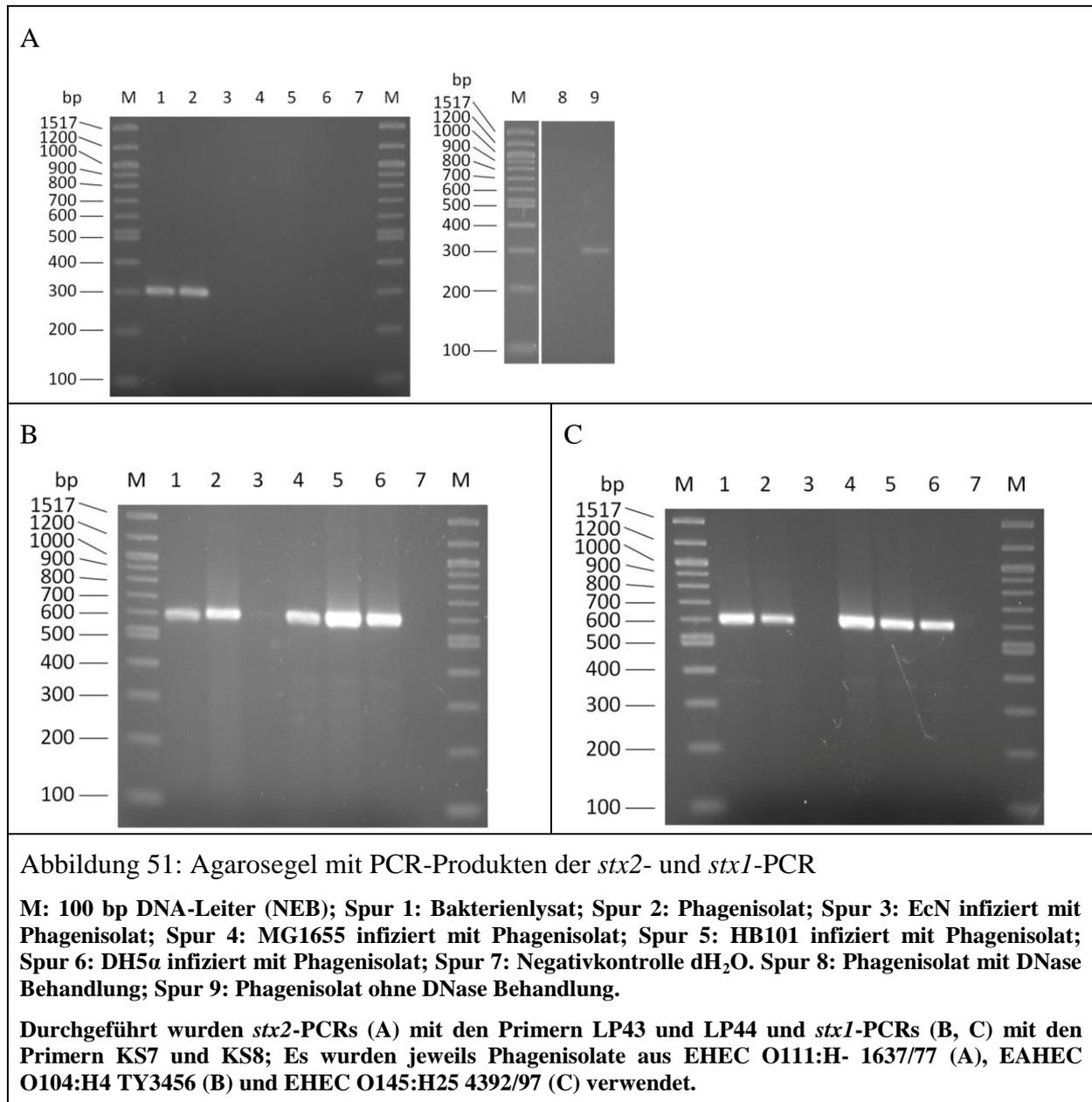
Um nun zu überprüfen, ob sich im Phagenisolat tatsächlich Phagen-Partikel mit *stx1*-DNA befinden, oder ob nur freie *stx1*-DNA vorhanden ist, die zu falsch positiven Ergebnissen in der Kontrolle führen würde, wurde das Phagenisolat zusätzlich mit DNase behandelt. Dazu wurden zu 20 μ l Probe 1 μ l DNase gegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte Hitzeinaktivierung bei 75°C für 10 min und Aufkochen der Probe bei 100°C für 10 min. *stx1* konnte auch nach dem Verdau noch durch PCR nachgewiesen werden. Dies zeigte somit, dass die Isolierung von *stx1*-Phagen-Partikeln aus EHEC O157:H7 EDL933 erfolgreich war, diese jedoch keinen der getesteten Bakterienstämme infizieren konnten.

Es konnte durch die *stx2*-PCR gezeigt werden (Abbildung 50 C), dass die Isolierung von Phagen aus EHEC O26:H11 1530/99 erfolgreich war. MG1655, HB101 und DH5 α konnten mit diesen Phagen infiziert werden, nicht jedoch EcN, was schon bei *stx2*-Phagen aus EHEC EDL933 der Fall war.

Der PCR-Screen (Abbildung 50 D) zeigte, dass keiner der getesteten Bakterienstämme (EcN, MG1655, HB101, DH5 α) durch die *stx1*-Phagen aus EHEC O103:H2 5714/96 infiziert werden konnte. Es wurde hier wiederum ein DNase-Verdau durchgeführt, da die Positiv-Kontrolle ein *stx1*-Produkt zeigte. Es konnte, wie zuvor bei EDL933, *stx1* auch nach dem Verdau durch PCR nachgewiesen werden, was zeigte, dass die Isolierung von *stx1*-Phagen-Partikeln aus EHEC O103:H2 5714/96 erfolgreich war, diese jedoch keinen der getesteten Bakterienstämme infizieren konnten.

Im PCR-Screen (Abbildung 51 A) zeigte sich ebenfalls, dass keiner der getesteten Bakterienstämme (EcN, MG1655, HB101, DH5 α) durch die *stx1*-Phagen aus EHEC O111:H-1637/77 infiziert werden konnte. Es wurde hier anschließend erneut ein DNase-Verdau durchgeführt, zum Ausschluss falsch positiver Signale. In diesem Fall jedoch konnte nach

dem Verdau kein *stxI* mehr durch PCR nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass keine infektiösen *stxI*-Phagen-Partikel aus EHEC O111:H- 1637/77 isoliert werden konnten, was wiederum den Mangel an infizierten Bakterien in diesem Fall erklärt. Die Bande beim Phagenisolat ist hier vermutlich auf freie DNA zurückzuführen.



Die *stx2*-PCR-Screens (Abbildung 51 B und C) zeigten, dass die Isolierung von *stx2*-Phagen aus EAHEC O104:H4 TY3456 (B) und EHEC O145:H25 4392/97 (C) ebenfalls erfolgreich waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass MG1655, HB101 und DH5 α mit diesen Phagen infiziert werden konnten, nicht jedoch EcN.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Isolierung und Infektion von Bakterien mit den getesteten Stx1-Phagen nicht möglich war. Im Gegensatz dazu war die Isolierung von Stx2-

Phagen aus EHEC O157:H7 EDL933, EHEC O26:H11 1530/99, EAHEC O104:H4 TY3456 und EHEC O145:H25 4392/97 erfolgreich und es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Infektion von MG1655, HB101 und DH5 α , aber nicht von EcN, durch diese Phagen möglich war.

4.7.2 Phagen-Plaque-Assay

Ein Phagen-Plaque-Assay ist eine einfache Möglichkeit die Infektion von Bakterien durch Phagen zu visualisieren. Die durch Lyse der Bakterien entstehenden Plaques, die bereits mit blosem Auge erkennbar sind, geben in der entsprechenden Verdünnungsstufe auch Aufschluss über die Anzahl an `PFUs` (`Plaque-Forming-Units`) pro ml Isolat. Die getesteten Bakterienstämme und Phagenisolate sind in Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 38: Ergebnisse der Phagen-Plaque-Assays

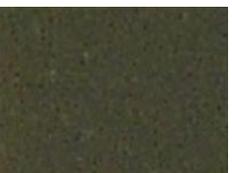
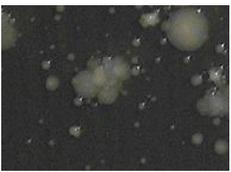
	K	P.-Isolat O157:H7 EDL933	P.-Isolat O26:H11 1530/99	P.-Isolat O103:H2 5714/96	P.-Isolat O111:H- 1637/77	P.-Isolat O104:H4 TY3456	P.-Isolat O145:H25 4392/97
EcN	0	0	0	0	0	0	0
SK22D	0	0	0	0	0	0	0
MG1655	0	X	X	0	0	X	X
ABU83972	0	0	0	0	0	0	0
CFT073	0	0	0	0	0	0	0
EcN Δ <i>fliC</i> Δ <i>tcpC</i>	0	0	0	0	0	0	0
SK22D Δ <i>pKs</i>	0	0	0	0	0	0	0
EcNc	0	0	0	0	0	0	0
EcN Δ K5	0	0	0	0	0	0	0
DH5 α	0	X	X	0	0	X	X
HB101	0	X	X	0	0	X	X

K = Kontrolle (Medium); X = Phagenplaques vorhanden; 0 = keine Phagenplaques erkennbar

EcN, sowie mehrere Mutanten von EcN, als auch ABU83972 und CFT073 zeigten keine Phagen-Plaque-Bildung, wohingegen bei MG1655, DH5 α und HB101 eine deutliche Plaque-Bildung erkennbar war (Tabelle 38), was wiederum die Ergebnisse der *stx*-PCR (Abbildung 50, Abbildung 51) bestätigt. EcN zeigt hier deutlich erkennbar keine Plaquebildung. Besonders die Phagensuspension von O26:H11 1530/99 führte zu einer drastischen Reduzierung des Bakterienrasen. Hier waren meist nur einzelne Bakterienkolonien erkennbar. Die deutlichsten Phagen-Plaques bildeten sich mit den Phagen isoliert aus EDL933. Die Phagen aus O104:H4 und O145:H25 erzeugten wesentlich kleinere Plaques, welche teilweise erst nach 48h Inkubation deutlich erkennbar waren. Bei anfänglicher Isolation der Phagen konnten 10^4 - 10^5 `PFU`/ml (O157:H7, O26:H11, O104:H4, O145:H25) erzielt werden. Die

Isolierung von Phagen aus EHEC O157:H7 EDL933 konnte durch Erhöhung der Konzentration von Mitomycin C auf 2 µg/ml auf 10⁷ PFU/ml erhöht werden. Ein Beispiel einer Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Phagenkonzentration wird in Abbildung 52 dargestellt.

Tabelle 39: Bilder der Agarplatten der Phagen-Plaques-Assays

	P.-Isolat O157:H7 EDL933	P.-Isolat O26:H11 1530/99	P.-Isolat O104:H4 TY3456	P.-Isolat O145:H25 4392/97
MG1655				
DH5α				
HB101				
EcN				

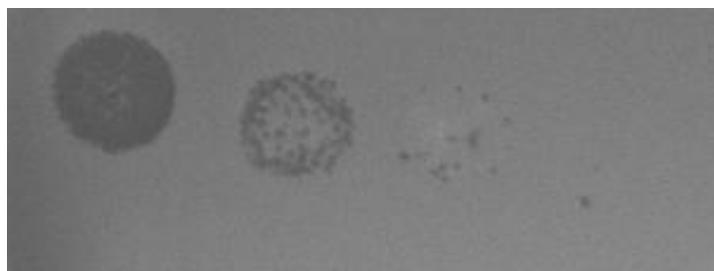
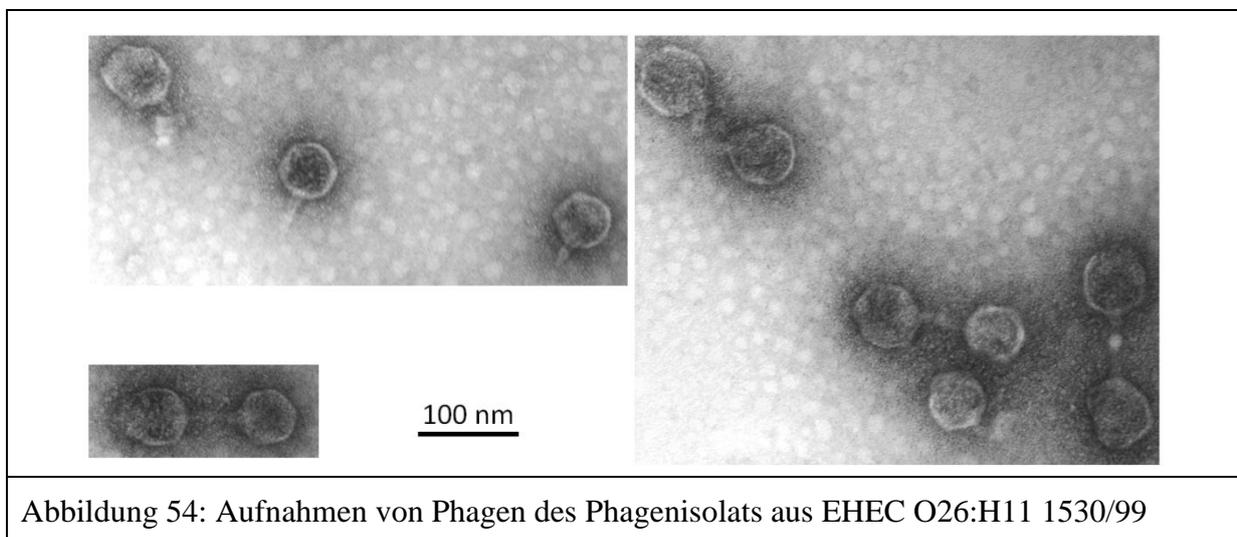
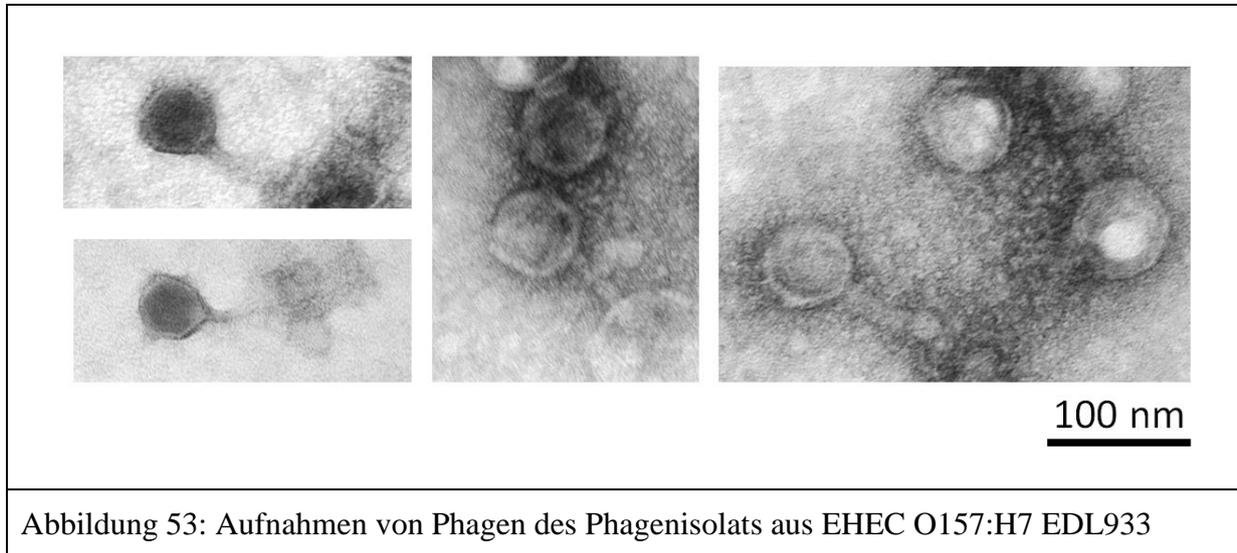


Abbildung 52: Agarplatte mit Phagenplaques

Die Agarplatte wurde mit MG1655 in Softagar beschichtet und mit 10 µl einer Verdünnungsreihe der Phagensuspension von EHEC EDL933 betropft, um die Anzahl der `PFU`/ml zu bestimmen.

4.7.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Isolierung von Phagen wurde durch Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (siehe 3.8.3). Hier sollte die Struktur der Phagen geklärt und die erfolgreiche Isolierung von Phagen nochmals bestätigt werden.



Die Aufnahmen zeigten eine hohe Phagenkonzentration bei Isolaten von EHEC O157:H7 EDL933 und EHEC O26:H11 1530/99. Es konnte die typische Struktur des Phagen 933W (EHEC EDL933) mit einem isometrisch ikosaedrisches Kapsid und einem kurzen Schwanz (Muniesa et al., 2004) nachgewiesen werden. Die Phagen im Isolat aus EHEC O26:H11 1530/99 hatten eine vergleichbare Struktur. In Isolaten von EHEC O103:H2 5714/96 waren dagegen keine Phagen zu finden. Phagenisolate von EHEC O111:H- wurden nicht mikroskopisch ausgewertet, da bereits die PCR die Abwesenheit von Stx-Phagen bestätigte.

Aus zeitlichen Gründen wurden noch keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen von EAHEC O104:H4 und EHEC O145:H25 4392/97 gemacht.

4.7.4 Stx-ELISA zur Überprüfung der Stx-Produktion infizierter Bakterienstämme

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob es nach Infektion von nicht pathogenen Bakterien mit Stx-Phagen zu einer Shiga Toxin Produktion in diesen Bakterien kommt.

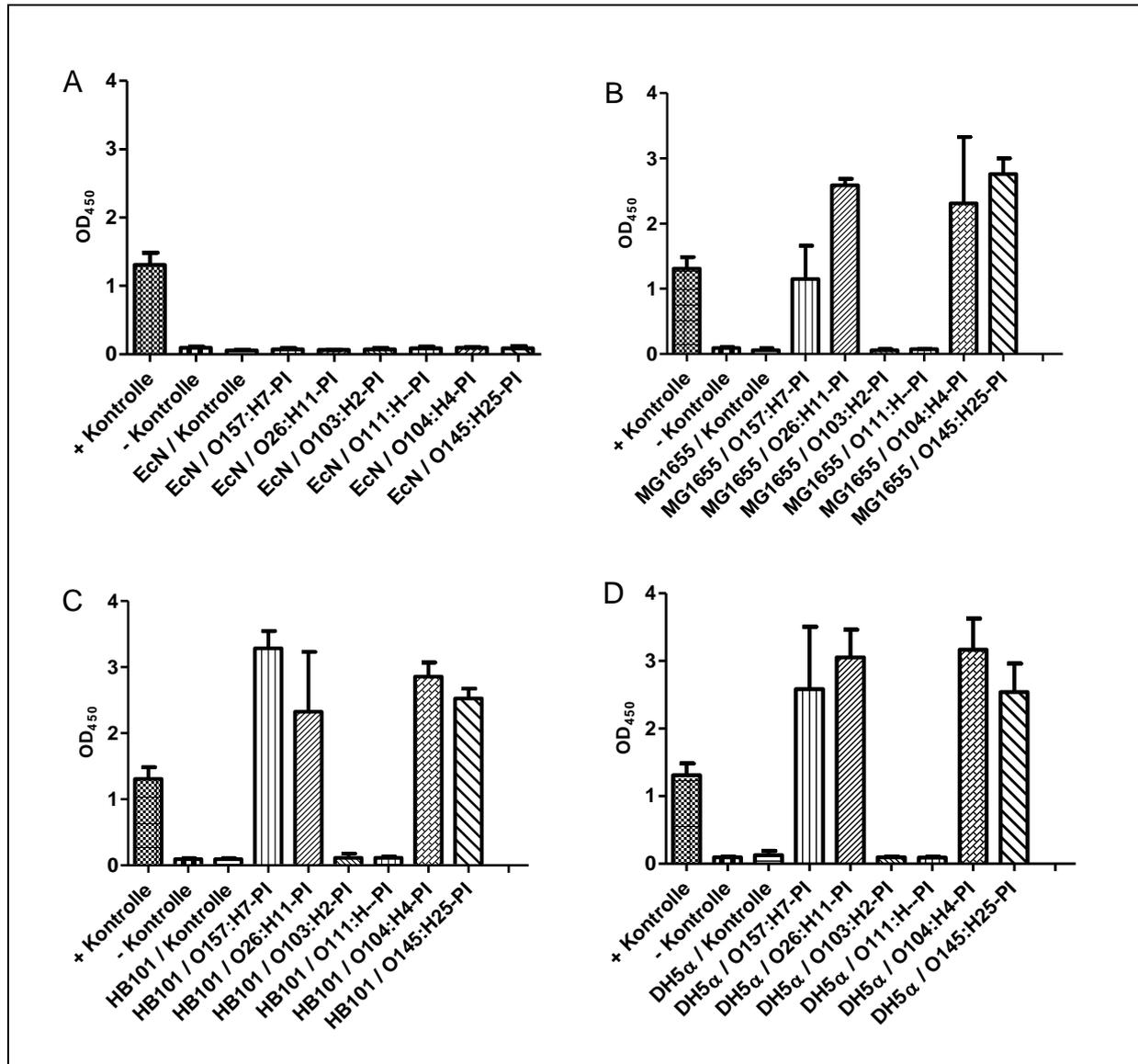


Abbildung 55: Shiga Toxin Produktion von infizierten nicht pathogenen *E. coli* Stämmen
 Es erfolgte die Inkubation der Bakterienstämme mit verschiedenen Phagenisolaten (PI) aus EHEC/EAHEC-Stämmen. Die Shiga Toxin Produktion wurde nach 24 h mit dem ELISA Kit bestimmt.
 (A) EcN; (B) MG1655; (C) HB101; (D) DH5α

Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von EcN mit verschiedenen Phagenisolaten nicht zu einer Shiga Toxin Produktion führte. Im Gegensatz dazu konnten die *E. coli* Stämme

MG1655, HB101 und DH5 α mit den Phagenisolaten aus EHEC O157:H7 EDL933, EHEC O26:H11 1530/99, EAHEC O104:H4 TY3456 und EHEC O145:H25 4392/97 infiziert werden, was die Shiga Toxin Produktion durch die Bakterien ermöglichte. Es wurde somit nicht nur die Infektion der Bakterien und das Vorhandensein des *stx*-Genclusters, sondern auch die Produktion des Shiga Toxins erfolgreich nachgewiesen. Ein Infektionsversuch mit den Phagenisolaten aus EHEC O103:H2 5714/96 und O111:H- 1637/77 führte dagegen nicht zu einer Shiga Toxin Produktion.

4.7.5 Messung der K⁺ - Konzentration

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es bei Bakterien nach Infektion mit Bakteriophagen zu einem K⁺-Austrom ins Medium kommt (Cumby et al., 2012). Durch Messung der K⁺-Konzentration kann somit unterschieden werden, ob eine Phagenresistenz der Bakterien erst nach Einschleusung der Phagen-DNA ins Cytosol der Wirtszelle ansetzt, oder die Phagen bereits vor dem Eintritt der DNA gehemmt werden.

Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt. Da die Kurven jeweils unterschiedliche Ausgangskonzentrationen aufwiesen, wurden diese zum Zeitpunkt $t = 2$ min nach Animpfen mit Phagensuspension oder Kontrolle auf eine Konzentration von 0 mol/l normiert. Dies ermöglichte die Bildung von Mittelwerten mit Standardabweichung. Es werden hier somit nur die Änderungen der Konzentration nach $t = 2$ min dargestellt. Abbildung 56 zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf während der 15 minütigen Akklimatisierungsphase und den folgenden 20 min Messphase nach dem Animpfen.

In den Versuchen wurden die Bakterienstämme EcN und MG1655 verwendet. Die Phagen wurden aus EHEC EDL933 isoliert.

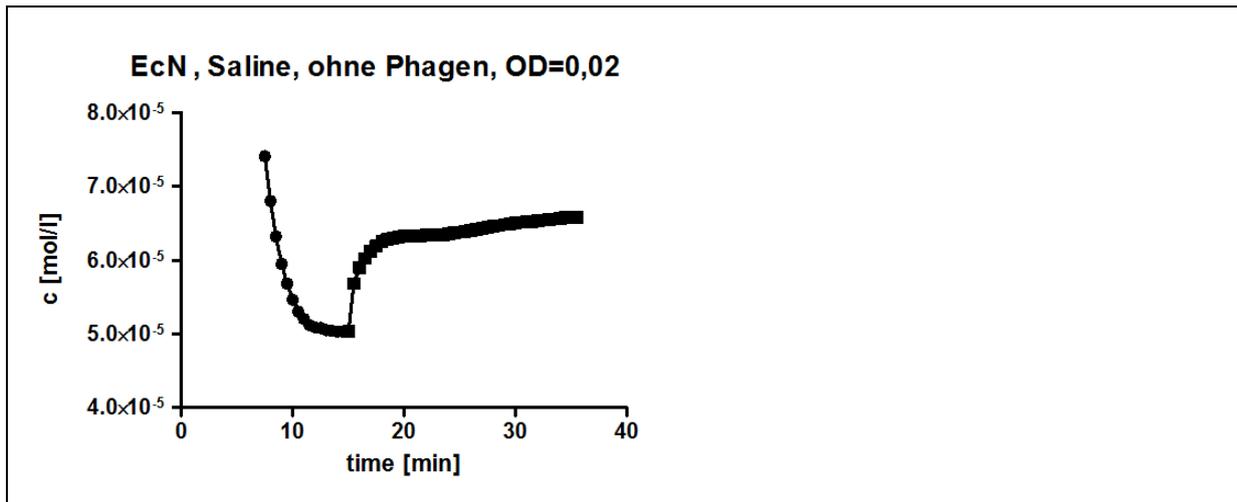


Abbildung 56: Exemplarischer Kurvenverlauf einer K^+ -Messung

5 ml einer EcN Batersuspension wurden 15 min bei 37°C aklimatisiert und anschließend mit $150\ \mu\text{l}$ vorgewärmten SM-Medium angeimpft.

Der Kurvenverlauf zeigt hier eine Stabilisierung der Kaliumkonzentration nach etwa 12 min bei $5 \times 10^{-5}\ \text{mol/l}$ (Abbildung 56). Nach Animpfen mit SM-Medium beim Zeitpunkt $t = 15\ \text{min}$ erfolgte zunächst ein schneller Anstieg der Konzentration in wenigen Minuten, welcher dann in eine langsame kontinuierliche Zunahme der Konzentration bis Ende des Messzeitraums überging.

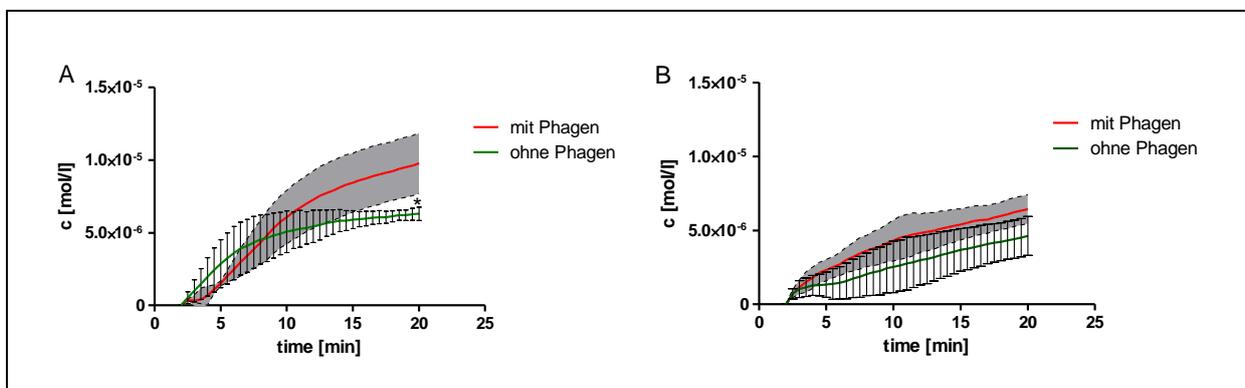


Abbildung 57: Verlauf der Kaliumkonzentration im Medium von MG1655 (A) und EcN (B)

Die Kaliumkonzentration in Salinelösung von MG1655 (A) und EcN (B) wurde über 20 min bei 37°C gemessen. Das Animpfen erfolgte mit Phagensuspension oder Kontroll suspension ohne Phagen beim Zeitpunkt $t = 0\ \text{min}$. Die Graphiken zeigen jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Versuche. (* $p = 0.0475$, bei $t = 20\ \text{min}$)

Die Versuche zeigten, dass es bei MG1655 zu einem signifikanten Unterschied in der Kaliumkonzentration im Medium, bedingt durch die Zugabe von Phagen, kommt (Abbildung 57 A). Der Kurvenverlauf ohne Phagen flacht sich hier, im Vergleich zum Verlauf mit Phagen, deutlich ab und zeigt nach 20 min bereits eine annähernd stabile

Kaliumkonzentration. Die Kaliumkonzentration mit Phagen stabilisiert sich auch zum Ende des Messzeitraums noch nicht.

Die Versuche mit EcN ergaben einen Kurvenverlauf, der unabhängig ob EcN mit oder ohne Phagen inkubiert wurde, einen stetigen leichten Anstieg der Kaliumkonzentration zeigte. Der Anstieg der K^+ -Konzentration nach Ende des Messzeitraums um etwa 5×10^{-6} mol/l in EcN war vergleichbar mit dem Anstieg der Konzentration in MG1655 ohne Phagen.

Es konnte hier erfolgreich gezeigt werden, dass es bei EcN, anders als bei MG1655, nicht zu einer Einschleusung der Phagen-DNA ins Cytosol der Wirtszelle kommt.

4.7.6 Bioinformatische Auswertung der Phagenrezeptorsequenz

Es ist bekannt, dass LamB als Rezeptor für λ Bakteriophagen dient (Chatterjee and Rothenberg, 2012). Mutationen in LamB können zu einer Resistenz gegenüber den λ Bakteriophagen führen (Chatterjee and Rothenberg, 2012). Es sollte hier in Homologievergleichen der Aminosäuresequenz von LamB (siehe 7.4) von resistenten Bakterienstämmen (EcN) und sensitiven Bakterienstämmen (MG1655) geklärt werden, ob eine Mutation von LamB in EcN für die Phagenresistenz verantwortlich sein könnte.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass insgesamt 18 bekannte Mutationen des LamB-Rezeptors zu Resistenz gegenüber λ Bakteriophagen führen (Chatterjee and Rothenberg, 2012). Durch Vergleich der Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden (7.4), dass keine der bekannten Mutationen für den Unterschied in der Phagenresistenz zwischen EcN und MG1655 verantwortlich sein kann, da die jeweiligen Aminosäuren (AS) identisch waren. Es konnte jedoch ein Unterschied in einem Cluster von 8 AS am carboxyterminalen Ende der Aminosäuresequenz (AS-408 – AS-419) festgestellt werden (7.4). Diese Aminosäuren befinden sich auf der Außenseite der Bakterienzelle und könnten somit an der Anheftung der Phagen an LamB beteiligt sein (Gehring et al., 1987) (siehe auch: Abbildung 59 und Abbildung 61).

5 Diskussion

5.1 Adhäsionsversuche

Die Schutzfunktion des Darms, welche ein Besiedeln des Darms durch Pathogene verhindert, wird als Kolonisierungsresistenz (CR) bezeichnet. Hierbei spielen verschiedene Faktoren wie das Immunsystem, die Mikrobiota und Stoffwechselprozesse eine wichtige Rolle (Lawley and Walker, 2013). Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an Wirtszellen ist der erste Schritt in der Aufhebung der Kolonisierungsresistenz und somit der Etablierung einer Infektion. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass der probiotische EcN-Stamm und der kommensale *E. coli* Stamm HS Kolonisierungsresistenz gegen den EHEC Stamm EDL933 vermitteln können (Leatham et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde die Adhäsion von pathogenen *E. coli* Stämmen (EHEC, EAHEC) *in vitro* im Zellkulturmodell mit den Epithelzelllinien Caco-2 und LS-174T untersucht. Hierbei wurden sowohl Einzelkulturen pathogener *E. coli* Stämme, als auch Co-Kulturen mit dem probiotischen *E. coli* Stamm Nissle 1917 eingesetzt. Ziel war hierbei die Auswirkungen einer Co-Kultivierung auf die Adhäsion der Pathogene zu untersuchen.

Zunächst wurde hierzu die Adhäsionseffizienz der verschiedenen *E. coli* Stämme bestimmt. Der am schlechtesten an beide Zelllinien adhärierende Stamm war EcN. Dies ist insofern überraschend, da von Probiotika erwartet wird, besser als Pathogene an Epithelzellen zu adhären. Allerdings steht diese weit verbreitete Erwartung im Widerspruch zu der Tatsache, dass kommensale und probiotische Bakterien im Darm von Gesunden nicht an die Enterozyten adhären. Die Adhäsionseffizienz der beiden klinischen Isolate von O104:H4 war 7,5-13,3-mal höher verglichen mit EcN. Bei EAEC 55989 war diese 5,1-6,5-mal höher und bei EHEC EDL933 konnte noch eine 3,4-3,7-fach höhere Anzahl an adhärenen Bakterien festgestellt werden. Die sehr starke Adhärenz der O104:H4 Isolate kann möglicherweise durch die neue Komposition der Adhäsionsfaktoren erklärt werden. Dazu zählen die aggregativen Adhärenzfimbrien (AAF/I), das zu IrgA homologe Adhäsine (Iha), die langen polaren Fimbrien (LPF) und die Abwesenheit von Intimin (Eae) (Bielaszewska et al., 2011). Die vielfach stärkere Adhärenz von EAHEC O104:H4 ist insofern noch erstaunlicher, da in den REM-Aufnahmen sehr wenige Oberflächenstrukturen (Adhäsine) sichtbar sind. Vergleichbare Aufnahmen von EcN zeigen sehr viel mehr Strukturen, die als Adhäsine fungieren könnten. Des Weiteren war die Adhärenz von beiden EAHEC O104:H4 Isolaten an

die mukusproduzierende Zelllinie LS-174T im Vergleich mit der nicht-mukusproduzierenden Zelllinie Caco-2 signifikant erhöht. Dies deutet an, dass die Fähigkeit an die Mukusschicht des Darms zu adhären möglicherweise im EAHEC Stamm erhöht ist. Daraus folgend mag eine Infektion des Menschen durch den EAHEC O104:H4 Stamm eventuell einfacher sein, als für den klassischen EHEC oder EAEC Stämmen.

Co-Kultivierung mit pathogenen *E. coli* Stämmen beeinflusste die Adhäsionseffizienz von EcN an die Epithelzellen meist nur geringfügig. Trotz der stärkeren Adhäsion der pathogenen *E. coli* Stämme, war es EcN möglich die Adhäsion dieser in Co-Kulturversuchen zu hemmen. Ein vielfach vorgeschlagener Wirkmechanismus für Probiotika ist das Belegen von Rezeptoren durch die Probiotika, was zu einer Reduktion der Adhäsion der Pathogene führt (Ohland and Macnaughton, 2010; Sherman et al., 2009). Dies ist offensichtlich nicht der Wirkmechanismus durch den EcN die Adhäsion der pathogenen Bakterien in unserem Testsystem hemmt. Diese These wird durch den Umstand unterstützt, dass es sich bei den Versuchen um Co-Inkubation und nicht um Pre-Inkubationsversuche handelte.

Durch die Erhöhung der Menge an EcN Bakterien im Versuchsansatz vom Verhältnis 1:1 auf 10:1 konnte die Anzahl der adhärenenden pathogenen Bakterien noch weiter reduziert werden. Eine Reduktion der Gesamtbakterienzahl bei Beibehaltung des Verhältnisses von 10:1 erhöhte wiederum die relative Adhäsion der pEc. Ein Grund hierfür ist womöglich das Einbringen von Substanzen durch das Inokulum, die während der 2h-Kultivierung von EcN gebildet werden. Diese Stoffe werden beim Verhältnis 10:1 in 10-fach höherer Menge mit dem Inokulum eingebracht und könnten damit die Adhäsion stärker hemmen, was in der sehr niedrigen Adhäsionseffizienz im Verhältnis 10:1 bei hoher Gesamtbakterienzahl resultiert. Als Hemmstoffe kommen hierbei zum Beispiel die von EcN produzierten Mikroazine in Frage.

Der Stamm *E. coli* Nissle 1917 produziert und sekretiert die Mikroazine H47 und M, welche eine bakterizide Wirkung gegen nahe verwandte Bakterienstämme aufweisen (Patzner et al., 2003). Zur Untersuchung des Einflusses der Mikroazine wurde die Mikroazin-negative Mutante von EcN (SK22D) in Adhäsions- und Wachstumsversuchen verwendet. Ein Co-Kulturversuch mit SK22D und EAHEC TY3730 gab erste Aufschlüsse über die Effekte von Mikroazin. Weitere Versuche zum „Beitrag von Mikroazinen zur antagonistischen Aktivität des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 Stammes gegen EHEC-Stämme“ wurden von Kathrin Stelzner im Rahmen Ihrer Masterarbeit durchgeführt (Stelzner, 2013). „Der Vergleich der relativen Adhäsion der pathogenen Stämme zwischen Co-Kultivierung mit EcN und SK22D ergab eine signifikant stärkere Abnahme der Adhäsion bei Anwesenheit von EcN bei allen

untersuchten Co-Kulturen mit EHEC TY3730 und den 10:1-Co-Kulturen mit EHEC EDL933 und EAEC 55989“ (Stelzner, 2013).

Der Umstand, dass im Versuchsaufbau die relative Adhäsion durch Bestimmung der Lebendkeimzahl bestimmt wurde, lässt den Schluss zu, dass die niedrigere Adhäsion ein Resultat einer möglichen Tötung der pathogenen Bakterien, möglicherweise durch die von EcN produzierten Mikroazine, ist. Dies konnte jedoch durch Bestimmung der Lebendkeimzahl im Medium nach 2h größtenteils ausgeschlossen werden. Mikroskopische Aufnahmen der Epithelzellen mit den adhärierenden Bakterien nach Co-Kultivierung von SK22D und EAHEC TY3730 zeigten außerdem eine klare Reduzierung der adhärenen Bakterien im Vergleich zur Einzelkultur (Stelzner, 2013). Die Tötung der pathogenen Bakterien durch von EcN produzierte Mikroazine ist in geringem Umfang, nämlich beim Einsatz einer hohen Anzahl an EcN-Bakterien (10:1), für die Reduktion der Adhäsionseffizienz verantwortlich. Dieser Faktor ist jedoch, wie die Versuche zeigten, nur für einen Bruchteil der Reduzierung der Adhäsion verantwortlich. Die Stärke des Einflusses der Mikroazine ist zudem von den eingesetzten pathogenen *E. coli* Stämmen abhängig (Stelzner, 2013).

Eine weitere Ursache für die beobachtete Reduzierung der Lebendkeimzahl könnte die Produktion von humanem beta-Defensin 2 (hBD2) durch die Epithelzellen sein. Es wurde gezeigt, dass EcN, vermittelt durch seine Flagelle, die Produktion von hBD2 induzieren kann (Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004). Ein solcher Mechanismus kann jedoch ausgeschlossen werden, da EcN ebenfalls Defensin-sensitiv ist. Das Defensin würde somit sowohl die pEc, als auch EcN töten, was jedoch in den Experimenten nicht beobachtet wurde. Des Weiteren ist die Anzahl der EcN Bakterien und die Expositionsdauer vermutlich zu gering, als dass genug hBD2 induziert würde, um den Effekt, der in den Experimenten gesehen wurde, zu verursachen (Wehkamp et al., 2004). Ebenso zeigten Versuche mit fixierten Epithelzellen eine Reduktion der relativen Adhäsion von pEc (Stelzner, 2013). Es können somit jegliche von den Epithelzellen produzierte Substanzen ausgeschlossen werden.

In einem Co-Kultivierungsversuch mit EcN und EAHEC TY3730 im 'Trans-Well'-System konnte kein Unterschied in der Anzahl an adhärierenden EAHEC bei räumlicher Trennung festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte später von Kathrin Stelzner bei ähnlichem Versuchsaufbau bestätigt werden. Grund hierfür ist möglicherweise eine sehr langsame Diffusion von sekretierten Faktoren durch den Filter der 'Trans-Well'-Einsätze. Eine Kultivierung von EAHEC TY3730 in steril filtrierte Kulturüberständen von EcN zeigte im Gegensatz dazu die erwartete Hemmwirkung auf die Adhäsion von TY3730 (Stelzner, 2013).

Die Kultivierung von EAHEC TY3730 in steril filtrierten Kulturüberständen von SK22D hatte dagegen keine Auswirkung auf die Adhäsion von TY3730 (Stelzner, 2013).

Daraus lässt sich schließen, dass verschiedene Faktoren bei dem Hemmeffekt von EcN auf die Adhäsion von pEc Stämmen eine Rolle spielen. Mikroazine als sekretierte Faktoren, für deren Funktion kein Zellkontakt oder lebende EcN Bakterien notwendig sind, ist für einen Teil der Hemmwirkung verantwortlich. Weitere Faktoren sind wiederum abhängig vom Zellkontakt der Bakterien oder benötigen lebende EcN Bakterien. Solche Faktoren könnten unter anderem das von EcN produzierte Colibactin beinhalten. Der zytopathische Effekt von Colibactin lässt sich nur bei Kontakt von Bakterien und Epithelzellen nachweisen (Nougayrede et al., 2006). Co-Kultivierungsversuche mit der EcN-Mutante SK22D Δ pKs könnten hier Aufschluss über den Einfluss von Colibactin geben.

Insgesamt konnte durch die Studien der Adhäsion von EHEC/EAHEC/EAEC Stämmen in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN erfolgreich nachgewiesen werden, dass EcN die Adhäsion dieser Bakterien an Epithelzellen hemmt. Dies steht in Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen zu Studien der Kolonisierungsresistenz gegen den EHEC Stamm EDL933 im Mausmodell (Leatham et al., 2009) und Studien der Adhäsion von anderen darmpathogenen Bakterienstämmen (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) im 3D-*in vitro* Zellkulturmodell (Costello et al., 2014). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Studien der Adhäsion konnten in der Masterarbeit von Kathrin Stelzner bestätigt werden (Stelzner, 2013).

Wie bereits immer wieder elegant von der Gruppe um Paul Cohen gezeigt wurde, ist die Kolonisierungsresistenz in Mäusen unter anderem vom Zuckermetabolismus der kolonisierenden Stämme abhängig (Leatham et al., 2009; Maltby et al., 2013). Das metabolische Profil von neu auftretenden EHEC Stämmen könnte hier genutzt werden, um eine Mischung von kommensalen und probiotischen Bakterien zu erstellen. Die als vorbeugendes Medikament zur Erzeugung einer Kolonisierungsresistenz eingesetzten Bakterien würden einen Beitrag zur Vorbeugung der Ausbreitung von Infektionen leisten. *E. coli* Nissle 1917 könnte hier eine tragende Rolle in der Zusammensetzung der eingesetzten Bakterien spielen.

5.2 Wachstum

Das Wachstum der EAHEC O104:H4 Isolate wurde in den Co-Kultivierungsversuchen nur geringfügig von EcN beeinflusst. Zwar erreichte EAHEC in Co-Kultur im Verhältnis 1:10 mit EcN nicht die Keimzahlen der Einzelkultur, jedoch blieb das Verhältnis von EcN:EAHEC nach 24h weitgehend identisch. Werden zwei gleich vitale Bakterienstämme co-kultiviert, so kann davon ausgegangen werden, dass bei gleicher Zellteilungsrate und keiner Beeinflussung durch antagonistische Faktoren, das Verhältnis der Stämme zueinander gleich bleibt. Dies liegt unter anderem daran, dass beide Stämme sich zur selben Zeit in der logarithmischen und stationären Phase des Wachstums befinden. Diese Hypothese könnte in einem Co-Kultivierungsversuch mit einem Bakterienstamm und dessen Antibiotika-resistenter Spontanmutante überprüft werden.

Bei EHEC EDL933 und EAEC 55989 kommt es jedoch zu einer gravierenden Beeinflussung des Wachstums durch EcN. Dies äußert sich im rapiden Abfall der Keimzahl nach 2h Co-Inkubation. Die Lebendkeimzahl stabilisiert sich hier meist bei Werten, die dem Inokulum entsprechen. Hier kann daher von einer Abtötung der pathogenen Bakterien durch von EcN produzierten Faktoren ausgegangen werden. In ersten Versuchen dieser Arbeit, welche in der Masterarbeit von Kathrin Stelzner fortgesetzt wurden, konnten wir feststellen, dass es sich bei zumindest einem Faktor, der für die Reduzierung der Lebendkeimzahl verantwortlich ist, um Mikrozin handelt. Kathrin Stelzner konnte zeigen, dass die Mikrozin-negative Mutante SK22D keinen Einfluss auf das Wachstum von EHEC EDL933 und EAEC 55989 hat. Darüber hinaus konnte Sie zeigen, dass bei Co-Inkubation von SK22D mit den EAHEC O104:H4 Isolaten über einen Zeitraum von 24h sich das Verhältnis von SK22D:O104:H4 zugunsten der EAHEC Stämme änderte. Die Catechol-At-Rezeptoren Fiu, Cir und FepA von *E. coli* Stämmen dienen bekanntlich als Rezeptoren für die von EcN produzierten Mikrozine (Patzer et al., 2003). Eine niedrigere Expression dieser Rezeptoren könnte die niedrigere Anfälligkeit von EAHEC Stämmen in Co-Kultur mit EcN erklären. Des Weiteren könnte dies auch die Stabilisierung der Keimzahl gegen Ende der 24h Co-Inkubation erklären. Die Mikrozine töten zunächst die sensitiven EHEC Bakterien, während Expressionsvarianten oder Mutanten mit weniger Catechol-At-Rezeptoren überleben und sich vermehren.

Mikrozin stellt somit einen wichtigen, und den bisher einzigen bekannten Faktor, in der antagonistischen Wirkung von EcN auf das Wachstum EHEC/EAHEC Stämme dar.

5.3 Studien zur Toxinproduktion

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von EHEC Bakterien ist das Shiga Toxin. Die Kombination der Virulenzfaktoren in EAHEC O104:H4 unterstützt möglicherweise die Aufnahme von Shiga Toxin und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit HUS zu entwickeln (Bielaszewska et al., 2011; Karch et al., 2012). Die Reduzierung der Shiga Toxin Produktion ist das Thema vieler wissenschaftlicher Publikationen und ist essentiell zur Beeinflussung des Krankheitsverlaufes. Die Behandlung von EHEC Infektionen mit Antibiotika ist immer noch umstritten, wobei andere Medikamente noch nicht ausgereift sind (Proulx et al., 1992; Tarr et al., 2005; Wong et al., 2000). Eine Studie aus dem Jahre 2009 konnte bereits eine Reduktion der Produktion von Stx1 in STEC O26:H11 und STEC O91:H-, sowie der Stx2 Produktion in STEC O157:H7 durch EcN nachweisen (Reissbrodt et al., 2009). Wir waren daher an den Effekten einer Co-Kultivierung von EcN und EHEC/EAHEC Stämmen auf die Shiga Toxin Produktion der pathogenen Stämme interessiert.

Die Studien bezüglich der Toxinproduktion wurden zunächst in dem für die Adhäsions- und Wachstumsstudien verwendeten DMEM-Medium durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Zellkulturmedium mit einer hohen Glukose-Konzentration (4,5 g/l). Zusätzlich im Medium enthalten sind Aminosäuren, Vitamine, Salze und Phenol-Rot. Zur Messung der Toxinmenge nach 24 h Inkubation wurden ELISA Tests durchgeführt. Die lineare Abhängigkeit der Konzentration der Toxine und der im ELISA gemessenen OD₄₅₀ konnte bestätigt werden. Bei hohen Toxinkonzentrationen erfolgte eine Verdünnung (1:10) der Proben. Zur Untersuchung des Einflusses der von EcN produzierten Mikroazine wurde die Mikrozin-negative EcN-Mutante SK22D verwendet. Der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 diente als Negativkontrolle.

Die Co-Inkubation von MG1655 und den EAHEC Isolaten hatte keinen Einfluss auf die Shiga Toxin Produktion. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei Effekten auf die Stx-Produktion nicht um allgemeine Effekte einer Co-Inkubation handelt. Bei Co-Inkubation von EcN mit EAHEC TY3730 zeigte sich eine Dosis-abhängige Reduktion der Stx-Produktion. Ein Großteil der Reduktion der Shiga-Toxin-Menge kann auf die Produktion von Mikrozin zurückgeführt werden, da die Co-Kultivierung mit SK22D nur geringen Einfluss auf die Toxinproduktion hat. Hierbei ist zu beachten, dass das Wachstum von EAHEC TY3730 nur geringfügig von EcN (Mikrozin) beeinflusst wurde. Da bisher keine Komplementante von SK22D vorliegt, können auch andere Faktoren, die mit der Deletion von Mikrozin zusammenhängen, nicht ausgeschlossen werden. Die Shiga Toxin Produktion

des EAHEC Isolats TY3456 wurde bei Co-Inkubation mit EcN nur im Verhältnis 10:1 reduziert. Die unterschiedliche Beeinflussung der Isolate lässt sich durch eine Mutation der Bakterien während der Darmpassage erklären. Interessant ist die Tatsache, dass das Isolat aus dem HUS-Patienten (TY3456) im Gegensatz zum Isolat aus dem Gastroenteritis-Patienten (TY3730) weniger sensitiv gegenüber EcN ist. Um zu klären, ob es sich hier um einen Zufall handelt, oder ob HUS-Isolate an sich weniger empfindlich sind, was erst zu diesem Krankheitsverlauf führt, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Dazu könnten verschiedene, bereits vorhandene, HUS- und Gastroenteritis-Isolate, bezüglich ihrer Stx-Produktion in Co-Kultur, verglichen werden.

Die Co-Inkubation von MG1655 und EDL933 führte zu einer drastischen, Dosis-abhängigen Erhöhung der Shiga Toxin Produktion. Der Grund hierfür könnte eine Induktion der Stressantwort durch MG1655 sein (Michel, 2005; Nassar et al., 2013). Auch denkbar wäre eine Infektion von MG1655 durch Phagen aus EHEC EDL933 (933W) (Muniesa et al., 2004; Muniesa et al., 2003), was ebenso zu einer Erhöhung der Shiga-Toxin-Menge, welche im Versuch beobachtet wurde, führen könnte. Im Gegensatz zur Co-Kultivierung mit MG1655 zeigte sich bei EcN und SK22D eine deutliche Reduktion der Stx-Produktion von EHEC EDL933 im Verhältnis 10:1. Eine Abhängigkeit von Mikrozin, wie bei EAHEC O104:H4 beobachtet, konnte nicht festgestellt werden. Dies ist insofern interessant, da das Wachstum von EDL933 in Co-Kultur mit EcN deutlich von Mikrozin beeinflusst wird (Stelzner, 2013). Ein zeitlicher Verlauf der Shiga Toxin Menge in Abhängigkeit von der Keimzahl wäre hier nötig, um den genauen Zusammenhang zu klären.

Die Studien der Toxinproduktion von EHEC O26:H11 zeigten eine Dosis- und Mikrozinabhängige Reduktion von Stx2. Da aber keine Daten zur Keimzahlentwicklung vorliegen, können hier nur Vermutungen angestellt werden, um diese Ergebnisse zu erläutern. Eine rapide Reduktion der Keimzahl, ohne oder mit leichter Induktion der Stx-Produktion würde die vorliegenden Ergebnisse am besten erklären. Bereits 2009 konnte eine Reduktion der Stx1-Produktion eines O26:H11 Stammes (03-03231) durch EcN nachgewiesen werden (Reissbrodt et al., 2009). Die Reduktion der Stx-Produktion im Verhältnis 1:1 (61,8 % Hemmung) und im Verhältnis 10:1 (93,1 % Hemmung) ist mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, trotz eines unterschiedlichen Stx-Typs (Stx1), vergleichbar.

Bei den Ergebnissen der Shiga Toxin 1 Produktion von EHEC O103:H2 fällt zunächst auf, dass die Varianz sehr hoch ausfällt. Dies könnte verbessert werden, indem die drei biologischen Replikate auf einer ELISA Platte ausgewertet werden. Unterschiede zwischen den

ELISA Platten würden somit vermieden. Wenn man die hohe Varianz in Betracht zieht, so kommt man zum Schluss, dass es sich bei den Versuchen um einen allgemeinen nicht EcN-spezifischen Hemmeffekt der Shiga Toxin Produktion handelt, da auch bei MG1655 eine Hemmung auftrat.

Auch bei EHEC O111:H- (Stx1) konnte ein allgemeiner Hemmeffekt auf die Shiga-Toxin-Produktion festgestellt werden. Bei EHEC O145:H25 (Stx2) zeigte sich ein nicht Mikrozin-abhängiger Hemmeffekt auf die Stx2 Produktion. Leider kann wegen der hohen Varianz der Ergebnisse mit MG1655 hier keine Aussage über die Shiga Toxin Produktion in Co-Kultur gemacht werden. Eine Wiederholung der Versuche war durch einen Lieferstopp des verwendeten DMEM-Mediums nicht mehr möglich.

Fasst man die Studien der Shiga Toxin Produktion in DMEM zusammen, so werden alle getesteten EHEC/EAHEC Stämme durch EcN in ihrer Shiga Toxin Produktion gehemmt. Auffällig ist, dass es sich bei den Stx1-Produzenten (O103:H2, O111:H-) um einen allgemeinen Effekt handelt, während die Effekte bei den Stx2-Produzenten (O104:H4, O26:H11, O145:H25) EcN-spezifisch sind. Die unterschiedliche Reaktion der Shiga Toxin Untergruppen lässt sich eventuell auf eine differentielle Regulation zurückführen. Die Aminosäuresequenz von Stx2 und Stx1 stimmt nur in etwa 55% der Aminosäuren überein (Fraser et al., 2004). Des Weiteren wird Stx2 nur gebildet wenn der Phage in den lytischen Zyklus übergeht (Tyler et al., 2004), während Stx1 vom Phagenzyklus und einem durch Eisen regulierten Promotor kontrolliert wird (Wagner et al., 2002). Eine Induktion der Stx1 Produktion erfolgt durch die SOS-Antwort oder durch Eisenmangel, wobei nur durch die SOS-Antwort die Lyse der Bakterien ausgelöst wird (Wagner et al., 2002). Eine Induktion durch Eisenmangel würde einen Anstieg der Stx1-Menge erklären, jedoch nicht die beobachtete genau gegensätzliche Reduktion des Shiga Toxin Levels nach 24h.

Die Reduktion der Stx-Produktion in EAHEC O104:H4 TY3730 und TY3456, sowie EHEC O26:H11 war zum Teil von der Mikrozinproduktion abhängig. EHEC O157:H7 EDL933 und EHEC O145:H25 zeigten keine Abhängigkeit von der Mikrozinproduktion. Hier sollten jedoch noch Versuche mit einer Mikrozin-Komplementante durchgeführt werden, vor allem da die Mikrozinproduktion eigentlich unter Eisenmangelbedingungen im Minimalmedium stattfinden sollte (Patzner et al., 2003). Da jedoch die Zusammensetzung des DMEM-Mediums wegen des verunreinigten FBS (PAA) unklar ist, kann die Mikrozinproduktion in diesem Medium nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Hemmung der Stx-Produktion stellt ppGpp dar. In Bakterien die mit λ Bakteriophagen infiziert sind kommt es bei Aminosäuremangel zu einer Hemmung der Vervollständigung der lytischen Entwicklung und somit zu einer Hemmung der Expression von *stx* Genen (Nowicki et al., 2013). Eine Hemmung der Aktivität vom *pR* Promotor durch ppGpp wurde bei den Phagen ST2-8624 und den in EHEC EDL933 vorkommenden Phagen 933W nachgewiesen (Nejman et al., 2011). Eine Hemmung der Stx-Produktion durch Aminosäuremangel im DMEM Vollmedium ist unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Betrachtet man die Shiga-Toxin Regulation, so könnte EcN mit der SOS-Antwort interferieren. Bei der SOS Antwort ist das Protein RecA von entscheidender Bedeutung. Der λ Bakteriophagen-Repressor CI wird durch RecA zur Selbstspaltung induziert, was schließlich zur Stx Produktion führt. Eine Verminderung der RecA-Menge durch EcN könnte zu einer Reduktion der Shiga Toxin Produktion führen, wie dies bei NO der Fall ist (Vareille et al., 2007). Im Falle von NO geschieht dies vermutlich zum Teil durch De-Repression des NO-sensitiven Repressors NsrR (Vareille et al., 2007). Durch welche Faktoren von EcN die RecA Konzentration beeinflusst werden könnte, ist bisher unklar.

Weitere Studien zur Toxinproduktion wurden in LB-Medium durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Standard-Vollmedium aus Hefeextrakt, NaCl und Trypton. Bei Verwendung von LB-Medium zeigte sich im Gegensatz zum DMEM-Medium keine Mikrozin-Abhängigkeit der Hemmung der Toxinproduktion durch EcN bei den EAHEC Isolaten TY3730 und TY3456. Die Toxinproduktion von EHEC EDL933 wurde ebenfalls nicht in Abhängigkeit der Deletion der Mikrozin-Gene beeinflusst. Grund hierfür könnte sein, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen kein Mikrozin gebildet wird. Dies würde mit der allgemein vertretenen Meinung übereinstimmen, dass Mikrozin nicht im Vollmedium ohne Eisenmangelbedingungen gebildet wird (Patzner et al., 2003). Ebenso wie im DMEM-Medium ist eine Hemmung der Stx-Produktion durch Aminosäuremangel im LB-Vollmedium unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Zusätzliche Studien zur Toxinproduktion wurden anschließend in SCEM-Medium durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein simuliertes Kolon-Medium, welchem auch Gallensalze zugesetzt sind. Von allen getesteten Medien kommt dieses den Verhältnissen im Kolon am nächsten. Getestet wurden neben den EAHEC Isolaten TY3730 und TY3456 auch EHEC EDL933. Die Reduktion der Shiga Toxin Produktion ist hier ausgeprägter; es zeigt sich eine klare EcN-Dosis-Abhängigkeit und die Stx-Produktion der Co-Kulturen von EcN

mit EAHEC TY3730 oder TY3456 sind sehr ähnlich. Zur Klärung der hierfür zuständigen Mechanismen ist die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Shiga Toxin Produktion in Abhängigkeit von der Bakterienkeimzahl denkbar. Eine Co-Kultivierung mit SK22D könnte über den Einfluss von Mikrozin Aufschluss geben. Des Weiteren könnte der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 eingesetzt werden, um zu klären, ob es sich um einen allgemeinen nicht EcN-abhängigen Effekt handelt. Eine Hemmung der Stx-Produktion durch Aminosäuremangel ist hier, anders als in LB und DMEM Medium durchaus denkbar.

Im Zuge der Suche nach dem Mechanismus der Reduktion der Stx Produktion wurden auch Versuche mit der EcN-Mutante EcN::*luxS* durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine EcN-Mutante mit der Deletion des AI-2 'Quorum sensing' Moleküls (Jacobi et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass 'Quorum sensing' Moleküle (AI-2) an der Regulation der SOS-Antwort beteiligt sind (Sperandio et al., 2001), die wiederum in engem Zusammenhang mit der Stx Produktion steht (Kimmitt et al., 2000). Eine Deletion von AI-2 in EHEC O157:H7 Stamm 86-24 führte zu einer Reduktion der Stx-Produktion (Sperandio et al., 2001). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob AI-2, welcher von EcN produziert wird, Auswirkungen auf die Stx Produktion von EAHEC TY3730 und TY3456 hat. Hier konnten keine von EcN WT abweichenden Effekte der AI-2-Deletionsmutante auf die Shiga Toxin Hemmung, festgestellt werden. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass nur AI-2 von EcN, nicht aber AI-2 von EAHEC deletiert wurde. Die Regulation durch 'Quorum sensing' Moleküle könnte außerdem in EAHEC anders als in EHEC O157:H7 Stamm 86-24 verlaufen. Hinzu kommt, dass eine Co-Kultur von EcN und EAHEC mehr AI-2 enthalten sollte als die Einzelkultur, was dann zu einer Erhöhung der Stx-Menge führt. Dies wurde jedoch nicht in unseren Versuchen beobachtet. Eine Regulation der Stx-Expression durch AI-2 ist somit unwahrscheinlich, kann jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Dazu müssten weitere Versuche mit EHEC O157:H7 Stamm 86-24, sowie einer AI-2 Mutante von SK22D durchgeführt werden. Da zum 'Quorum sensing' auch noch andere Systeme wie Indol oder AI-3 gehören, sollten auch diese untersucht werden, um die Beteiligung von 'Quorum sensing' an der Stx Hemmung zu klären.

2011 konnte in einer Publikation in Nature gezeigt werden, dass *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217 gegen eine Infektion durch *E. coli* O157:H7 (Stx2) schützen kann (Fukuda et al., 2011), wobei Acetat für die Schutzwirkung verantwortlich gemacht wurde. Uns interessierte daher, ob Acetat für die beobachtete Reduktion der Shiga-Toxin Produktion in den Stämmen EHEC O157:H7 EDL933 und EAHEC O104:H4 TY3730 verantwortlich sein könnte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Fukuda konnte allerdings kein Einfluss

von Acetat auf die Stx-Produktion festgestellt werden. Dies könnte eventuell an den verwendeten EHEC/EAHEC Stämmen liegen. Um dies zu überprüfen, müsste der von Fukuda verwendete *E. coli* O157:H7 Stamm für weitere Versuchen herangezogen werden. Der Mechanismus durch den Acetat die Produktion von Shiga Toxin hemmt, wäre von hohem wissenschaftlichem Interesse.

Bei den bisher diskutierten Ergebnissen wurde zur Vorbereitung der Toxinproben die Zellsuspension sterilfiltriert. Hierbei wurde nicht zwischen Überstand und Bakteriensediment unterschieden. Für den Fall, dass EcN nur die Lyse/Sekretion von Shiga Toxin hemmt, würde das Toxin in den Bakterien verbleiben und so die im ELISA gemessene Toxinkonzentration sinken, obwohl die intrazelluläre Produktion nicht beeinflusst war. Ein Experiment mit Überstand und zusätzlich aufgeschlossenen Bakteriensediment zur Überprüfung dieser These zeigte jedoch keinen Einfluss von EcN auf die Sekretion von Shiga Toxin, da sich in den lysierten Bakterien kaum Toxin befand. Ein Einfluss von EcN auf die Lyse oder die Sekretion von Shiga Toxin kann somit ausgeschlossen werden.

Die Induktion von Shiga Toxin durch Antibiotika stellt ein gravierendes Problem bei der Behandlung einer EHEC Infektion dar. Es stellte sich damit die Frage ob EcN auch die Shiga Toxin Produktion von induzierten EAHEC Bakterien hemmen kann. Es konnte in Versuchen mit Induktion durch Mitomycin C gezeigt werden, dass EcN nicht nur die Shiga Toxin Produktion von nicht-induzierten EAHEC Bakterien, sondern auch in mit Mitomycin C induzierten Bakterien hemmt. Eine längere Zeitspanne der Co-Inkubation von EcN und EAHEC TY3730 vor Induktion führte zu höherer Hemmung der Shiga Toxin Produktion. Wie bereits erwähnt wurde, kann Aminosäuremangel durch die Produktion von ppGpp die Shiga Toxin Produktion hemmen. Es wird vermutet, dass dies durch die Hemmung der Aktivität des *pR* Promotors und somit der frühen Phase der Phagenentwicklung geschieht (Nowicki et al., 2013). Die negativen Effekte von ppGpp auf die Transkription startend an *pR* wurden bereits für die Phagen ST2-8624 und 933W nachgewiesen (Nejman et al., 2009). Interessanterweise wird hier die Expression von *stx* Genen auch nach Induktion mit Mitomycin C gehemmt (Nowicki et al., 2013). Vermutlich nutzt EcN einen ähnlichen Wirkmechanismus zur Hemmung der Stx Produktion. EcN könnte die Produktion von ppGpp durch die Induktion der ppGpp-Produzenten RelA und SpoT steigern. Ein weiterer denkbarer Mechanismus wäre die Beeinflussung des *pR*-Promotors durch bisher nicht identifizierte Substanzen, die von EcN produziert werden. Nach genauer Klärung des Wirkmechanismus könnten sich hier neue Behandlungsstrategien von EHEC/EAHEC-Infektionen herauskristallisieren. Eine

Kolonisierung von infizierten Patienten mit EcN und eine anschließende Antibiotikabehandlung würde zwar auch EcN töten, könnte aber entscheidend die Nebenwirkung der Antibiotikabehandlung (Stx Produktion) senken. Dies würde Antibiotika erneut als dringend benötigte Behandlungsmöglichkeit von EHEC/EAHEC-Infektionen freigeben. Wird infolge von weiteren Versuchen eine einzelne Substanz entdeckt, die für die beobachtete Wirkung verantwortlich ist, könnte auch diese direkt zur Behandlung eingesetzt werden.

Bei den Versuchen mit biolumineszenten Reporter-Stämmen handelt es sich auf Grund der Zugabe von Ampicillin um Bedingungen, welche die *stx*-Expression induzieren. Diese Versuche können somit nicht direkt mit den davor durchgeführten Versuchen in DMEM-Medium ohne Amp verglichen werden. Die Versuche wurden zudem mit dem verunreinigten DMEM-Medium von PAA durchgeführt, wodurch Wechselwirkungen mit der Toxin Bildung nicht ausgeschlossen werden können. Die Verwendung von SCEM-Medium für zukünftige Versuche würde sich hier anbieten. Abgesehen von diesen technischen Faktoren handelt es sich bei dem C-P Reporter System um ein elegantes System, um die Shiga Toxin Expression in Echtzeit zu beobachten, welches erfolgreich etabliert werden konnte. Es wurde beobachtet, dass Shiga Toxin 1 in Einzelkultur bereits hauptsächlich während der ersten 6 Stunden Inkubation exprimiert wird. Bei Shiga Toxin 2 kommt es zum drastischen Anstieg zwischen 7 und 9 Stunden Inkubation, gefolgt von einer zweiten Spitze bei 16 Stunden. Der Verlauf der Stx Expression in den ersten 12 Stunden stimmt mit bereits veröffentlichten Daten zu biolumineszenten Reporter Stämmen überein (Shimizu et al., 2011). Bei Stx1 konnte eine EcN und Dosis-abhängige Reduktion der Shiga Toxin Expression festgestellt werden. Bei Stx2 wurde eine drastische Reduktion der Stx Expression bei allen getesteten Stämmen beobachtet. Dennoch wirkte sich EcN am effektivsten auf die Hemmung der Stx-Expression aus. Alle Versuche wurden im Stammhintergrund EHEC O157:H7 EDL933 durchgeführt. Auch im C-P Reportersystem konnte die Hemmung der Stx Expression und Stx Produktion, die auch im induzierten System mit Mitomycin C beobachtet wurde, nachgewiesen werden. Es sind hier allerdings noch Modifikationen im Versuchsaufbau nötig, um eine Vergleichbarkeit mit den Stx-ELISA-Ergebnissen sicherzustellen. So könnte der Stamm E(SR) (siehe Abbildung 17) in Stx-ELISA-Versuchen verwendet werden, um den Einfluss der Deletion der Lysis-Gene zu erklären. Daneben wäre bei Verwendung der EDL933-Konstrukte E1E-4S1 und E(SR)2E-4S1 (siehe Abbildung 17) die Untersuchung von den in EHEC EDL933 vorkommenden Shiga Toxin Subklassen (Stx1, Stx2) möglich. Parallel zur Bestimmung der *stx*-Expression und Stx-Produktion könnte die Keimzahl der Bakterien

bestimmt werden. Außerdem wäre im C-P Reporter System das Testen von Substanzen, die für die Hemmwirkung von EcN verantwortlich sein könnten, in Echtzeit möglich. Das System konnte Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Stx Expression geben, was für eine Transkriptomanalyse entscheidend ist. Proben sollten hier bereits während der ersten 10 Stunden einer Co-Inkubation genommen werden, da sich die Stx-Konzentration danach nicht mehr gravierend ändert und der größte Hemmeffekt von EcN somit bereits sehr früh zu beobachten ist.

Insgesamt konnte durch die Studien der Toxinproduktion von EHEC/EAHEC Stämmen in Einzelkultur und Co-Kultur mit EcN erfolgreich nachgewiesen werden, dass EcN die Shiga Toxin Produktion hemmt. Diese Hemmung konnte in unterschiedlichen Medien und verschiedenen EHEC/EAHEC Stämmen gezeigt werden. Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt. Dieser könnte jedoch bei der Produktion von ppGpp durch SpoT oder RelA ansetzen, oder ebenso wie ppGpp den Promotor pR der Shiga Toxin Phagen hemmen. Auch eine Verminderung der Menge des RecA Proteins, welches für die Spaltung des Repressors CI und somit für die Einleitung des lytischen Zykluses verantwortlich ist, wie dies bei NO der Fall ist, ist denkbar.

5.4 Studien der Phagen-Resistenz von EcN

Wie in den bisherigen Versuchen gezeigt wurde, ist ein Einsatz von EcN zur Behandlung von EHEC Infektionen denkbar. Einen wichtigen Aspekt spielt hier die Sicherheit des Einsatzes von EcN. So kann die Freisetzung von Phagen durch Lyse von EHEC Bakterien dazu führen, dass die freigesetzten Phagen andere *E. coli* Stämme (Muniesa et al., 2004; Muniesa et al., 2003; Muniesa et al., 2012) oder andere Genera von Bakterien (Strauch et al., 2001) infizieren. Es sollte deshalb hier überprüft werden, ob EcN sich durch Infektion mit Shiga Toxin Phagen in einen Shiga Toxin Produzenten umwandeln lässt.

In Phagen-Plaques-Assays konnte gezeigt werden, dass EcN, als auch nahe verwandte Stämme wie ABU83972 und CFT073, keine Phagen-Plaques-Bildung zeigten. Hervorzuheben ist hier, dass auch EcNc keine Phagen-Plaques-Bildung zeigte. EcNc wurde von den beiden kryptischen Plasmiden pMUT1 und pMUT2 kuriert. Da die Funktion dieser Plasmide noch unbekannt ist, wurde vermutet, dass diese kryptischen Plasmide möglicherweise vor dem Angriff durch Bakteriophagen schützen (Feldgarden et al., 1995). Dies konnte jedoch in den Versuchen mit den getesteten Shiga Toxin Phagen widerlegt werden. Eine Plaques-Bildung konnte jedoch bei den verwendeten K-12 Stämmen MG1655, HB101 und DH5 α mit den

Phagenisolaten aus den Serotypen O157:H7, O26:H11, O104:H4 und O145:H25 nachgewiesen werden, während die Phagenisolate aus EHEC O103:H2 und O111:H- auch bei den K-12 Stämmen keine Plaque-Bildung zeigten.

Um zu überprüfen, ob eventuell Phagen in das Wirtschromosom von EcN inseriert haben, ohne anschließend Phagen-Plaques zu bilden, wurden *stx*-PCRs durchgeführt. Hier ist noch zu erwähnen, dass EHEC O157:H7 EDL933 zwei, jeweils von den Phagen 933J (*stx1*) und 933W (*stx2*) kodierte Gencluster besitzt. Auch das Ausbleiben der Plaque-Bildung bei den Phagenisolaten aus EHEC O103:H2 und O111:H- sollte dadurch geklärt werden. Hier konnte das *stx2*-Gencluster der Serotypen O157:H7, O26:H11, O104:H4 und O145:H25 in den K-12-Stämmen, nicht aber in EcN nachgewiesen werden. Es war jedoch kein Nachweis des *stx1*-Genclusters der Serotypen O157:H7, O103:H2 und O111:H- in den K-12-Stämmen möglich. Es wurde infolgedessen ein DNase-Verdau der Phagenisolate durchgeführt. DNA die sich nicht innerhalb von Phagenpartikeln befindet, sollte hierdurch abgebaut werden. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass sich Phagenpartikel mit *stx1*-DNA im Phagenisolat von EHEC O157:H7 und EHEC O103:H2 befinden. Beim Phagenisolat von EHEC O111:H- konnte nach dem Verdau kein *stx1*-Gencluster mehr nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass keine Phagenpartikel mit *stx1*-DNA gebildet werden, sondern nur freie DNA vorhanden ist, was zu einem falsch positiven PCR-Ergebnis führt.

Um schließlich zu klären, ob und in welcher Anzahl sich Phagen in den Phagenisolaten befinden wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Bei EHEC O157:H7 EDL933 konnte der in der Literatur bereits untersuchte Phage 933W durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Plunkett et al., 1999). Ebenso konnten Phagen mit sehr ähnlicher Struktur im Isolat von EHEC O26:H11 1530/99 nachgewiesen werden. Im Phagenisolat von EHEC O103:H2 5714/96 wurden auch nach ausgiebiger Suche keine Phagenpartikel entdeckt, obwohl auch nach DNase-Verdau ein Nachweis von *stx1*-DNA möglich war, und somit Phagenpartikel vorhanden sein sollten.

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich schließen, dass bei EHEC O111:H- keine Phagenpartikel gebildet werden, was dazu führt, dass es auch zu keiner Infektion kommt. Bei EHEC O103:H2 hingegen werden Phagenpartikel gebildet, jedoch in sehr geringer Menge, was dazu führte, dass keine Infektion nachweisbar war. EHEC O157:H7 EDL933 dagegen bildete Phagenpartikel mit sowohl *stx1*-Genen (933J-Phagen), als auch *stx2*-Genen (933W-Phagen). Eine erfolgreiche Infektion von K-12 Stämmen war allerdings nur mit dem Phagen 933W möglich. EcN wies eine Resistenz gegen alle getesteten Phagen auf. Eine erfolgreiche

Infektion der K-12 Stämme war mit Phagenisolaten aus O157:H7, O26:H11, O104:H4 und O145:H25 möglich. Es sollte anschließend überprüft werden, ob die Infektion mit Stx-Phagen ausreicht um, wie postuliert (Muniesa et al., 2004; Muniesa et al., 2003; Muniesa et al., 2012), nicht pathogene *E. coli* Stämme in Shiga Toxin produzierende Stämme umzuwandeln. Dies konnte mit allen getesteten Stämmen, die auch von Phagen infiziert wurden, erfolgreich nachgewiesen werden. EcN bildete hier wie erwartet kein Shiga Toxin, was mit den bisherigen Ergebnissen übereinstimmt.

Da hier offensichtlich ein Phagenresistenzmechanismus von EcN zum tragen kommt, sollte nun geklärt werden, um welchen Mechanismus es sich handelt. Es gibt vier verschiedene Phagenresistenzmechanismen, welche man als Verhindern der Adsorption, Verhindern der DNA-Aufnahme, Schneiden von Phagen DNA und 'Abortive Infection' (Abi) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Bakterien nach Infektion mit Bakteriophagen zu einem K^+ -Ausstrom ins umgebende Medium kommt (Cumby et al., 2012). Durch Messung der K^+ -Konzentration kann unterschieden werden, ob eine Phagenresistenz der Bakterien nach Einschleusung der Phagen-DNA ins Cytosol der Wirtszelle ansetzt, oder bereits durch externe Mechanismen hervorgerufen wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei EcN nicht zu einem K^+ -Ausstrom ins umgebende Medium kommt. Somit können Phagenresistenzmechanismen, die nach Infektion ansetzen (Schneiden von DNA, Abi-System) ausgeschlossen werden. Als mögliche Resistenzmechanismen bleiben das Verhindern der Adsorption und der DNA-Aufnahme.

Ein möglicher Resistenzmechanismus ist die Ausbildung einer Kapsel, die als Barriere zu den eigentlichen Phagenrezeptoren dienen kann (Labrie et al., 2010). EcN bildet eine K5-Kapsel welche als Barriere dienen könnte. Allerdings konnte dieser Resistenzmechanismus unter Verwendung der EcN-Mutante EcN Δ K5 ausgeschlossen werden.

Eine weiterer Resistenzmechanismus wäre die Abwesenheit oder Mutation von Phagenrezeptoren, was die Adsorption der Phagen verhindern kann (Labrie et al., 2010). Als Rezeptoren für Shiga Toxin Phagen könnten hier das Membranprotein YeaT (Muniesa et al., 2012; Rohde et al., 2011) oder das Maltoporin LamB dienen (Cumby et al., 2012). YeaT ist auch in *E. coli* Nissle 1917 vorhanden (siehe 7.3) und könnte als Rezeptor dienen, was die Abwesenheit von YaeT als Resistenzmechanismus ausschließt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Mutationen in YaeT von EcN zur Phagenresistenz führen (siehe Anhang). Zu Mutationen im Phagenrezeptor YaeT, die zu Phagenresistenz der Bakterien führen, ist jedoch bis jetzt nichts bekannt.

Durch Homologievergleich der AS-Sequenz von LamB von EcN und MG1655 (siehe 7.4) konnte festgestellt werden, dass zwar nicht die 18 bekannten AS mutiert sind, die zur Resistenz gegen eine Lamda-Phageninfektion führen, es jedoch einen Unterschied in einem Kluster von 8 AS am carboxyterminalen Ende gibt (siehe Anhang: 7.4). Dieser Unterschied könnte für die Blockade der Adsorption der Phagen an den Rezeptor LamB verantwortlich sein. Diese Aminosäuren befinden sich auf der Außenseite der Bakterienzelle, was wiederum dafür spricht, dass diese an der Anheftung der Phagen an LamB beteiligt sein könnten (Gehring et al., 1987) (siehe auch: Abbildung 59 und Abbildung 61).

5.5 Abschließende Worte und Ausblick

Die Kolonisierungsresistenz (CR) ist ein effektiver Mechanismus zur Verhinderung einer Infektion des Darms durch Pathogene. Eine Beeinflussung der CR zur Krankheitsvorbeugung könnte Ausbrüchen wie dem EAHEC Ausbruch von 2011 den Schrecken nehmen. Da dies nur durch eine komplexe Beeinflussung der Mikrobiota im Darm geschehen kann, sind bis zum Erreichen dieses Ziels noch viele Arbeiten notwendig. Hierzu gehört neben einem besseren Verständnis der Mikrobiota auch eine Suche nach geeigneten probiotischen oder kommensalen Bakterienstämmen, nach Pilzen oder sogar Phagen, welche die Darmflora zugunsten ihres Wirtes verändern. Ein grundlegendes Verständnis der verwendeten Bakterien und deren Auswirkungen auf ihren Wirt sind dabei essentiell. Ein sehr vielversprechender probiotischer Bakterienstamm ist hierbei *E. coli* Nissle 1917. Durch seine fast hundertjährige Nutzung als Arzneimittel und weitreichende Forschung während der letzten Jahrzehnte zählt EcN mittlerweile zu einem der am besten untersuchten Probiotika. Dieses Wissen aus Grundlagenforschung und klinischen Studien kann eingesetzt werden, um neue Behandlungsmethoden und Einsatzmöglichkeiten von EcN zu entdecken. So wurde mit dieser Arbeit zum Beispiel der Grundstein für eine vorbeugende Behandlung von EHEC Infektionen durch EcN gelegt. Es konnte in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass EcN die Adhäsion von pathogenen *E. coli* Stämmen, als ersten Schritt einer Infektion, wie EHEC EDL933 oder EAHEC O104:H4 hemmt. Neben der Adhäsion spielen auch noch andere Faktoren wie der Zucker-Metabolismus der Bakterien bei der Kolonisierungsresistenz eine entscheidende Rolle. So konnte von anderen Gruppen bereits gezeigt werden, dass EcN und der kommensale *E. coli* Stamm HS (Leatham et al., 2009; Maltby et al., 2013) die Infektion durch EHEC O157:H7 EDL933 im Mausmodell verhindern können. In Studien der Adhäsion von anderen darmpathogenen Bakterienstämmen (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) im 3D-*in vitro* Zellkulturmodell (Costello et al., 2014) konnte wiederum die Wirksamkeit von

EcN beobachtet werden. Die logische Fortsetzung der Versuche zur antagonistischen Wirkung von EcN auf die Adhäsion von pathogenen *E. coli* Stämmen (EHEC) wäre der Einsatz von einem 3D-*in vitro* Zellkulturmodell mit humanen Epithelzellen und schließlich Primärzellen. Auch die Verwendung von anderen Tiermodellen wie dem Baby-Kaninchen-Modell oder dem gnotobiotischen Ferkelmodell würden der Situation im Menschen näher kommen. Hier könnten Voraussetzungen der Kolonisierung durch pathogene Stämme untersucht und Probiotika getestet werden. Hierbei sollte man sich nicht nur auf einen probiotischen Stamm beschränken, sondern ein Repertoire an Stämmen zur Verfügung haben und auch deren Reaktion aufeinander testen.

Was speziell die Adhäsionsversuche dieser Arbeit betrifft, so sollte noch genau geklärt werden, welchen Einfluss das Mikrozin auf Adhäsion und Wachstum der pathogenen Bakterien hat. Hierzu ist es unerlässlich eine Komplementante der Mikrozin-negativen Mutante SK22D herzustellen und damit die Versuche zu wiederholen.

Die zweite Behandlungsstrategie von EHEC Infektionen durch EcN wäre die Behandlung von bereits infizierten Patienten. Hierbei ist die Shiga Toxin Bildung im Patienten durch die EHEC Bakterien von essentieller Bedeutung. Die Behandlung durch Antibiotika wird durch die damit verbundene Induktion der Shiga Toxin Produktion nicht empfohlen. Auch andere Behandlungsstrategien wie Antikörper oder Impfstoffe stecken noch in den Kinderschuhen. In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass EcN die Shiga Toxin Produktion hemmt. Diese Hemmung konnte in unterschiedlichen Medien und verschiedenen EHEC/EAHEC Stämmen nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt. Dieser könnte jedoch bei der Produktion von ppGpp durch SpoT oder RelA ansetzen, oder ebenso wie ppGpp den Promotor pR der Shiga Toxin Phagen hemmen. In diesem Fall könnte eine Bestimmung der ppGpp Menge (Zhang et al., 2013) zur Klärung beitragen. Auch eine Verminderung der Menge des RecA Proteins, welches für die Spaltung des Repressors CI und somit für die Einleitung des lytischen Zykluses verantwortlich ist, wie dies bei NO der Fall ist, ist denkbar. Hierzu müsste die Menge des RecA Proteins in Western Blots bestimmt werden, oder die Expression von *recA* mit RT-PCR überprüft werden. Eine Transkriptomanalyse würde weitere Aufschlüsse über das Regulationsnetzwerk von Shiga Toxin und speziell der SOS-Antwort geben. Hier könnte dann geklärt werden, an welchem Punkt der Regulation EcN ansetzt. Ist der genaue Mechanismus bekannt, so kann mit der Entwicklung von Behandlungsstrategien begonnen werden. So könnte zum Beispiel ein Patient zunächst mit EcN behandelt werden, gefolgt von einer Antibiotikabehandlung. EcN

würde die Induktion der Stx-Produktion durch die Antibiotika verhindern und einer keimzahlreduzierenden Behandlung würde somit nichts mehr im Wege stehen.

Ein wichtiger Aspekt einer jedweden Behandlung einer Erkrankung ist die Sicherheit des Patienten. So kann die Freisetzung von Phagen durch Lyse der *E. coli* Bakterien dazu führen, dass die freigesetzten Phagen andere *E. coli* Stämme infizieren (Muniesa et al., 2004; Muniesa et al., 2003; Muniesa et al., 2012). Es konnte in dieser Arbeit allerdings deutlich gezeigt werden, dass EcN nicht von den getesteten Shiga Toxin Phagen infiziert wird und so nicht in einen Shiga Toxin Produzenten umgewandelt werden kann. Als dafür verantwortlicher Resistenzmechanismus ist hier möglicherweise ein Unterschied von 8 AS am carboxyterminalen Ende vom Phagenrezeptor LamB verantwortlich. Dies sollte durch Mutation des entsprechenden Bereichs noch geklärt werden. Auch REM-Aufnahmen von Bakterien mit adhärierenden Phagen wären von nutzen, um eine fehlende Adsorption der Phagen an die Bakterien zu visualisieren. Die Isolierung von Phagen in hoher Konzentration und die Wiederholung der Versuche zum K⁺-Efflux würden diese Ergebnisse nochmals bestärken.

Abschließend bleibt zu sagen, dass *E. coli* Nissle 1917 ein sehr vielversprechender und vielseitiger probiotischer Bakterienstamm ist und sein Einsatz zur Behandlung von Infektionskrankheiten des Darms weiter erforscht werden sollte.

6 Literatur

- Al-Hasani, K., Henderson, I.R., Sakellaris, H., Rajakumar, K., Grant, T., Nataro, J.P., Robins-Browne, R., Adler, B., 2000, The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect Immun* 68, 2457-2463.
- Allison, H.E., 2007, Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol* 2, 165-174.
- Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J., Oelschlaeger, T.A., 2004, The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40, 223-229.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Auvray, F., Dilasser, F., Bibbal, D., Kerouredan, M., Oswald, E., Brugere, H., 2012, French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4. *Vet Microbiol* 158, 443-445.
- Bar, F., Von Koschitzky, H., Roblick, U., Bruch, H.P., Schulze, L., Sonnenborn, U., Bottner, M., Wedel, T., 2009, Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. *Neurogastroenterol Motil* 21, 559-566, e516-557.
- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M., 2013, Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a010074.
- Bell, B.P., Goldoft, M., Griffin, P.M., Davis, M.A., Gordon, D.C., Tarr, P.I., Bartleson, C.A., Lewis, J.H., Barrett, T.J., Wells, J.G., et al., 1994, A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272, 1349-1353.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., 2013, Overview of differences between microbial feed additives and probiotics for food regarding regulation, growth promotion effects and health properties and consequences for extrapolation of farm animal results to humans. *Clin Microbiol Infect* 19, 321-330.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H., 2011, Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11, 671-676.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J.M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M.P., Dahbi, G., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2003, Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 41, 1351-1356.

- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
- Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljorge, K., Sonnenborn, U., Schulze, J., Kruis, W., Hacker, J., 2003, Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res Microbiol* 154, 59-66.
- Bodenmiller, D.M., Spiro, S., 2006, The *yjeB* (*nsrR*) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J Bacteriol* 188, 874-881.
- Bommarius, B., Anyanful, A., Izrayelit, Y., Bhatt, S., Cartwright, E., Wang, W., Swimm, A.I., Benian, G.M., Schroeder, F.C., Kalman, D., 2013, A family of indoles regulate virulence and Shiga toxin production in pathogenic *E. coli*. *PLoS One* 8, e54456.
- Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D., 1969, A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41, 459-472.
- Brandt, J.R., Fouser, L.S., Watkins, S.L., Zelikovic, I., Tarr, P.I., Nazar-Stewart, V., Avner, E.D., 1994, *Escherichia coli* O 157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *J Pediatr* 125, 519-526.
- Brashears, M.M., Galyean, M.L., Loneragan, G.H., Mann, J.E., Killinger-Mann, K., 2003, Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot* 66, 748-754.
- Breyton, C., Flayhan, A., Gabel, F., Lethier, M., Durand, G., Boulanger, P., Chami, M., Ebel, C., 2013, Assessing the conformational changes of pb5, the receptor-binding protein of phage T5, upon binding to its *Escherichia coli* receptor FhuA. *J Biol Chem* 288, 30763-30772.
- Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F.D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., Daniel, R., 2011, Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 193, 883-891.
- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Bohmer, M.M., Renschmidt, C., Wilking, H., Delere, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Hohle, M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Lubber, P., Rosner, B., Stark, K., Kuhne, M., 2011, German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* 365, 1763-1770.
- Callaway, T.R., Anderson, R.C., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Bischoff, K.M., Poole, T.L., Jung, Y.S., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2004, What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J Anim Sci* 82 E-Suppl, E93-99.
- Campbell, A., 2003, The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* 4, 471-477.

- Carey, C.M., Kostrzynska, M., Ojha, S., Thompson, S., 2008, The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods* 73, 125-132.
- Carniel, E., Guilvout, I., Prentice, M., 1996, Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 178, 6743-6751.
- Castillo, F.J., Bartell, P.F., 1976, Localization and functional role of the pseudomonas bacteriophage 2 depolymerase. *J Virol* 18, 701-708.
- Chasteen, T.G., Fuentes, D.E., Tantalean, J.C., Vasquez, C.C., 2009, Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33, 820-832.
- Chatterjee, S., Rothenberg, E., 2012, Interaction of bacteriophage 1 with its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses* 4, 3162-3178.
- Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., Sperandio, V., 2006, The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10420-10425.
- Costello, C.M., Sorna, R.M., Goh, Y.L., Cengic, I., Jain, N.K., March, J.C., 2014, 3-D Intestinal Scaffolds for Evaluating the Therapeutic Potential of Probiotics. *Mol Pharm.*
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005, Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3, 777-788.
- Cumby, N., Edwards, A.M., Davidson, A.R., Maxwell, K.L., 2012, The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. *J Bacteriol* 194, 5012-5019.
- Datz, M., Janetzki-Mittmann, C., Franke, S., Gunzer, F., Schmidt, H., Karch, H., 1996, Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. *Appl Environ Microbiol* 62, 791-797.
- Delmas, Y., Vendrely, B., Clouzeau, B., Bachir, H., Bui, H.N., Lacraz, A., Helou, S., Bordes, C., Reffet, A., Llanas, B., Skopinski, S., Rolland, P., Gruson, D., Combe, C., 2014, Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 haemolytic uraemic syndrome in France: outcome with eculizumab. *Nephrol Dial Transplant* 29, 565-572.
- Destoumieux-Garzon, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., Boulanger, P., 2005, The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem J* 389, 869-876.
- DGI, 2011a, EHEC und Antibiotikabehandlung.
- DGI 2011b. Menigokokkenprävention und Eculizumab-Behandlung im Rahmen von EHEC-assoziierten HUS.
- Dixit, S., Kailasapathy, K., 2005, Bacterial diversity of *Escherichia coli* in the gut: a reason to re-evaluate probiotic formulations? *Curr Issues Intest Microbiol* 6, 17-23.

- Donohue-Rolfe, A., Keusch, G.T., 1983, *Shigella dysenteriae* 1 cytotoxin: periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock. *Infect Immun* 39, 270-274.
- Eaton, K.A., Honkala, A., Auchtung, T.A., Britton, R.A., 2011, Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. *Infect Immun* 79, 185-191.
- EFSA 2011. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Germany and France (European Food Safety Authority).
- Elam, N.A., Gleghorn, J.F., Rivera, J.D., Galyean, M.L., Defoor, P.J., Brashears, M.M., Younts-Dahl, S.M., 2003, Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *J Anim Sci* 81, 2686-2698.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., Igarashi, K., 1988, Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* 171, 45-50.
- Falguieres, T., Johannes, L., 2006, Shiga toxin B-subunit binds to the chaperone BiP and the nucleolar protein B23. *Biol Cell* 98, 125-134.
- FAO/WHO 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (Cordoba).
- Feldgarden, M., Golden, S., Wilson, H., Riley, M.A., 1995, Can phage defence maintain colicin plasmids in *Escherichia coli*? *Microbiology* 141 (Pt 11), 2977-2984.
- Fitzgerald-Hughes, D., Bolkvadze, D., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Ryan, M., Burke, L., Stevens, N., Humphreys, H., Kutateladze, M., 2014, Susceptibility of extended-spectrum- beta-lactamase-producing *Escherichia coli* to commercially available and laboratory-isolated bacteriophages. *J Antimicrob Chemother* 69, 1148-1150.
- Floch, M.H., Walker, W.A., Madsen, K., Sanders, M.E., Macfarlane, G.T., Flint, H.J., Dieleman, L.A., Ringel, Y., Guandalini, S., Kelly, C.P., Brandt, L.J., 2011, Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol* 45 Suppl, S168-171.
- Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D., James, M.N., 2004, Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279, 27511-27517.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., Taylor, T.D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H., 2011, Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547.
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T.D., Ohno, H., Hattori, M., 2012, Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes* 3, 449-454.

- Garred, O., Dubinina, E., Holm, P.K., Olsnes, S., van Deurs, B., Kozlov, J.V., Sandvig, K., 1995a, Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants. *Exp Cell Res* 218, 39-49.
- Garred, O., van Deurs, B., Sandvig, K., 1995b, Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 270, 10817-10821.
- Gehring, K., Charbit, A., Brissaud, E., Hofnung, M., 1987, Bacteriophage lambda receptor site on the *Escherichia coli* K-12 LamB protein. *J Bacteriol* 169, 2103-2106.
- Girod, A., Storrle, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T., Pepperkok, R., 1999, Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1, 423-430.
- Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M., Mendz, G.L., Newton, J.C., Cheng, Y., Mobley, H.L., Wilson, K.T., 2001, *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13844-13849.
- Grant, J., Wendelboe, A.M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C., Rolfs, R.T., 2008, Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerg Infect Dis* 14, 1633-1636.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D., 1990, Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645-4649.
- Greig, J.D., Ravel, A., 2009, Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol* 130, 77-87.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Dobrindt, U., 2004, Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 186, 5432-5441.
- Grozdanov, L., Zahringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y.A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E.T., Dobrindt, U., 2002, A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 184, 5912-5925.
- Hale, T.L., Formal, S.B., 1980, Cytotoxicity of *Shigella dysenteriae* 1 for cultured mammalian cells. *Am J Clin Nutr* 33, 2485-2490.
- Hancock, V., Vejborg, R.M., Klemm, P., 2010, Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Mol Genet Genomics* 284, 437-454.
- Harrington, S.M., Dudley, E.G., Nataro, J.P., 2006, Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 254, 12-18.
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B.M., Bolbot, Y.K., Maydannik, V.G., Elze, M., Wolff, C., Schulze, J., 2007, The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr* 166, 311-318.

- Henker, J., Laass, M.W., Blokhin, B.M., Maydannik, V.G., Bolbot, Y.K., Elze, M., Wolff, C., Schreiner, A., Schulze, J., 2008, Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 27, 494-499.
- Herman, C., Ogura, T., Tomoyasu, T., Hiraga, S., Akiyama, Y., Ito, K., Thomas, R., D'Ari, R., Boulloc, P., 1993, Cell growth and lambda phage development controlled by the same essential *Escherichia coli* gene, *ftsH/hflB*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10861-10865.
- Hernandez-Doria, J.D., Sperandio, V., 2013, Nutrient and chemical sensing by intestinal pathogens. *Microbes Infect* 15, 759-764.
- Hirst, T.R., Sanchez, J., Kaper, J.B., Hardy, S.J., Holmgren, J., 1984, Mechanism of toxin secretion by *Vibrio cholerae* investigated in strains harboring plasmids that encode heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7752-7756.
- Horvath, P., Barrangou, R., 2010, CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167-170.
- Hoyt, M.A., Knight, D.M., Das, A., Miller, H.I., Echols, H., 1982, Control of phage lambda development by stability and synthesis of cII protein: role of the viral cIII and host hflA, himA and himD genes. *Cell* 31, 565-573.
- Ito, K., Akiyama, Y., 2005, Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol* 59, 211-231.
- Jacewicz, M., Clausen, H., Nudelman, E., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G.T., 1986, Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J Exp Med* 163, 1391-1404.
- Jacobi, C.A., Grundler, S., Hsieh, C.J., Frick, J.S., Adam, P., Lamprecht, G., Autenrieth, I.B., Gregor, M., Malferteiner, P., 2012, Quorum sensing in the probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor) - evidence that furanosyl borate diester (AI-2) is influencing the cytokine expression in the DSS colitis mouse model. *Gut Pathog* 4, 8.
- Jaeger, J.L., Acheson, D.W., 2000, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Curr Infect Dis Rep* 2, 61-67.
- Jay, M.T., Garrett, V., Mohle-Boetani, J.C., Barros, M., Farrar, J.A., Rios, R., Abbott, S., Sowadsky, R., Komatsu, K., Mandrell, R., Sobel, J., Werner, S.B., 2004, A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection linked to consumption of beef tacos at a fast-food restaurant chain. *Clin Infect Dis* 39, 1-7.
- Johannes, L., Römer, W., 2010, Shiga toxins — from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*.
- Johnson, A., Meyer, B.J., Ptashne, M., 1978, Mechanism of action of the cro protein of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1783-1787.

- Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T., Sasakawa, C., 2000, SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 38, 805-816.
- Kanjee, U., Ogata, K., Houry, W.A., 2012, Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Mol Microbiol* 85, 1029-1043.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004, Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
- Karch, H., Denamur, E., Dobrindt, U., Finlay, B.B., Hengge, R., Johannes, L., Ron, E.Z., Tonjum, T., Sansonetti, P.J., Vicente, M., 2012, The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med* 4, 841-848.
- Kihara, A., Akiyama, Y., Ito, K., 1997, Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5544-5549.
- Kim, S.K., Bhatnagar, I., Kang, K.H., 2012, Development of marine probiotics: prospects and approach. *Adv Food Nutr Res* 65, 353-362.
- Kimmitt, P.T., Harwood, C.R., Barer, M.R., 2000, Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* 6, 458-465.
- King, G., Murray, N.E., 1995, Restriction alleviation and modification enhancement by the Rac prophage of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 16, 769-777.
- Kitov, P.I., Sadowska, J.M., Mulvey, G., Armstrong, G.D., Ling, H., Pannu, N.S., Read, R.J., Bundle, D.R., 2000, Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature* 403, 669-672.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998, Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41, 103-125.
- Klemm, P., Roos, V., Ulett, G.C., Svanborg, C., Schembri, M.A., 2006, Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen. *Infect Immun* 74, 781-785.
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J., 2004, Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623.
- Kuczynska-Wisnik, D., Kedzierska, S., Matuszewska, E., Lund, P., Taylor, A., Lipinska, B., Laskowska, E., 2002, The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured in vivo during extreme heat shock. *Microbiology* 148, 1757-1765.
- Kuczynska-Wisnik, D., Matuszewska, E., Furmanek-Blaszk, B., Leszczynska, D., Grudowska, A., Szczepaniak, P., Laskowska, E., 2010, Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling. *Res Microbiol* 161, 847-853.

- Kulkarni, A.A., Fuller, C., Korman, H., Weiss, A.A., Iyer, S.S., 2010, Glycan encapsulated gold nanoparticles selectively inhibit shiga toxins 1 and 2. *Bioconjug Chem* 21, 1486-1493.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S., 2010, Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 8, 317-327.
- Laing, C.R., Zhang, Y., Gilmour, M.W., Allen, V., Johnson, R., Thomas, J.E., Gannon, V.P., 2012, A comparison of Shiga-toxin 2 bacteriophage from classical enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes and the German *E. coli* O104:H4 outbreak strain. *PLoS One* 7, e37362.
- Lakshmi, B., Viswanath, B., Sai Gopal, D.V., 2013, Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J Pathog* 2013, 424123.
- Langenscheid, J., Killmann, H., Braun, V., 2004, A FhuA mutant of *Escherichia coli* is infected by phage T1-independent of TonB. *FEMS Microbiol Lett* 234, 133-137.
- LaPointe, P., Wei, X., Gariepy, J., 2005, A role for the protease-sensitive loop region of Shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen. *J Biol Chem* 280, 23310-23318.
- Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Sandvig, K., 2004, Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J Cell Sci* 117, 2321-2331.
- Lawley, T.D., Walker, A.W., 2013, Intestinal colonization resistance. *Immunology* 138, 1-11.
- Lea, N., Lord, J.M., Roberts, L.M., 1999, Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* 145 (Pt 5), 999-1004.
- Leatham, M.P., Banerjee, S., Autieri, S.M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., Cohen, P.S., 2009, Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun* 77, 2876-2886.
- Lee, H.H., Molla, M.N., Cantor, C.R., Collins, J.J., 2010, Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467, 82-85.
- Lee, J.H., Lee, J., 2010, Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 34, 426-444.
- Licence, K., Oates, K.R., Synge, B.A., Reid, T.M., 2001, An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol Infect* 126, 135-138.
- Lindberg, A.A., Brown, J.E., Stromberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E., Karlsson, K.A., 1987, Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem* 262, 1779-1785.
- Lobysheva, II, Stupakova, M.V., Mikoyan, V.D., Vasilieva, S.V., Vanin, A.F., 1999, Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide

- donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. *FEBS Lett* 454, 177-180.
- Los, J.M., Los, M., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., 2010, Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58, 322-329.
- Los, J.M., Los, M., Wegrzyn, G., Wegrzyn, A., 2009, Differential efficiency of induction of various lambdoid prophages responsible for production of Shiga toxins in response to different induction agents. *Microb Pathog* 47, 289-298.
- Louwen, R., Staals, R.H., Endtz, H.P., van Baarlen, P., van der Oost, J., 2014, The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 78, 74-88.
- Lu, M.J., Stierhof, Y.D., Henning, U., 1993, Location and unusual membrane topology of the immunity protein of the *Escherichia coli* phage T4. *J Virol* 67, 4905-4913.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B., Johannes, L., 1998, Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* 143, 973-990.
- Maltby, R., Leatham-Jensen, M.P., Gibson, T., Cohen, P.S., Conway, T., 2013, Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 8, e53957.
- Marteau, P., Shanahan, F., 2003, Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 725-740.
- McFarland, L.V., Dublin, S., 2008, Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 14, 2650-2661.
- McKenzie, J., Johannes, L., Taguchi, T., Sheff, D., 2009, Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. *FEBS J* 276, 1581-1595.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999, Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Kock, R., Friedrich, A.W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M.A., Karch, H., 2008, Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 14, 1287-1290.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S.F., Henkhaus, J.K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P.M., Moore, R.L., Guenther, S., Rothberg, J.M., Karch, H., 2011, Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6, e22751.

- Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B., 2003, Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des* 9, 175-191.
- Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., Hendershot, L.M., 2002, A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 13, 4456-4469.
- Miceli, S., Jure, M.A., de Saab, O.A., de Castillo, M.C., Rojas, S., de Holgado, A.P., de Nader, O.M., 1999, A clinical and bacteriological study of children suffering from haemolytic uraemic syndrome in Tucuman, Argentina. *Jpn J Infect Dis* 52, 33-37.
- Michael, M., Elliott, E.J., Craig, J.C., Ridley, G., Hodson, E.M., 2009, Interventions for hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis* 53, 259-272.
- Michel, B., 2005, After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol* 3, e255.
- Moak, M., Molineux, I.J., 2000, Role of the Gp16 lytic transglycosylase motif in bacteriophage T7 virions at the initiation of infection. *Mol Microbiol* 37, 345-355.
- Mohawk, K.L., Melton-Celsa, A.R., Robinson, C.M., O'Brien, A.D., 2010, Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine* 28, 4777-4785.
- Molineux, I.J., 1991, Host-parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol* 3, 230-236.
- Mollenbrink, M., Bruckschen, E., 1994, [Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor)]. *Med Klin (Munich)* 89, 587-593.
- Montrose, D.C., Floch, M.H., 2005, Probiotics used in human studies. *J Clin Gastroenterol* 39, 469-484.
- Muhldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G.T., Acheson, D.W., Tschape, H., Kane, A.V., Ritter, A., Olschlager, T., Donohue-Rolfe, A., 1996, Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 64, 495-502.
- Mukherjee, J., Chios, K., Fishwild, D., Hudson, D., O'Donnell, S., Rich, S.M., Donohue-Rolfe, A., Tzipori, S., 2002, Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* 70, 612-619.
- Muniesa, M., Blanco, J.E., De Simon, M., Serra-Moreno, R., Blanch, A.R., Jofre, J., 2004, Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* 150, 2959-2971.
- Muniesa, M., de Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Panella, H., Jofre, J., 2003, Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun* 71, 4554-4562.

- Muniesa, M., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Appel, B., Brussow, H., 2012, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78, 4065-4073.
- Nassar, F.J., Rahal, E.A., Sabra, A., Matar, G.M., 2013, Effects of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin release and role of the SOS response. *Foodborne Pathog Dis* 10, 805-812.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998, Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142-201.
- Neil, K.P., Biggerstaff, G., MacDonald, J.K., Trees, E., Medus, C., Musser, K.A., Stroika, S.G., Zink, D., Sotir, M.J., 2012, A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough--United States, 2009. *Clin Infect Dis* 54, 511-518.
- Nejman, B., Los, J.M., Los, M., Wegrzyn, G., Wegrzyn, A., 2009, Plasmids derived from lambdoid bacteriophages as models for studying replication of mobile genetic elements responsible for the production of Shiga toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17, 211-220.
- Nejman, B., Nadratowska-Wesolowska, B., Szalewska-Palasz, A., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., 2011, Replication of plasmids derived from Shiga toxin-converting bacteriophages in starved *Escherichia coli*. *Microbiology* 157, 220-233.
- Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Cheasty, T., Haruki, K., 2000, Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 38, 2440-2442.
- Nissle, 1918, Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien. *Med Klein* 2, 29-30.
- Nougayrede, J.P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., Oswald, E., 2006, *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848-851.
- Nowicki, D., Kobiela, W., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., Szalewska-Palasz, A., 2013, ppGpp-dependent negative control of DNA replication of Shiga toxin-converting bacteriophages in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195, 5007-5015.
- O'Brien, A.D., Holmes, R.K., 1987, Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 51, 206-220.
- O'Brien, A.O., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B., 1983, *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* 1, 702.
- Ohland, C.L., Macnaughton, W.K., 2010, Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G807-819.

- Okeke, I.N., Wallace-Gadsden, F., Simons, H.R., Matthews, N., Labar, A.S., Hwang, J., Wain, J., 2010, Multi-locus sequence typing of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Nigerian children uncovers multiple lineages. PLoS One 5, e14093.
- Oppenheim, A.B., Kobiler, O., Stavans, J., Court, D.L., Adhya, S., 2005, Switches in bacteriophage lambda development. Annu Rev Genet 39, 409-429.
- Ostroff, S.M., Kobayashi, J.M., Lewis, J.H., 1989, Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. JAMA 262, 355-359.
- Pacheco, A.R., Sperandio, V., 2012, Shiga toxin in enterohemorrhagic E.coli: regulation and novel anti-virulence strategies. Front Cell Infect Microbiol 2, 81.
- Parma, D.H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E., Gold, L., 1992, The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. Genes Dev 6, 497-510.
- Patzer, S.I., Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F., Hantke, K., 2003, The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. Microbiology 149, 2557-2570.
- Pedruzzi, I., Rosenbusch, J.P., Locher, K.P., 1998, Inactivation in vitro of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein. FEMS Microbiol Lett 168, 119-125.
- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001, Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature 409, 529-533.
- Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., Wende, W., 2005a, Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. Cell Mol Life Sci 62, 685-707.
- Pingoud, V., Sudina, A., Geyer, H., Bujnicki, J.M., Lurz, R., Luder, G., Morgan, R., Kubareva, E., Pingoud, A., 2005b, Specificity changes in the evolution of type II restriction endonucleases: a biochemical and bioinformatic analysis of restriction enzymes that recognize unrelated sequences. J Biol Chem 280, 4289-4298.
- Plunkett, G., 3rd, Rose, D.J., Durfee, T.J., Blattner, F.R., 1999, Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. J Bacteriol 181, 1767-1778.
- Polzin, S., Huber, C., Eylert, E., Elsenhans, I., Eisenreich, W., Schmidt, H., 2013, Growth media simulating ileal and colonic environments affect the intracellular proteome and carbon fluxes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. Appl Environ Microbiol 79, 3703-3715.
- Potrykus, K., Cashel, M., 2008, (p)ppGpp: still magical? Annu Rev Microbiol 62, 35-51.

- Proulx, F., Turgeon, J.P., Delage, G., Lafleur, L., Chicoine, L., 1992, Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J Pediatr* 121, 299-303.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L., 2005, Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11, 603-609.
- Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li de, R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R., Sperandio, V., 2008, Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* 321, 1078-1080.
- Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F., Paxinos, E.E., Sebra, R., Chin, C.S., Iliopoulos, D., Klammer, A., Peluso, P., Lee, L., Kislyuk, A.O., Bullard, J., Kasarskis, A., Wang, S., Eid, J., Rank, D., Redman, J.C., Steyert, S.R., Fridmodt-Moller, J., Struve, C., Petersen, A.M., Krogfelt, K.A., Nataro, J.P., Schadt, E.E., Waldor, M.K., 2011, Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* 365, 709-717.
- Reissbrodt, R., Hammes, W.P., dal Bello, F., Prager, R., Fruth, A., Hantke, K., Rakin, A., Starcic-Erjavec, M., Williams, P.H., 2009, Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 290, 62-69.
- Rembacken, B.J., Snelling, A.M., Hawkey, P.M., Chalmers, D.M., Axon, A.T., 1999, Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639.
- Riede, I., Eschbach, M.L., 1986, Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 205, 241-245.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L., 1983, Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308, 681-685.
- RKI 2011. Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch (Berlin).
- RKI 2013. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2012.
- Rodionov, D.A., Dubchak, I.L., Arkin, A.P., Alm, E.J., Gelfand, M.S., 2005, Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput Biol* 1, e55.
- Rodrigue, D.C., Mast, E.E., Greene, K.D., Davis, J.P., Hutchinson, M.A., Wells, J.G., Barrett, T.J., Griffin, P.M., 1995, A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* 172, 1122-1125.
- Rohde, H., Qin, J., Cui, Y., Li, D., Loman, N.J., Hentschke, M., Chen, W., Pu, F., Peng, Y., Li, J., Xi, F., Li, S., Li, Y., Zhang, Z., Yang, X., Zhao, M., Wang, P., Guan, Y., Cen,

- Z., Zhao, X., Christner, M., Kobbe, R., Loos, S., Oh, J., Yang, L., Danchin, A., Gao, G.F., Song, Y., Yang, H., Wang, J., Xu, J., Pallen, M.J., Aepfelbacher, M., Yang, R., 2011, Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med* 365, 718-724.
- Rokney, A., Kobiler, O., Amir, A., Court, D.L., Stavans, J., Adhya, S., Oppenheim, A.B., 2008, Host responses influence on the induction of lambda prophage. *Mol Microbiol* 68, 29-36.
- Roos, V., Schembri, M.A., Ulett, G.C., Klemm, P., 2006, Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 carries mutations in the foc locus and is unable to express F1C fimbriae. *Microbiology* 152, 1799-1806.
- Rund, S.A., Rohde, H., Sonnenborn, U., Oelschlaeger, T.A., 2013, Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *Int J Med Microbiol* 303, 1-8.
- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000, Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181, 1753-1754.
- Saint-Pol, A., Yelamos, B., Amessou, M., Mills, I.G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H.T., Lamaze, C., Johannes, L., 2004, Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* 6, 525-538.
- Salvadori, M., Bertoni, E., 2013, Update on hemolytic uremic syndrome: Diagnostic and therapeutic recommendations. *World J Nephrol* 2, 56-76.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Brown, J.E., Petersen, O.W., van Deurs, B., 1989, Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol* 108, 1331-1343.
- Saxena, S.K., O'Brien, A.D., Ackerman, E.J., 1989, Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 264, 596-601.
- Schiemann, S., Schulze, Müller, 2010, *E. coli* Bedeutung in Forschung und Medizin. Alfred-Nissle-Gesellschaft, 88 p.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., Fellermann, K., 2007, Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 75, 2399-2407.
- Schmidt, H., 2001, Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* 152, 687-695.
- Schmidt, H., Geitz, C., Tarr, P.I., Frosch, M., Karch, H., 1999, Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* 179, 115-123.
- Schmidt, M.A., 2010, LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular Microbiology* 12, 1544-1552.

- Schultz, M., 2008, Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1012-1018.
- Schulze, J., Sonnenborn, U., Oelschlaeger, T., Kruis, W., 2008, Probiotika - Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003, SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31, 3381-3385.
- Servin, A.L., 2004, Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 405-440.
- Sherman, P.M., Ossa, J.C., Johnson-Henry, K., 2009, Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr Clin Pract* 24, 10-14.
- Shimizu, T., Ohta, Y., Tsutsuki, H., Noda, M., 2011, Construction of a novel bioluminescent reporter system for investigating Shiga toxin expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gene* 478, 1-10.
- Shkilnyj, P., Koudelka, G.B., 2007, Effect of salt shock on stability of lambdaimm434 lysogens. *J Bacteriol* 189, 3115-3123.
- Slominska, M., Neubauer, P., Wegrzyn, G., 1999, Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology* 262, 431-441.
- Smet, A., Van Nieuwerburgh, F., Vandekerckhove, T.T., Martel, A., Deforce, D., Butaye, P., Haesebrouck, F., 2010, Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PLoS One* 5, e11202.
- Smith, D.L., James, C.E., Sergeant, M.J., Yaxian, Y., Saunders, J.R., McCarthy, A.J., Allison, H.E., 2007, Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria. *J Bacteriol* 189, 7223-7233.
- Snyder, L., 1995, Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol Microbiol* 15, 415-420.
- Sodha, S.V., Lynch, M., Wannemuehler, K., Leeper, M., Malavet, M., Schaffzin, J., Chen, T., Langer, A., Glenshaw, M., Hoefler, D., Dumas, N., Lind, L., Iwamoto, M., Ayers, T., Nguyen, T., Biggerstaff, M., Olson, C., Sheth, A., Braden, C., 2011, Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with a national fast-food chain, 2006: a study incorporating epidemiological and food source traceback results. *Epidemiol Infect* 139, 309-316.
- Sonnenborn, U., Schulze, J., 2009, The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 - features of a versatile probiotic. *Microb Ecol Health Dis*, 122-158.
- Sorek, R., Kunin, V., Hugenholtz, P., 2008, CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6, 181-186.

- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., Kaper, J.B., 1999, Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15196-15201.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A., Kaper, J.B., 2001, Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 183, 5187-5197.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B., 2003, Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8951-8956.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Tyrrell, G.J., Brunton, J.L., Read, R.J., 1992, Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 355, 748-750.
- Stelzner, K., 2013. Studien zum Beitrag von Mikrozininen und weiteren Faktoren zur antagonistischen Aktivität des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 Stammes gegen EHEC-Stämme. Master Thesis. Würzburg, Würzburg.
- Stirm, S., 1968, *Escherichia coli* K bacteriophages. I. Isolation and introductory characterization of five *Escherichia coli* K bacteriophages. *J Virol* 2, 1107-1114.
- Strauch, E., Lurz, R., Beutin, L., 2001, Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*. *Infect Immun* 69, 7588-7595.
- Suzuki, H., 2012, Host-Mimicking Strategies in DNA Methylation for Improved Bacterial Transformation, Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. InTech.
- Svenningsen, S.L., Costantino, N., Court, D.L., Adhya, S., 2005, On the role of Cro in lambda prophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4465-4469.
- Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L., 2005, Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* 365, 1073-1086.
- Teitelbaum, J.E., Walker, W.A., 2002, Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 22, 107-138.
- Tilden, J., Jr., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., Morris, J.G., Jr., 1996, A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 86, 1142-1145.
- Trachtman, H., Cnaan, A., Christen, E., Gibbs, K., Zhao, S., Acheson, D.W., Weiss, R., Kaskel, F.J., Spitzer, A., Hirschman, G.H., 2003, Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 1337-1344.
- Tyler, J.S., Mills, M.J., Friedman, D.I., 2004, The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol* 186, 7670-7679.

- Valdebenito, M., Crumbliss, A.L., Winkelmann, G., Hantke, K., 2006, Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int J Med Microbiol* 296, 513-520.
- Vareille, M., de Sablet, T., Hindre, T., Martin, C., Gobert, A.P., 2007, Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10199-10204.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzon, D., Lombard, C., Rebuffat, S., Peduzzi, J., 2010, Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 288-297.
- Vejborg, R.M., Friis, C., Hancock, V., Schembri, M.A., Klemm, P., 2010, A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972. *Mol Genet Genomics* 283, 469-484.
- von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T., Krueger, M., 2005, *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J Dairy Sci* 88, 317-323.
- Wagner, P.L., Livny, J., Neely, M.N., Acheson, D.W., Friedman, D.I., Waldor, M.K., 2002, Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44, 957-970.
- Wagner, P.L., Neely, M.N., Zhang, X., Acheson, D.W., Waldor, M.K., Friedman, D.I., 2001, Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* 183, 2081-2085.
- Waldor, M.K., Friedman, D.I., 2005, Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* 8, 459-465.
- Walters, M., Sircili, M.P., Sperandio, V., 2006, AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 5668-5681.
- Walters, M., Sperandio, V., 2006, Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 74, 5445-5455.
- Wang, D., Ding, X., Rather, P.N., 2001, Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 4210-4216.
- Wegrzyn, G., Wegrzyn, A., 2005, Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79, 1-48.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schroder, J.M., Stange, E.F., 2004, NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72, 5750-5758.
- Wendel, A.M., Johnson, D.H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J.R., Monson, T., Koschmann, C., Davis, J.P., 2009, Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection

- associated with consumption of packaged spinach, August-September 2006: the Wisconsin investigation. *Clin Infect Dis* 48, 1079-1086.
- Widiasih, D.A., Ido, N., Omoe, K., Sugii, S., Shinagawa, K., 2004, Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 132, 67-75.
- Wieler, L.H., Semmler, T., Eichhorn, I., Antao, E.M., Kinnemann, B., Geue, L., Karch, H., Guenther, S., Bethe, A., 2011, No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. *Gut Pathog* 3, 17.
- Wong, C.S., Jelacic, S., Habeeb, R.L., Watkins, S.L., Tarr, P.I., 2000, The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 342, 1930-1936.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W., 1989, Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17, 3469-3478.
- Yanofsky, C., Horn, V., Gollnick, P., 1991, Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 6009-6017.
- Young, R., 2002, Bacteriophage holins: deadly diversity. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 21-36.
- Younts-Dahl, S.M., Osborn, G.D., Galyean, M.L., Rivera, J.D., Loneragan, G.H., Brashears, M.M., 2005, Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *J Food Prot* 68, 6-10.
- Yu, M., Haslam, D.B., 2005, Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun* 73, 2524-2532.
- Zabeau, M., Friedman, S., Van Montagu, M., Schell, J., 1980, The *ral* gene of phage lambda. I. Identification of a non-essential gene that modulates restriction and modification in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 179, 63-73.
- Zaleski, P., Wojciechowski, M., Piekarowicz, A., 2005, The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. *Microbiology* 151, 3361-3369.
- Zhang, P., Wang, Y., Chang, Y., Xiong, Z.H., Huang, C.Z., 2013, Highly selective detection of bacterial alarmone ppGpp with an off-on fluorescent probe of copper-mediated silver nanoclusters. *Biosens Bioelectron* 49, 433-437.
- Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., Karch, H., 2002, Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx*(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 40, 1441-1446.
- Zhang, X.H., He, K.W., Zhang, S.X., Lu, W.C., Zhao, P.D., Luan, X.T., Ye, Q., Wen, L.B., Li, B., Guo, R.L., Wang, X.M., Lv, L.X., Zhou, J.M., Yu, Z.Y., Mao, A.H., 2011,

- Subcutaneous and intranasal immunization with Stx2B-Tir-Stx1B-Zot reduces colonization and shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in mice. *Vaccine* 29, 3923-3929.
- Zhao, T., Tkalcic, S., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Zhao, P., 2003, Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 66, 924-930.
- Zuccotti, G.V., Meneghin, F., Raimondi, C., Dillo, D., Agostoni, C., Riva, E., Giovannini, M., 2008, Probiotics in clinical practice: an overview. *J Int Med Res* 36 Suppl 1, 1A-53A.

7 Anhang

7.1 Sicherheitsinformation betreffend PAA Kälberserum



DRINGENDE SICHERHEITSINFORMATION

Interne GE Healthcare Ref.-Nr.: FMI 90200

24. April 2013

An: Leiter Beschaffung
Leiter Qualität

Betreff: Fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum (FBS)) 3-21 100 ml und 500 ml, Quantum 3-21 100 ml und 500 ml von PAA Laboratories für Invitro-Diagnoseanwendungen; falsch beschriftet.

GE Healthcare ist auf eine potenziell nicht konforme Produktbeschriftung der nachfolgend aufgelisteten fetalen Kälberserumprodukte (Fetal Bovine Serum (FBS)) von PAA Laboratories aufmerksam geworden. Bitte stellen Sie sicher, dass alle potenziellen Anwender in Ihrer Einrichtung auf diese Benachrichtigung aufmerksam gemacht werden und die folgenden Anweisungen befolgen.

Sicherheitsproblem (1) Die nachfolgend aufgelisteten FBS-Produkte, welche als 'Speziälersera ausgewiesen werden, können Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin (BSA)) US-amerikanischen Ursprungs, Wasser und/oder das Zellwachstum fördernde Zusatzstoffe enthalten.

(2) Für außerhalb der USA ausgelieferte FBS-Produkte wird in der Produktbeschriftung der nachfolgend aufgelisteten Produkte angegeben, dass das Produkt aus Gebieten stammt, die seitens Australien oder der EU als Ursprung für Serum genehmigt worden sind. Zusätzlich oder anstelle des Produktes dieses Ursprungs, kann das Produkt aus den USA stammendes BSA ausgewachsener Tiere und/oder fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum (FBS)) US-amerikanischen, kanadischen, argentinischen, brasilianischen und/oder mexikanischen Ursprungs enthalten.

Vorsichtsmaßnahmen

Produkt-Code	Produktname	Behandlung
A15-110	500 ml Fetal Bovine Serum 3-21	Amnionzellengetestet
A21-110	100 ml Fetal Bovine Serum 3-21	Amnionzellengetestet
U11-020	100 ml Quantum 3-21	CE-zertifiziert, Medium für Amnion- und Chorion-Villi-Zellen
U15-020	500 ml Quantum 3-21	CE-zertifiziert, Medium für Amnion- und Chorion-Villi-Zellen
U11-022	100 ml Quantum BPL	Kultivierung und Wachstum humaner Lymphozyten Für Zwecke der <i>In-Vitro</i> -Diagnose
U15-022	500 ml Quantum BPL	Kultivierung und Wachstum humaner Lymphozyten Für Zwecke der <i>In-Vitro</i> -Diagnose

Korrekturmaßnahmen am System Geben Sie alle nicht genutzten Produkte zurück und bitten Sie um Kostenrückerstattung. Klären Sie mit Ihrem örtlichen Kundendienstberater, wie das Produkt an uns zurückzugeben ist.

Ansprechpartner Bei Fragen zu dieser Korrekturmaßnahme oder zur Identifikation der betroffenen Produkte wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen Vertriebs- oder Servicerepräsentanten oder an das Service Center unseres Technischen Kundendienstes.

<ADDITIONAL LOCALIZATION INFORMATION>

GE Healthcare bestätigt, dass diese Mitteilung an die zuständige nationale Behörde übermittelt wurde.

FMI90200_FS_N_German

1/2

Wir möchten in diesem Zusammenhang betonen, dass die Aufrechterhaltung eines hohen Sicherheits- und Qualitätsniveaus unsere vorrangige Priorität darstellt. Bitte wenden Sie sich umgehend an uns, falls Sie irgendwelche Zweifel haben.

Mit freundlichen Grüßen,

Nigel Darby
Vice President, BioProcessing
GE Healthcare Life Sciences

Sue Rogers
Executive, Quality Assurance & Regulatory Affairs
GE Healthcare Life Sciences

7.2 Aminosäuresequenz von LamB von *E. coli* MG1655

NCBI Reference Sequence: NP_418460.1

[GenPept](#) [Graphics](#)

```
>gi|16131862|ref|NP_418460.1| maltose outer membrane porin (maltoporin)
[Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]
MMITLRKPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAELK
LGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHVDHMI
DFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGSSSFASNNIYDYTNETANDVFDVRLAQMEINPGG
TLELGVVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGLWFTAHTQSVLKGFNKFVQYATDSMTSQGKGLSQGSGVAFD
NEKFAYNINNNHMLRILDHGAISMGDNDMMYVGMQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWTPI MSTVME
IGYDNVESQRTGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKMGYDYTGNDANNANFGKAVP
ADFNGGSFGRGDSDEWTFGAQMEIWW
```

7.3 Nukleinsäuresequenz von YaeT von *E. coli* Nissle 1917

GeneName: YaeT

Entry_No: 193 Length: 2433

Descrip.: EcN_0193| Outer membrane protein assembly factor YaeT precursor | start: 1, end: 2433, strand: 1

```
>EcN_0193 | Outer membrane protein assembly factor YaeT precursor
atggcgatgaaaaagttgctcatagcgtcgctgctgtttagcagcgccaccgctatcaggt
gctgaagggttcgtagtgaaagatattcatttcgaaggccttcagcgtgtcgccgttgg
gcccctcctcagtatgcccgtgcccacagggcacagcggtaaatgatgaagatcagat
aataccattcgcgctctgtttgctaccggcaactttgaggatgttcgctccttcgtgat
ggtgatacccttcgtttcaggtaaaagaacgtccgaccattgcccagcattactttctcc
ggtacaaaatcggtgaaagatgacatgctgaagcaaacctcgagccttctggtgtcggt
gtgggcaaatccctcgatcgccaccaccattgcccgatcagagaaaaggtctggaagactc
tactacagcgtcggtaaaataatagcggcagcgttaaagctgtcgtgaccccgctcgccg
aacctgtttgacctaaaactggtgttccaggaaggtgtgctcagctgaaatccagcaaat
aacattgttggttaaccatgcttccaccagcagatgaaactgatctctcatttccaaactg
gacgaagtgccgtggtggaacgtggtgagcagctgtaataaccagaaacagaaactggca
ggcgaccttgaaaccctgcccagttactatctggatcgccgttatgcccgtttcaacatc
gattctaccagcgtcagctctgacccagataaaaaaggtatttaccgtcacggtgaacatc
accgaaggcagatcagtaaacgcttctggtgctgaaagttagcggcaatcttcccgggcac
tccgctgaaattgagcaactgactaagatcgagccggcagcgtgtataaocggaccacaaa
gtgacaaaatggaagatgacattaaaaagcttctggtcgcctatggttatgcctatccg
cgcgtacagtcgatgacctgaaatcaacgatgcccacaaaacggttaaattacgctgaa
gttgatgcccgtgtaaccgcttctctatggtcgtgaaagatccgcttggaaagtaacgatac
aaagatgcccgtcctgctgcccgaatgctcagatggaaggtgcatggctggggagcagat
ctggtcgatcagggtaaggagcgtctgaaaccgctcggccttcttgaactgtcgataacc
gatacccaacgctgttccggggagcccggatcaggttgatgtagttacaaggtgaaagaa
cgtaaacacccgtgacttcaactcgggattggttacggtactgaaagtgccgtgagcttc
caggctggtgtgcaaacaggataaactggttaggtaacgggttatgctggttggtatcaacgg
accaaaaacgattaccagacctatgctgaaactgctggaaccaaccgctacttaccgta
gatggcgtgaaacctcggtggtcgtctctctataaatgacttccaggcagatgacggcag
ctgtccgactataccaaacaaggttatggtacagacgtgacgcttgggcttcccgatcaac
gaataaactcgtgctgaggtcgggttatgtacataaactccctgtccaaacatgacg
ccgacggttgcgatggtggttatctgtaactctatgggtgaaacatccgagcaacctctgat
caggataaacagcttcaaaaacggacgacttcaactatggttgacctataacaag
cttgaccgctggttacttcccagacagatggttcaactgtcaacctgaccggtaagtgacc
attccgggatcggataaocgaataactcaaaagtgacgttagacacggcagctatgtgccc
attgatgatgacacaaaatgggtgttctgggtcgtacccgctggggttatggtgatggt
ttaggcggcaaaagatgcccgttctatgagaactctatgcccgtggttccagcaaccgtg
cgtggcttccagctccaataccattggtccgaaagcagttacttcccgcatcaggccagat
aattatgacccgactatgattacgaatggtcgcactcaggacggcggcaaaagatctggt
aatcggatgatgctgtaggcggtaacgccatggcgggtgcccagcctcgagttcatcacc
ccgacgcccgttatatagcgaataagatgtaactcgggtcgtactccttctctgggat
atgggtaccgcttgggatacaaaaactgggattccagccaatattctggatattccgactat
agtgatccaagcaatattccgtatgctcggggtatcgccattacaatggatgtcccattg
ggccgcttgggttctcctacgcccagcgttcaaaaagtaacgatggagacaaggcagaa
cagttccagtttaacatcgggtaaaacctggttaa
```

7.4 Ergebnis des Homologievergleichs des LamB-Proteins von EcN und MG1655

maltose outer membrane porin (maltoporin) [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]

Sequence ID: [ref|NP_418460.1](#) Length: 446 Number of Matches: 1

► [See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 446 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
905 bits(2339)	0.0	Compositional matrix adjust.	438/446(98%)	441/446(98%)	0/446(0%)
Query 1		MMITLRKPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLG			60
Sbjct 1		MMITLRKPLAVAVAAGVMSAQAMAVDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTTGAQSKYRLG			60
Query 61		NECETYAELKLGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGKNLIEWL			120
Sbjct 61		NECETYAELKLGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDPAFREANVQGKNLIEWL			120
Query 121		PGSTIWAGKRFYQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSF			180
Sbjct 121		PGSTIWAGKRFYQRHVDVHMIDFYYWDISGPGAGLENIDVGFGLSLAATRSSEAGGSSSF			180
Query 181		ASNNIYDYTNETANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGWLF			240
Sbjct 181		ASNNIYDYTNETANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGASKDGWLF			240
Query 241		TAEHTQSVLKGFNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQGSGVAFDNEKFAYNINNNGHMLRILDH			300
Sbjct 241		TAEHTQSVLKGFNKFVVQYATDSMTSQGKGLSQGSGVAFDNEKFAYNINNNGHMLRILDH			300
Query 301		GAISMGDNWDMYVGMQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWT PIMSTVMEIGYDNVESQR			360
Sbjct 301		GAISMGDNWDMYVGMQDINWDNDNGTKWWTVGIRPMYKWT PIMSTVMEIGYDNVESQR			360
Query 361		TGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKWDYDYGSSSTNPYYGKAVS			420
Sbjct 361		TGDKNNQYKITLAQQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKWDYDYG++ N +GKAV NADNNANFGKAVP			420
Query 421		ADFNGGSFGRGDSDEWIFGAQMEIWW 446			
Sbjct 421		ADFNGGSFGRGDSDEWIFGAQMEIWW 446			

7.5 3D-Strukturmodell des LamB-Proteins von MG1655

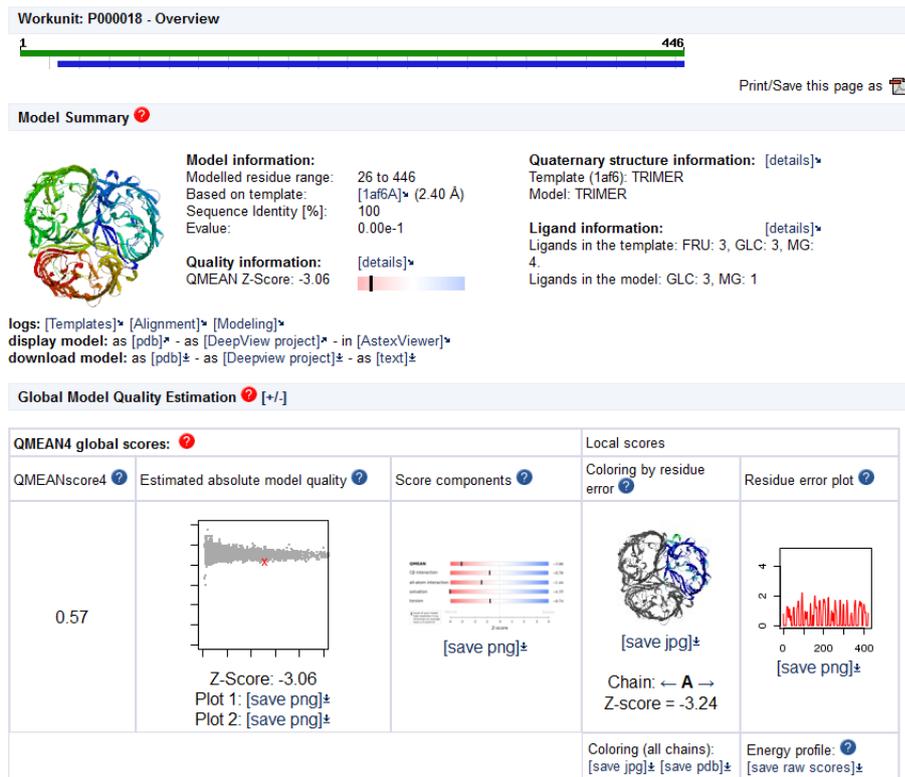


Abbildung 58: Ergebnisse der Modellierung der 3D-Struktur von LamB (MG1655)

Die Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm SWISS-Model in eine 3D-Struktur umgewandelt (Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003).

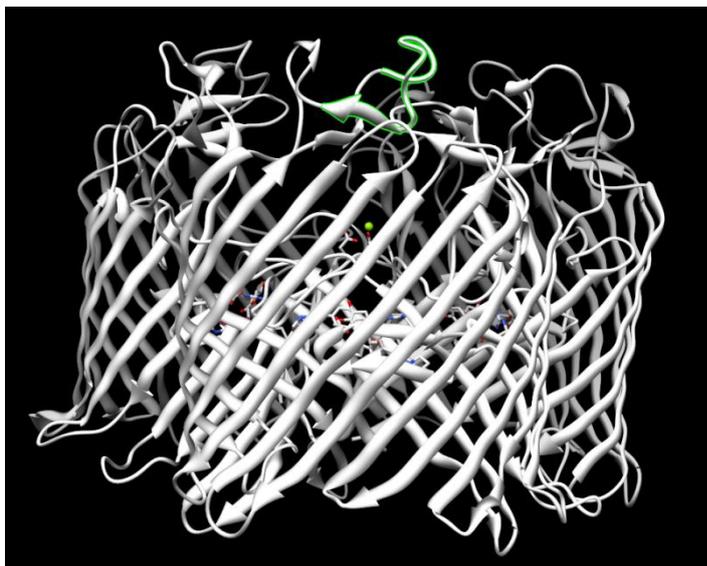


Abbildung 59: Darstellung der 3D-Struktur von LamB (Trimer, MG1655)

Die Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm SWISS-Model in eine 3D-Struktur umgewandelt und mit dem Programm UCSF Chimera dargestellt (Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003). Die hypothetische Phagenbindestelle wurde grün markiert.

7.6 3D-Strukturmodell des LamB-Proteins von EcN

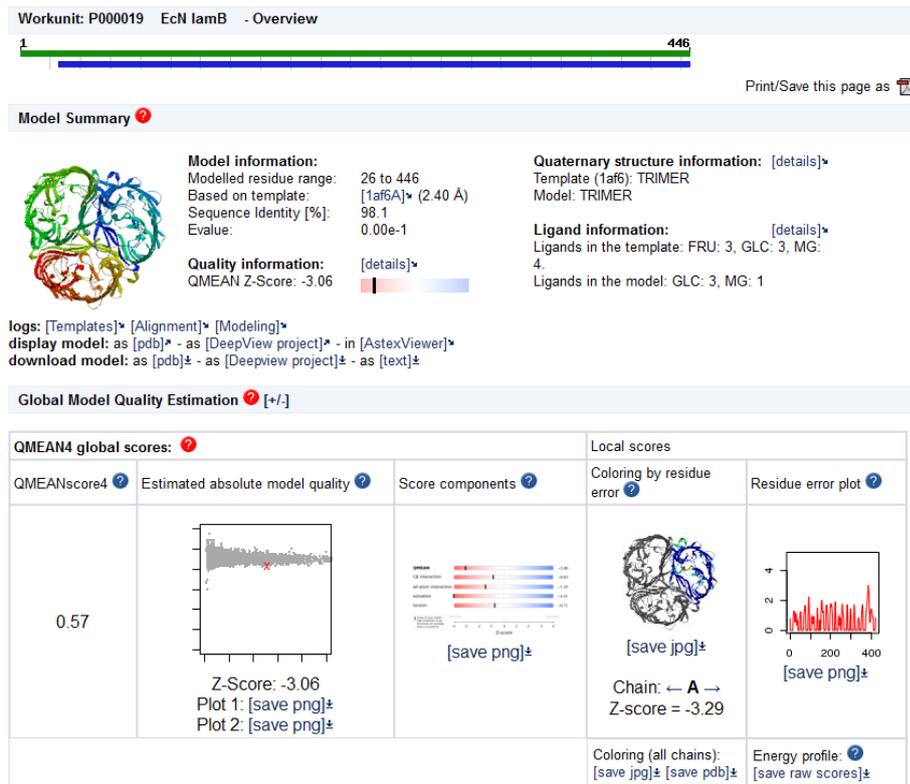


Abbildung 60: Ergebnisse der Modellierung der 3D-Struktur von LamB (EcN)

Die Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm SWISS-Model in eine 3D-Struktur umgewandelt (Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003).

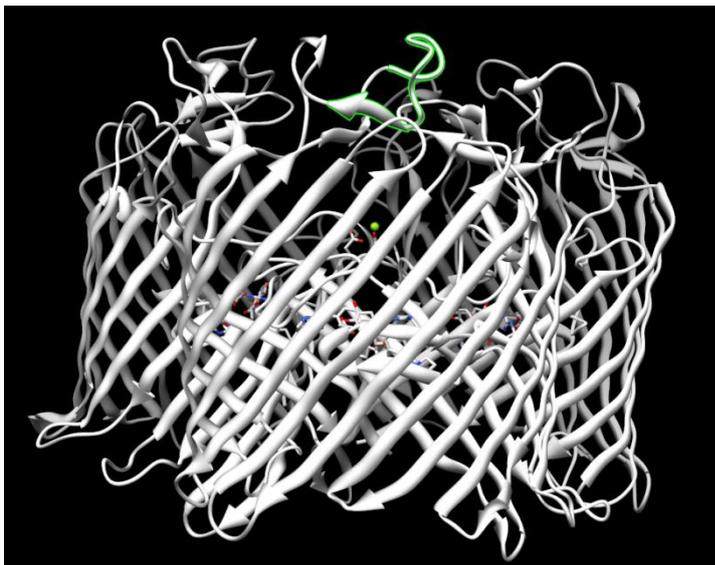


Abbildung 61: Darstellung der 3D-Struktur von LamB (Trimer, EcN)

Die Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm SWISS-Model in eine 3D-Struktur umgewandelt und mit dem Programm UCSF Chimera dargestellt (Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003). Die hypothetische Phagenbindestelle wurde grün markiert.

7.7 Homologievergleich des *lamB*-Gens von EcN und CFT073

```

Sequences producing significant alignments:
Score      E
(bits) Value

EcN_4679 | Maltoporin (maltose/maltodextrin high-affinity recept... 2658 0.0

>EcN_4679 | Maltoporin (maltose/maltodextrin high-affinity receptor,
           phage lambda receptor protein)
           Length = 1341

Score = 2658 bits (1341), Expect = 0.0
Identities = 1341/1341 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1   atgatgattactctgcgcaaaacttcctctggcgggttgccgtcgagcggggcgtaatgtct 60
           |||
Sbjct: 1   atgatgattactctgcgcaaaacttcctctggcgggttgccgtcgagcggggcgtaatgtct 60
    
```

(Hier wurde wegen einer 100 %-igen Übereinstimmung der Sequenz nur der Anfang (1-60 bp) gezeigt)

7.8 Homologievergleich des *lamB*-Gens von ABU83972 und CFT073

Escherichia coli ABU 83972, complete genome

Sequence ID: [gb|CP001671.1|](#) Length: 5131397 Number of Matches: 1

Range 1: 4650625 to 4651965 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2477 bits(1341)	0.0	1341/1341(100%)	0/1341(0%)	Plus/Plus

Features: [maltoporin precursor](#)

```

Query 1       ATGATGATTACTCTGCGCAAACCTTCCTCTGGCGGTTGCCGTCGCGAGCGGGCGTAATGTCT 60
           |||
Sbjct 4650625 ATGATGATTACTCTGCGCAAACCTTCCTCTGGCGGTTGCCGTCGCGAGCGGGCGTAATGTCT 4650684

Query 61      GCTCAGGCAATGGCTGTTGATTTCCACGGCTATGCACGTTCCGGTATTGGCTGGACAGGT 120
           |||
Sbjct 4650685 GCTCAGGCAATGGCTGTTGATTTCCACGGCTATGCACGTTCCGGTATTGGCTGGACAGGT 4650744

Query 121     AGCGCGGGCGAACAACAGTGTTCAGACTACCGGTGCTCAAAGTAAATACCGTCTTGGC 180
           |||
Sbjct 4650745 AGCGCGGGCGAACAACAGTGTTCAGACTACCGGTGCTCAAAGTAAATACCGTCTTGGC 4650804

Query 181     AACGAATGTGAAACTTATGCTGAATTAATAATGGGTCAGGAAGTGTGGAAAGAGGGCGAT 240
           |||
Sbjct 4650805 AACGAATGTGAAACTTATGCTGAATTAATAATGGGTCAGGAAGTGTGGAAAGAGGGCGAT 4650864

Query 241     AAGAGCTTCTATTTCGACACTAACGTGGCCTATTCGGTCGCGCAACAGAATGACTGGGAA 300
           |||
Sbjct 4650865 AAGAGCTTCTATTTCGACACTAACGTGGCCTATTCGGTCGCGCAACAGAATGACTGGGAA 4650924

Query 301     GCTACCGATCCGGCCTTCCGTGAAGCAAACGTGCAGGGTAAAAACCTGATCGAATGGCTG 360
           |||
Sbjct 4650925 GCTACCGATCCGGCCTTCCGTGAAGCAAACGTGCAGGGTAAAAACCTGATCGAATGGCTG 4650984

Query 361     CCAGGCTCCACCACTCTGGGAGGTAAGCGCTTCTACCAACGTCATGACGTTTCATATGATC 420
           |||
Sbjct 4650985 CCAGGCTCCACCACTCTGGGAGGTAAGCGCTTCTACCAACGTCATGACGTTTCATATGATC 4651044

Query 421     GACTTCTACTACTGGGATAITTTCTGGTCTGGTGCCGGTCTGGAAAACATCGAIGTTGGC 480
           |||
Sbjct 4651045 GACTTCTACTACTGGGATAITTTCTGGTCTGGTGCCGGTCTGGAAAACATCGAIGTTGGC 4651104

Query 481     TTCGGTAAACTCTCTCTGGCAGCAACCCGCTCCTCTGAAGCGGGTGGTTCCTCTTTC 540
           |||
Sbjct 4651105 TTCGGTAAACTCTCTCTGGCAGCAACCCGCTCCTCTGAAGCGGGTGGTTCCTCTTTC 4651164

Query 541     GCCAGCAACAATATTTATGACTATAACCAACGAAACCGCGAACGACGTTTTTCGATGTGCGT 600
           |||
Sbjct 4651165 GCCAGCAACAATATTTATGACTATAACCAACGAAACCGCGAACGACGTTTTTCGATGTGCGT 4651224

Query 601     TTAGCGCAGATGGAAATCAACCCGGGCGGCACATTAGAACTGGGTGTCGACTACGGTCGT 660
           |||
Sbjct 4651225 TTAGCGCAGATGGAAATCAACCCGGGCGGCACATTAGAACTGGGTGTCGACTACGGTCGT 4651284

Query 661     GCCAACCTGCGTGATAACTATCGTCTGGTTGATGGCGCATCGAAAGACGGCTGGTTATTTC 720
           |||
Sbjct 4651285 GCCAACCTGCGTGATAACTATCGTCTGGTTGATGGCGCATCGAAAGACGGCTGGTTATTTC 4651344

Query 721     ACTGCTGAACATACTCAGAGTGCCTGAAGGGTTTTAACAAGTTTGTGTTTCAGTACGCT 780
           |||
Sbjct 4651345 ACTGCTGAACATACTCAGAGTGCCTGAAGGGTTTTAACAAGTTTGTGTTTCAGTACGCT 4651404
    
```

7.9 Homologievergleich des *yaeT*-Gens von EcN und MG1655

Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome

Sequence ID: [gb|U00096.3|](https://genbank.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/seqview.cgi?acc=U00096.3) Length: 4641652 Number of Matches: 1Range 1: 197928 to 200360 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
4300 bits(2328)	0.0	2398/2433(99%)	0/2433(0%)	Plus/Plus

Features: [BamABCDE complex OM biogenesis outer membrane pore-formin...](#)

Query	1	ATGGCGATGAAAAAGTTGCTCATAGCGTCGCTGCTGTTTAGCAGCGCCACCGTATACGGT	60
Sbjct	197928	ATGGCGATGAAAAAGTTGCTCATAGCGTCGCTGCTGTTTAGCAGCGCCACCGTATACGGT	197987
Query	61	GCTGAAGGGTTCGTAGTGAAAGATATTCAITTCGAAGGCCTTCAGCGTGTGCGCGTTGGT	120
Sbjct	197988	GCTGAAGGGTTCGTAGTGAAAGATATTCAITTCGAAGGCCTTCAGCGTGTGCGCGTTGGT	198047
Query	121	GCGGCCCTCCTCAGTATGCCGGTGCACAGGGCAGCACCGGTTAATGATGAAGATATCAGT	180
Sbjct	198048	GCGGCCCTCCTCAGTATGCCGGTGCACAGGGCAGCACCGGTTAATGATGAAGATATCAGT	198107
Query	181	AATACCATTGCGGCTCTGTTTGCTACCGGCAACTTTGAGGATGTTGCGGTCCTTCGTGAT	240
Sbjct	198108	AATACCATTGCGGCTCTGTTTGCTACCGGCAACTTTGAGGATGTTGCGGTCCTTCGTGAT	198167
Query	241	GGTGATACCCCTTCTGGTTCAGTAAAAGAACGTCCGACCATTGCCAGCACTACTTTCTCC	300
Sbjct	198168	GGTGATACCCCTTCTGGTTCAGTAAAAGAACGTCCGACCATTGCCAGCACTACTTTCTCC	198227
Query	301	GGTAACAAATCGGTGAAAGATGACATGCTGAAGCAAACCTCGAGGCTTCTGGTGTGCGT	360
Sbjct	198228	GGTAACAAATCGGTGAAAGATGACATGCTGAAGCAAACCTCGAGGCTTCTGGTGTGCGT	198287
Query	361	GTGGGCGAATCCCTCGATCGCACCACCATTGCCGATATCGAGAAAAGGTCTGGAAGACTTC	420
Sbjct	198288	GTGGGCGAATCCCTCGATCGCACCACCATTGCCGATATCGAGAAAAGGTCTGGAAGACTTC	198347
Query	421	TACTACAGCGTCGGTAAATATAGCGCCAGCGTAAAGCTGTCGTGACCCCGCTGCCGCGC	480
Sbjct	198348	TACTACAGCGTCGGTAAATATAGCGCCAGCGTAAAGCTGTCGTGACCCCGCTGCCGCGC	198407
Query	481	AACCGTGTGACCTAAAACCTGGTGTTCAGGAAGGTGTGTGAGCTGAAATCCAGCAAAT	540
Sbjct	198408	AACCGTGTGACCTAAAACCTGGTGTTCAGGAAGGTGTGTGAGCTGAAATCCAGCAAAT	198467
Query	541	AACATTGTTGGTAACCATGCTTTCACCACCGATGAAGTCTCTCATTTCCAACTGCGT	600
Sbjct	198468	AACATTGTTGGTAACCATGCTTTCACCACCGATGAAGTCTCTCATTTCCAACTGCGT	198527
Query	601	GACGAAGTGCCGTGGTGGAAACGTGGTAGGCGATCGTAAATACCAGAAACAGAAACTGGCA	660
Sbjct	198528	GACGAAGTGCCGTGGTGGAAACGTGGTAGGCGATCGTAAATACCAGAAACAGAAACTGGCG	198587
Query	661	GGCGACCTGAAACCCTGCGCAGTTACTAICTGGATCGCGTTATGCCCGTTTCAACATC	720
Sbjct	198588	GGCGACCTGAAACCCTGCGCAGTTACTAICTGGATCGCGTTATGCCCGTTTCAACATC	198647
Query	721	GATTCTACCCAGGTCAGTCTGACGCCAGATAAAAAAGGTATTTACGTCACGGTGAACATC	780
Sbjct	198648	GATTCTACCCAGGTCAGTCTGACGCCAGATAAAAAAGGTATTTACGTCACGGTGAACATC	198707
Query	781	ACCGAAGGCGATCAGTACAAGCTTTCTGGCGTTGAAGTTAGCGGCAATCTGCCGGGCAC	840
Sbjct	198708	ACCGAAGGCGATCAGTACAAGCTTTCTGGCGTTGAAGTTAGCGGCAATCTGCCGGGCAC	198767

Query	841	TCCGCTGAAATGAGCAACTGACTAAGATCGAGCCGGGCGAGCTGTATAACGGCACCAA	900
Sbjct	198768	TCCGCTGAAATGAGCAGCTGACTAAGATCGAGCCGGGTGAGCTGTATAACGGCACCAA	198827
Query	901	GTGACCAAAATGGAAGATGACATTAAGCTTCTTGGTCGCTATGGTTATGCCTATCCG	960
Sbjct	198828	GTGACCAAGATGGAAGATGACATCAAAAAGCTTCTCGGTCGCTATGGTTATGCCTATCCG	198887
Query	961	CGCGTACAGTCGATGCCTGAAATTAACGATGCCGACAAAACCGTTAAATTACGCGTGAAC	1020
Sbjct	198888	CGCGTACAGTCGATGCCGAAATTAACGATGCCGACAAAACCGTTAAATTACGTTGTGAAC	198947
Query	1021	GTTGATGCGGGTAACCGTTTCTATGTGCGTAAGATCCGTTTTGAAGGTAACGATACCTCG	1080
Sbjct	198948	GTTGATGCGGGTAACCGTTTCTACGTGCGTAAGATCCGTTTTGAAGGTAACGATACCTCG	199007
Query	1081	AAAGATGCCGTCCTGCGTCGCGAAATGCGTCAGATGGAAGGTGCATGGCTGGGGAGCGAT	1140
Sbjct	199008	AAAGATGCCGTCCTGCGTCGCGAAATGCGTCAGATGGAAGGTGCATGGCTGGGGAGCGAT	199067
Query	1141	CTGGTCGATCAGGGTAAGGAGCGTCTGAACCGTCTGGGCTTCTTTGAAACTGTCGATACC	1200
Sbjct	199068	CTGGTCGATCAGGGTAAGGAGCGTCTGAATCGTCTGGGCTTCTTTGAAACTGTCGATACC	199127
Query	1201	GATACCCAACGTGTTCCGGGGAGCCCGGATCAGGTTGATGTAGTTTACAAGGTAAAAGAA	1260
Sbjct	199128	GATACCCAACGTGTTCCGGGTAGCCCGGACCAGGTTGATGTCTACAAGGTAAAAGAG	199187
Query	1261	CGTAACACCGGTAGCTTCAACTTCGGGATTGGTTACGGTACTGAAAGTGGCGTGAGCTTC	1320
Sbjct	199188	CGCAACACCGGTAGCTTCAACTTTGGTATTGGTTACGGTACTGAAAGTGGCGTGAGCTTC	199247
Query	1321	CAGGCTGGTGTGCAACAGGATAACTGGTTAGGTACGGGTTATGCTGTTGGTATCAACGGG	1380
Sbjct	199248	CAGGCTGGTGTGCAACAGGATAACTGGTTAGGTACAGGTTATGCTGTTGGTATCAACGGG	199307
Query	1381	ACCAAAAACGATTACCAGACCTATGCTGAACTGTCCGTAACCAACCCGTA	1440
Sbjct	199308	ACCAAAAACGATTACCAGACCTATGCTGAACTGTCCGTAACCAACCCGTA	199367
Query	1441	GATGGCGTAAGCCTCGGTGGTCGTCTCTTCTATAATGACTTCCAGGCAGATGACGCCGAC	1500
Sbjct	199368	GATGGCGTAAGCCTCGGTGGTCGTCTCTTCTATAATGACTTCCAGGCAGATGACGCCGAC	199427
Query	1501	CTGICCGACTATAACCAACAAGATTATGGTACAGACGIGACGTTGGGCTTCCCGATCAAC	1560
Sbjct	199428	CTGICCGACTATAACCAACAAGATTATGGTACAGACGIGACGTTGGGCTTCCCGATTAAC	199487
Query	1561	GAATATAACTCGCTGCGTGCAGGTCTGGGTTATGTACATAACTCCCTGTCCAACATGCAG	1620
Sbjct	199488	GAATATAACTCGCTGCGTGCAGGTCTGGGTTATGTACATAACTCCCTGTCCAACATGCAG	199547
Query	1621	CCGCAGGTTGCGATGTGGCGTTATCTGTA	1680
Sbjct	199548	CCTCAGGTTGCGATGTGGCGTTATCTGTA	199607
Query	1681	CAGGATAACAGCTTCAAACCGGACGACTTACGTTCAACTATGGTTGGACCTATAACAAG	1740
Sbjct	199608	CAGGATAACAGCTTCAAACCGGACGACTTACGTTCAACTATGGTTGGACCTATAACAAG	199667
Query	1741	CTTGACCGTGGTTACTTCCCGACAGATGGTTCACGTGTCAACCTGACCGGTAAGTGACC	1800
Sbjct	199668	CTTGACCGTGGTTACTTCCCGACAGATGGTTCACGTGTCAACCTGACCGGTAAGTGACC	199727
Query	1801	ATTCGGGATCGGATAACGAATACTACAAAGTGACGTTAGACACGGCGACTTATGTGCCG	1860
Sbjct	199728	ATTCCTGGATCGGATAACGAATACTACAAAGTGACGTTAGACACGGCGACTTATGTGCCG	199787

```
Query 1861   ATTGATGATGATCACAAATGGGTTGTTCTGGGTCGTACCCGCTGGGGTTATGGTGATGGT 1920
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 199788  ATCGATGACGATCACAAATGGGTTGTTCTGGGGCGTACCCGCTGGGGTTATGGTGATGGT 199847

Query 1921   TTAGGCGGCAAAGAGATGCCGTTCTATGAGAACTTCTATGCCGGTGGTTCAGCACCGTG 1980
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 199848  TTAGGCGGCAAAGAGATGCCGTTCTACGAGAACTTCTATGCCGGTGGTTCAGCACCGTG 199907

Query 1981   CGTGGCTTCCAGTCCAATACCATTGGTCCGAAAGCAGTTTACTTCCCGCATCAGGCCAGT 2040
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 199908  CGTGGCTTCCAGTCCAATACCATTGGTCCGAAAGCAGTTTACTTCCCGCATCAGGCCAGT 199967

Query 2041   AATTATGATCCGGACTATGATTACGAATGTGCGACTCAGGACGGCGGAAAGATCTGTGT 2100
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 199968  AATTATGATCCGGACTATGATTACGAATGTGCGACTCAGGACGGCGGAAAGACCTGTGT 200027

Query 2101   AAATCGGATGATGCTGTAGGCGGTAACGCCATGGCGGTTGCCAGCCTCGAGTTCATCACC 2160
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 200028  AAATCGGATGATGCTGTAGGCGGTAACGCCATGGCGGTTGCCAGCCTCGAGTTCATCACC 200087

Query 2161   CCGACGCCGTTTATTAGCGATAAGTATGCTAACTCGGTTTCGTACTTCCTTCTTCTGGGAT 2220
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 200088  CCGACGCCGTTTATTAGCGATAAGTATGCTAACTCGGTTTCGTACTTCCTTCTTCTGGGAT 200147

Query 2221   ATGGGTACCGTTTGGGATACAAACTGGGATTCAGCCAATATTCTGGATATCCGGACTAT 2280
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 200148  ATGGGTACCGTTTGGGATACAAACTGGGATTCAGCCAATATTCTGGATATCCGGACTAT 200207

Query 2281   AGTGATCCAAGCAATATCCGTATGTCTGCGGGTATCGCATTACAATGGATGTCCCCATTG 2340
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 200208  AGTGATCCAAGCAATATCCGTATGTCTGCGGGTATCGCATTACAATGGATGTCCCCATTG 200267

Query 2341   GGGCCGTTGGTGTTCCTACGCCAGCCGTTCAAAAAGTACGATGGAGACAAGGCAGAA 2400
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 200268  GGGCCGTTGGTGTTCCTACGCCAGCCGTTCAAAAAGTACGATGGAGACAAGGCAGAA 200327

Query 2401   CAGTTCAGTTTAAACATCGGTAAAACCTGGTAA 2433
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 200328  CAGTTCAGTTTAAACATCGGTAAAACCTGGTAA 200360
```

7.10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Eigenschaften des probiotischen <i>E. coli</i> Stammes Nissle 1917	6
Abbildung 2: Evolutionsmodell des Ursprungs von EAHEC O104:H4	13
Abbildung 3: Zusammenfassung der Virulenzgene im Genom von EAHEC O104:H4	14
Abbildung 4: Struktur von Shiga Toxin	16
Abbildung 5: Genregulation des λ Prophagen im lysogenen Zyklus	17
Abbildung 6: Regulationsnetzwerk des λ Prophagen im lysogenen Zyklus	18
Abbildung 7: Genregulation des λ Prophagen im lytischen Zyklus	19
Abbildung 8: Regulationsnetzwerk des λ Prophagen im lytischen Zyklus	20
Abbildung 9: Systeme zur Blockade der Übertragung von Phagen DNA	26
Abbildung 10: Struktur und Funktion von CRISPR	28
Abbildung 11: Funktionsweise des Rex Systems	29
Abbildung 12: 100 bp DNA – Ladder #3231S von NEB (Frankfurt)	36
Abbildung 13: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder #SM0311 von Fermentas (St. Leon – Rot) ..	36
Abbildung 14: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Einflusses von nicht pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen auf die Adhäsion von EAHEC TY3730 an Caco-2 Epithelzellen nach räumlicher Trennung durch Filtereinsätze	60
Abbildung 15: Darstellung der Expressionssysteme E1 (A) und E2 (B)	64
Abbildung 16: Darstellung der im C-P Reporter System verwendeten Plasmide	64
Abbildung 17: Graphische Darstellung der Gene der biolumineszenten Reporter-Stämme ...	65
Abbildung 18: Aufnahmen von Bakterienkolonien auf ECC-Agarplatte (A) oder CHROMagar™ Orientation (B)	70
Abbildung 19: PCR-Screen zum Nachweis der Identität von EAHEC O104:H4	71
Abbildung 20: PCR-Screen zum Nachweis der Plasmide pMUT1 und pMUT2	72
Abbildung 21: PCR-Screen zum Nachweis der Deletion von AI-2	73
Abbildung 22: PCR-Screen zum Nachweis von <i>E. coli</i> K-12 (Stelzner, 2013)	74
Abbildung 23: Aufnahmen von EAHEC O104:H4 TY3730 mit REM	78
Abbildung 24: Aufnahmen von EHEC O157:H7 EDL933 mit REM	79
Abbildung 25: Aufnahmen EcN mit REM	80
Abbildung 26: Anzahl der an Epithelzelllinien adhärrierenden Bakterien in Einzelkultur	81
Abbildung 27: Relative Adhäsion von EcN in Co-Kultur mit pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen an die Epithelzelllinien Caco-2 (A) und LS-174T (B)	82
Abbildung 28: Relative Adhäsion von pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen (pEc) in Co-Kultur mit EcN an die Epithelzelllinien Caco-2 (A) und LS-174T (B)	83
Abbildung 29: Vergleich der relativen Adhäsion von EAHEC TY3730 in Co-Kultur mit nicht pathogenen <i>E. coli</i> (EcN/SK22D) an die Epithelzelllinien Caco-2	84
Abbildung 30: Anzahl der an Caco-2 Zellen adhärrierenden EAHEC Bakterien im 'Trans-Well' System mit verschiedenen nicht pathogenen <i>E. coli</i> (npEc)	85
Abbildung 31: Wachstumskurven von EcN (●) oder pathogenen <i>E. coli</i> (■) in Einzelkulturen oder als Co-Kultur	87
Abbildung 32: Wachstumskurven von EcN (●) oder pathogenen <i>E. coli</i> (■) in Einzelkulturen oder als Co-Kultur	89

Abbildung 33: Wachstumskurven von SK22D (●) und EAHEC TY3730 (■) in Einzelkulturen oder als Co-Kultur	90
Abbildung 34: Kalibrierungsgerade zur Feststellung der linearen Abhängigkeit von Toxinkonzentration und OD ₄₅₀	91
Abbildung 35: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium	93
Abbildung 36: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium	95
Abbildung 37: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium	96
Abbildung 38: Shiga-Toxin Produktion in LB-Medium.....	98
Abbildung 39: Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium	100
Abbildung 40: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium in Co-Kultur mit EcN:: <i>luxS</i> ...	101
Abbildung 41: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium mit Acetat.....	102
Abbildung 42: Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium	103
Abbildung 43: Shiga-Toxin Produktion in SCEM-Medium mit und ohne Mitomycin C	104
Abbildung 44: Expression von Shiga-Toxin 1 im E1 C-P Expressionssystem (EK + 1:1) ...	105
Abbildung 45: Expression von Shiga-Toxin 1 im E1 C-P Expressionssystem (EK + 10:1) .	106
Abbildung 46: Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 C-P Expressionssystem (EK).....	107
Abbildung 47: Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 C-P Expressionssystem (1:1).....	108
Abbildung 48: Expression von Shiga-Toxin 2 im E2 C-P Expressionssystem (10:1).....	108
Abbildung 49: Shiga-Toxin Produktion in DMEM-Medium	109
Abbildung 50: Agarosegel mit PCR-Produkten der <i>stx2</i> - und <i>stx1</i> -PCR.....	111
Abbildung 51: Agarosegel mit PCR-Produkten der <i>stx2</i> - und <i>stx1</i> -PCR.....	113
Abbildung 52: Agarplatte mit Phagenplaques	115
Abbildung 53: Aufnahmen von Phagen des Phagenisolats aus EHEC O157:H7 EDL933. ..	116
Abbildung 54: Aufnahmen von Phagen des Phagenisolats aus EHEC O26:H11 1530/99....	116
Abbildung 55: Shiga Toxin Produktion von infizierten nicht pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen.	117
Abbildung 56: Exemplarischer Kurvenverlauf einer K ⁺ -Messung	119
Abbildung 57: Verlauf der Kaliumkonzentration im Medium von MG1655 (A) und EcN (B)	119
Abbildung 58: Ergebnisse der Modellierung der 3D-Struktur von LamB (MG1655).....	161
Abbildung 59: Darstellung der 3D-Struktur von LamB (Trimer, MG1655)	161
Abbildung 60: Ergebnisse der Modellierung der 3D-Struktur von LamB (EcN)	162
Abbildung 61: Darstellung der 3D-Struktur von LamB (Trimer, EcN).....	162

7.11 Abkürzungsverzeichnis

λ	lambda
Abi	`Abortive infection`
Amp	Ampicillin
AI-2	`Autoinducer 2`
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C-terminal	Carboxy-terminal
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CRISPR	`Clustered regularly interspaced short palindromic repeats`
Dox	Doxycyclin
Δ	Delta
d	destilliert
DAEC	diffus-adhärente <i>E. coli</i>
dd	didestilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAHEC	Enteroaggregative-hämorrhagische <i>E. coli</i>

EcN	<i>E. coli</i> Nissle 1917
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immune sorbent assay
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
hBD2	humanes β -Defensin 2
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie-bildende Einheit
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli, Meter
M	molar, Mega
μ	mikro
mA	Milliampere
min	Minute
MNEE	Meningitis-assoziierte <i>E. coli</i>
n	nano
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte

PFU	`Plaque forming units`
pH	pondus hydrogenii; negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
PEITC	Phenethylisothiocyanate
ppGpp	Guanosin-3`,5`-bipyrophosphat
RM	Restriktion/Modifikation
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCEM	`simulated colon environment medium`
Stx	Shiga Toxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T _M	Schmelztemperatur
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UPEC	uropathogener <i>E. coli</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

7.12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Serogruppen der in Deutschland (2012) gemeldeten EHEC-Fälle	9
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	34
Tabelle 3: Verwendete Antibiotika	36
Tabelle 4: Zusammensetzung von LB – Medium	37
Tabelle 5: Zusammensetzung von SCEM – Medium	37
Tabelle 6: Zusammensetzung von LB – Agar	38
Tabelle 7: Zusammensetzung von LB – Softagar	38
Tabelle 8: TAE 50x	38
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide	39
Tabelle 10: Verwendete Plasmide und Vektoren	40
Tabelle 11: Verwendete Bakterienstämme	40
Tabelle 12: Im API® 20 E Streifentest getestete Reaktionen ¹	44
Tabelle 13: Chemotherapeutika, die im ATB™ G-EU verwendet werden ¹	45
Tabelle 14: Chemotherapeutika, die im ATB™ VET verwendet werden ¹	46
Tabelle 15: Chemotherapeutika, die im MHK-Gram ^{neg} verwendet werden ¹	47
Tabelle 16: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für die PCR mit <i>Taq</i> DNA Polymerase	48
Tabelle 17: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für die PCR mit <i>Taq</i> PCR Master Mix	49
Tabelle 18: Verwendete Puffer für die Plasmidisolierung	52
Tabelle 19: Verwendeter Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (100 mM)	56
Tabelle 20: Verwendeter Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (100 mM)	56
Tabelle 21: Verwendeter Sörensenpuffer (100 mM, pH 7.4)	56
Tabelle 22: Verwendete 2 %-ige Glutaraldehydlösung	57
Tabelle 23: Verwendete 6,25 %-ige Glutaraldehydlösung	57
Tabelle 24: Entwässerungsreihe der REM Proben	57
Tabelle 25: Zusammensetzung der Ansätze des Adhäsionsassays	58
Tabelle 26: Zusammensetzung der Ansätze zur Quantifizierung der Toxinproduktion	61
Tabelle 27: Packungsinhalt eines RIDASCREEN® Verotoxin ELISA Kits*	62
Tabelle 28: Einstellungen am VictorXLight zur Biolumineszenzmessung in Englisch*	66
Tabelle 29: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von EAHEC	71
Tabelle 30: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von EcN	72
Tabelle 31: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für die Überprüfung von EcN:: <i>luxS</i>	73
Tabelle 32: Ergebnisse der MHK-Gram ^{neg} - Tests	75
Tabelle 33: Ergebnisse der ATB™ VET - Tests	76
Tabelle 34: Ergebnisse der ATB™ G-EU - Tests	76
Tabelle 35: Ergebnisse des API 20E-Tests	77
Tabelle 36: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von <i>stx2</i>	110
Tabelle 37: Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm für den Nachweis von <i>stx1</i>	110
Tabelle 38: Ergebnisse der Phagen-Plaque-Assays	114
Tabelle 39: Bilder der Agarplatten der Phagen-Plaque-Assays	115

7.13 Veröffentlichungen

7.13.1 Publikationen

Rund, S.A., Rohde, H., Sonnenborn, U., Oelschlaeger, T.A., 2013, **Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7.** Int J Med Microbiol 303, 1-8.

Troge, A., Scheppach, W., Schroeder, B.O., **Rund, S.A.**, Heuner, K., Wehkamp, J., Stange, E.F., Oelschlaeger, T.A., 2012, **More than a marine propeller – the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus.** Int J Med Microbiol 302, 304-314.

7.13.2 Vorträge

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

5. Seeon Konferenz Mikrobiota, Probiota und Wirt, 15.-17. Juni 2012, Seeon, Deutschland

7.13.3 Poster

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

64. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V.,

30. September – 03. Oktober 2012, Hamburg, Deutschland

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

7th International Symposium organized by the Students of the Graduate School of Life

Science, 16.-17. Oktober 2012, Würzburg, Deutschland

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

The 7th International Yakult Symposium “The Intestinal Microbiota and Probiotics:

Exploiting Their Influence on Health”, 22.-23. April 2013, London, UK

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

Digestive Disease Week 2013, 18.-21. Mai 2013, Orlando, Florida, US

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

6. Seon Konferenz Mikrobiota, Probiota und Wirt, 28.-30. Juni 2013, Seon, Deutschland

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

The 5th Congress of European Microbiologists, 21.-25. Juli 2013, Leipzig, Deutschland

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

65. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V.,

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (DGI) e. V., 22.-25. September

2013, Rostock, Deutschland

Stefan A. Rund, Tobias A. Oelschlaeger

Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on various EHEC strains

8th International Symposium organized by the students of the Graduate School of Life

Science, 09.-10. Oktober 2013, Würzburg, Deutschland

7.14 Lebenslauf

