

**Genomische Unterschiede zwischen
Shiga Toxin-Produzierenden *Escherichia coli*
(STEC) O157:H7 und Sorbitol Fermentierenden
(SF) STEC O157:H⁻ -Stämmen**

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

vorgelegt von
Andreas Janka
aus Marburg/Lahn

Würzburg 2003

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Promotionskolloquiums

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2000 bis Dezember 2002 im Institut für Hygiene und Mikrobiologie und im Institut für Infektionsbiologie der Universität Würzburg und im Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster durchgeführt. Sie wurde im Rahmen des Europäischen Graduiertenkollegs „Gene Regulation in and by microbial pathogens“, das von der Universität Würzburg gemeinsam mit der schwedischen Partner-Universität aus Umeå initiiert wurde, finanziell gestützt. Die Fachbetreuung wurde durch den Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg übernommen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Karch danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die zahlreichen Ideen für den Fortgang der Arbeit sowie für das rege Interesse an den Versuchsergebnissen. Trotz seines Wechsels von Würzburg nach Münster hat er eine reibungslose Fortsetzung der wissenschaftlichen Arbeit gewährleistet und mir viele Freiräume gelassen. Seine tatkräftige Unterstützung und Förderung wird mir unvergessen bleiben.

Prof. Dr. P. Schreier gilt mein Dank für die Fachbetreuung dieser molekularbiologischen Arbeit am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie.

Prof. Dr. J. Hacker, dem Sprecher des Europäischen Graduiertenkollegs, danke ich für die Möglichkeit, meine Laborarbeiten vorübergehend am Institut für Infektionsbiologie verrichten zu können und für die gute Organisation des wissenschaftlichen Graduiertenkolleg-Programmes.

Prof. M. Bielaszweska danke ich für die zahlreichen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und ihre fortwährende Hilfsbereitschaft bei der Erstellung von Veröffentlichungen und deren Übersetzung in das Englische.

PD Dr. U. Dobrindt gebührt mein Dank für die freundliche Einweisung bei den Makroarrayarbeiten und deren Auswertung sowie für die Betreuung innerhalb des Institutes für Infektionsbiologie.

Bei Prof. Dr. H. Schmidt und Dr. W. Brunder bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Erstellung mehrere Posterentwürfe und für die Hinweise und Erläuterungen, die den Fortgang der Arbeit maßgeblich gefördert haben.

Mein besonderer Dank gilt Barbara Plaschke, die mich sowohl im Institut für Hygiene und Mikrobiologie als auch im Institut für Infektionsbiologie massiv bei meinen Laboratoriumsarbeiten unterstützt und beraten hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. WenLan Zhang, Olga Böhler, Beatrix Henkel, Stefanie Amersbach, Christa Albert und Barbara Middendorf für die geduldige Beantwortung all meiner vielen Fragen bezüglich Problemstellungen im Laboralltag. Kai Michaelis danke ich für die wertvolle Hilfestellung bei den durch ihn angefertigten Pathoarrays. Ein Dank geht auch an Lilo Greune, die mich aufopferungsvoll bei den Arbeiten zu dem Cytotolethal Distending Toxin unterstützt hat.

Ein Dankeschön auch für die nette und aufgeschlossene Atmosphäre in den Laboren der drei unterschiedlichen Institute an all meine anderen Kollegen, die zu zahlreich sind, um hier vollständig erwähnt zu werden.

Den Lebensmittelchemikern Dr. Bernd Köhler, Sabine Schäfer und Ulrike Hemmrich danke ich für den fachlichen Rückhalt, der diese interdisziplinäre Doktorarbeit um ein wesentliches erleichtert hat.

Bei meinen Korrekturlesern möchte ich mich für die sorgfältige und kritische Durchsicht meines Manuskriptes bedanken.

Für die Unterstützung, die mir während der gesamten Zeit durch meine Familie geboten wurde, bedanke ich mich aufrichtig.

Schließlich bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, welche durch ihre Bereitstellung finanzieller Mittel im Rahmen ihres Graduiertenkollegs und dem Kompetenznetzwerk Pathogenomik diese Arbeit ermöglicht hat.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

a) aus der Dissertation hervorgegangene Veröffentlichungen

„Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (*efa1*) gene in sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157: H⁻“

A. Janka, M. Bielaszewska, U. Dobrindt, H. Karch,

Int. J. Med. Microbiol. **2002**, 292, 207-214.

„The cytolethal distending toxin (*cdt*) gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ and O157:H7: characterization and evolutionary considerations“

A. Janka, M. Bielaszewska, U. Dobrindt, L. Greune, H. Karch,

Infect. Immun. **2002**, zur Veröffentlichung eingereicht.

„Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* using DNA arrays“

U. Dobrindt, F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, J. Hacker,

J. Bacteriol. **2003**, im Druck befindlich.

b) andere Veröffentlichungen

„Antibiotikatherapie der bakteriell bedingten Durchfallerkrankungen“

A. Janka, A. W. Friedrich, H. Karch,

Pharm. Unserer Zeit **2001**, 30, 406-410.

„A new clone of sorbitol fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains associated with human diseases“

M. Bielaszewska, R. Prager, W. L. Zhang, A. Janka, A. Liesegang, H. Tschäpe, H. Karch,

Emerg. Infect. Dis. **2002**, zur Veröffentlichung eingereicht.

Posterbeiträge

„Genomic differences between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and sorbitol fermenting STEC O157:H⁻ -strains“

A. Janka, U. Dobrindt, B. Plaschke and H. Karch

VAAM Jahrestagung 2002

Göttingen, **24.-27. März 2002.**

„Analysis of genomic differences between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and sorbitol fermenting (SF) STEC O157:H⁻“

A. Janka, U. Dobrindt, B. Plaschke and H. Karch

2. International Conference “Genomics in infectious diseases”

Würzburg, **1.-3. Mai 2002.**

„The EHEC factor for adherence (*efa1*)- and the cytolethal distending toxin (*cdt*) genes are present in sorbitol fermenting (SF) Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H⁻ -strains “

A. Janka, U. Dobrindt, M. Bielaszewska and H. Karch

54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM),

Heidelberg, **6.-10. Oktober 2002.**

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung	1
Summary	3
B Einleitung	5
1. Bedeutung und Erregerspektrum von Durchfallerkrankungen	5
2. Der Pathotyp Shiga Toxin-Produzierende <i>E. coli</i> (STEC).....	5
3. Shiga Toxine	7
4. Weitere Pathogenitätsfaktoren der STEC	8
4.1. Die Pathogenitätsinsel LEE.....	8
4.2. Andere Adhärenzfaktoren	10
4.3. Eisenaufnahmesysteme	11
4.4. EHEC-Hämolysin.....	12
4.5. Enteroaggregatives Hitzestabiles Toxin.....	12
4.6. Typ II-Sekretionssystem	12
4.7. Serinprotease	13
4.8. Katalase/Peroxidase	13
5. Bedeutung von O157 innerhalb der STEC-Serogruppen.....	14
6. Virulenzgenetische Unterschiede zwischen STEC O157:H7 und SF STEC O157:H ⁻	15
7. Phylogenie des O157-Komplexes	16
8. Aufgabenstellung	18
C Experimentarteil	19
1. Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien	19
1.1. Geräte	19
1.2. Reagenzien	20
1.3. Sonstige Materialien.....	20
2. Bakterienstämme, Nukleinsäuren und Bioreagenzien	21
2.1. Bakterienstämme	21
2.2. Plasmide	22
2.3. Oligonukleotide.....	22
2.4. Bioreagenzien.....	22
3. Medien, Puffer und allgemeine Lösungen	23
3.1. Medien.....	23
3.2. Puffer und allgemeine Lösungen.....	23
4. Bakterienstammhaltung.....	24
5. Erstellung einer Cosmid-Genbank mit SF STEC O157:H ⁻ -Stamm 493/89	24
5.1. Präparation der DNA des Stammes 493/89.....	24
5.2. Präparation der Cosmidvektor-DNA.....	25
5.3. Ligation und Verpackung in Phagenköpfe.....	25
5.4. Präparation der Wirtszellen.....	26
5.5. Transduktion.....	26
5.6. Präparation der Genbank.....	26
6. Isolierung der Cosmid-DNA mit Qiagen Plasmid Midi Kit [®]	27
7. Horizontale Agarosegel-Elektrophorese	28
8. DNA-Sequenzierung	29

9. Subklonierung von Cosmid-Insertfragmenten	31
9.1. Restriktion genomischer und vektorieller DNA.....	31
9.2. Dephosphorylierung.....	31
9.3. Aufreinigung von DNA aus Elektrophoresegel mit prep-a-gene [®]	31
9.4. Ligation	32
10. Herstellung kompetenter DH5 α -Zellen und Transformation	32
10.1. Erstellung kompetenter DH5 α -Zellen.....	32
10.2. Transformation.....	33
11. Schnellmethode Plasmid-DNA-Isolierung.....	34
12. Plasmid-DNA-Isolierung mittels Qiagen mini Purification Kit [®]	34
13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
14. PCR-Amplifikat-Aufreinigung mit Qiagen-PCR-Purification-Kit [®]	37
15. Southern Blot-Hybridisierung mit ECL [®]	37
15.1. DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nitrozellulose.....	37
15.2. Hybridisierung markierter DNA mit immobilisierter Ziel-DNA.....	38
15.3. Detektion der hybridisierten DNA.....	39
16. Southern Blot mit Digoxigenin nach Böhlinger	39
16.1. Markierung der Sonden-DNA.....	40
16.2. Hybridisierung markierter DNA mit immobilisierter Ziel-DNA.....	40
16.3. Färbung der „Sonden-DNA-Ziel-DNA-Hybride“.....	41
17. Chromosomale DNA mit Phenolmethode.....	41
18. Isolierung chromosomaler DNA mit Nucleobond-Säulen.....	42
19. Erstellung einer subtraktiven Genbank mit Hilfe des CLONTECH PCR-Select Genome Subtraction Kit [®]	43
19.1. Allgemeines zur Methodik.....	43
19.2. Isolierung genomischer DNA.....	45
19.3. Restriktion der Tester- und Driver-DNA.....	45
19.4. Ligation der Tester-DNA mit Adaptoren.....	46
19.5. Erste Hybridisierung	48
19.6. Zweite Hybridisierung.....	48
19.7. PCR-Amplifizierung	49
19.8. Unterschiedliche experimentelle Bedingungen.....	50
19.8.1. Änderung des Temperaturprogramms am Thermocycler	50
19.8.2. Erhöhung der Zyklenanzahl in der ersten PCR.....	51
19.8.3. Verwendung eines anderen Taq-Polymerase-Systems	51
19.8.4. Erhöhung der MgCl ₂ -Konzentration im PCR-Mastermix.....	51
19.8.5. Erhöhung der eingesetzten DNA-Konzentration der restringierten Driver- und Tester-DNA.....	51
20. Bestätigung Tester-spezifischer Sequenzen.....	52
20.1. Ligierung der subtraktiven PCR-Produkte in den Bluescriptvektor und Transformation in kompetente DH5 α -Zellen	52
20.2. Ligierung der subtraktiven PCR-Produkte in pCR 2.1 und Transformation in kompetente INV α F ⁻ -Zellen	53
20.3. Spezifitätskontrolle mittels Makroarray.....	54
21. Genomvergleich mittels <i>E. coli</i> K-12 Makroarray.....	55
22. Genomvergleich mittels Pathoarray	57
23. Kolonie-Blot-Hybridisierung	58
24. Sequenz-Identifikationsnummern	58

D Ergebnisse	59
1. Sequenzierung der Cosmid-Genbank eines SF STEC O157:H ⁻ -Stammes.....	59
1.1. Subklonierung interessanter Cosmidinsert-Fragmente	60
1.2. Charakterisierung eines 8,8 Kb spezifischen SF STEC O157:H ⁻ -Fragmentes	62
1.3. Southern Blot zur Überprüfung des Vorkommens von <i>fec</i> -Komponenten	64
1.4. Vorkommen der SRL-PAI-homologen Sequenz in anderen SF STEC O157:H ⁻ - und STEC O157:H7-Stämmen	65
2. Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH).....	66
2.1. Einfluß von Veränderungen der Reaktionsbedingungen auf das Ergebnis der SSH	66
2.2. Durch SSH von <i>E. coli</i> 493/89 vs. <i>E. coli</i> EDL933 ermittelte spezifische Fragmente.....	67
2.3. Detektierung des gesamten offenen Leserahmens für <i>efa1/lifA</i>	69
2.4. Vergleich der <i>efa1/lifA</i> Sequenz von <i>E. coli</i> 493/89 mit der von <i>E. coli</i> EDL933 ...	70
2.5. Vorkommen von <i>efa1/lifA</i> in anderen SF STEC O157:H ⁻ und STEC O157:H7- Stämmen.....	71
3. Genomvergleich mittels <i>E. coli</i> K-12-Makroarray-Methode.....	73
3.1. Anzahl nicht hybridisierter Spots für <i>E. coli</i> 493/89 und <i>E. coli</i> EDL933	74
3.2. Aufschlüsselung nach Funktionsklassen.....	75
3.3. Vergleich des Hybridisierungsmusters.....	77
4. Vergleich der Ausstattung an Virulenz-assoziierten Genen mittels Makroarray-Methode	78
4.1. Vergleich der Hybridisierung von <i>E. coli</i> 493/89 mit der von <i>E. coli</i> EDL933.....	79
4.2. Identifizierung des Cytolethal Distending Toxins in <i>E. coli</i> 493/89.....	81
4.3. Überprüfung auf <i>cdt</i> -enthaltende Cosmide der <i>E. coli</i> 493/89-Genbank.....	82
4.4. Vergleich der <i>cdt</i> -Sequenz von <i>E. coli</i> 493/89 mit <i>cdt-I</i> , <i>cdt-II</i> und <i>cdt-III</i>	83
4.5. Identifizierung von Phagensequenzen als flankierende <i>cdt</i> -Regionen in <i>E. coli</i> 493/89	84
4.6. Shotgun-Genbank des <i>cdt</i> -Cosmid-Insertfragments von <i>E. coli</i> 493/89.....	84
4.7. Häufigkeit von <i>cdt</i> in anderen SF STEC O157:H ⁻ -Stämmen.....	85
E Diskussion.....	87
1. Gemeinsame chromosomale Elemente der O157-Serotypen H7 und SF H ⁻	87
2. Vergleich der O157-Serotypen mit <i>E. coli</i> K-12-Stamm MG1655	89
3. Vergleich mit <i>Shigella flexneri</i> 2a	90
4. Identifizierung des kompletten <i>efa1/lifA</i> -ORFs in <i>E. coli</i> 493/89.....	91
5. Vorkommen von <i>cdt</i> in STEC O157	92
6. Evolutionäre Aspekte des O157-Komplexes	94
7. Abschlussbetrachtung.....	95
F Literaturverzeichnis.....	96
G Anhang.....	110
Erklärung.....	121
Lebenslauf.....	122

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A/E-Läsionen	„Attaching and Effacing“ – Läsionen
Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	Accession Nummer
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Amp	Ampicillin
APEC	Affenpathogene <i>E. coli</i> (Avian Pathogenic <i>E. coli</i>)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serum Albumin)
C	Cytidin
CaCo-Zellen	Zelllinie – Humane Kolonkarzinomzellen (Colon carcinoma)
CDT	Cytolethal Distending Toxin
CHO-Zellen	Zelllinie aus den Eierstöcken des "Chinesischen Hamsters" (Chinese Hamster Ovary)
ChuA	<i>E. coli</i> haem-utilization protein
cm ²	Quadratzentimeter
cos	Kohäsive(s) Ende(n) (cohesive)
CTP	Cytidintriphosphat
DHEC	Diarrhoe-assoziierte-Hämolytische <i>E. coli</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	„ <i>E. coli</i> attaching and effacing“
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAST1	Enteroaggregatives thermostabiles Toxin 1
Efa1	EHEC factor for adherence
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Entereoinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>

Esp	<i>E. coli</i> secreted proteins
EspP	Extracellular serine protease, Plasmid-encoded
ET	Elektrophorese-Typ
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
Etp	EHEC-Typ-II-Sekretionssystem
ExPEC	mit extraintestinalen Erkrankungen assoziierte <i>E. coli</i>
FAS	Fluorescent Actin Staining
Fec	Ferric dicitrate transport system
g	Gramm
G	Guanin
GSP	General Secretory Pathway
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HeLa-Zellen	Zelllinie - Humane Uteruskarzinomzellen (entnommen von einer Patientin namens „Henrietta Lacks“)
Hep	Zelllinie - Humane Larynxepithelkarzinomzellen
HK	Hämorrhagische Kolitis
Hly	Enterohämolysin-Toxin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
Id.	Identität
Iha	IrgA homologue adhesin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
IrgA	Iron-regulated gene A
IS	Insertionssequenz
KatP	Katalase/Peroxidase
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
lacZ	β -Galactosidase(-kodierend)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEE	Locus for Enterocyte Effacement
LifA	Lymphostatin
LPS	Lipopolysaccharid

M	molar, mol/l
Mb	Megabasenpaare
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLEE	Multilocus-Enzym-Elektrophorese
mM	millimolar
mm	Millimeter
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
nest. Primer	Nested Primer
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
p.A.	pro analysi
PAI	Pathogenitätsinsel
Pap	Pyelonephritis associated pili
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
<i>pheU</i>	Phenylalanin spezifische tRNA
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulphate
<i>selC</i>	Selenocystein spezifische tRNA
SF	Sorbitol-Fermentierend
Sfp	Sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmidencodet
SlT	Shigalike toxine
SMAC-Agar	Sorbitol MacConkey-Agar
SRL	<i>Shigella</i> Resistance Locus
SSH	Suppressive Subtraktive Hybridisierung

ST (ETEC)	Hitzestabiles Enterotoxin
STEC	Shiga Toxin-Produzierende <i>E. coli</i>
Ster. Wasser	Sterilisiertes Wasser
Stx	Shiga Toxin
T	Thymidin
TAI	Tellurite-resistance and Adherence-confering Island
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
tir	translocated intimin receptor
tlr	Tellurit-Resistenz(-kodierend)
TM	Trademark
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Tritidintriphosphat
ÜN	Über Nacht
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
UV	Ultraviolett
vs.	versus
VT	Volumenteile
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Brom-4-chlorindol-3-yl- β -D-galactopyranosid

A Zusammenfassung

Sorbitol fermentierende (SF) Shiga Toxin-Produzierende *Escherichia coli* (STEC)-Stämme des Serotyps O157:H⁻ stellen bedeutsame Auslöser für Durchfallerkrankungen und des lebensbedrohlichen Hämolytisch-Urämischen Syndroms (HUS) in Mitteleuropa dar. Die Virulenzfaktoren und Krankheitsbilder solcher Stämme ähneln denen von STEC O157:H7-Stämmen, welche weltweit am häufigsten innerhalb der O157-Serogruppe isoliert werden. Für zwei STEC O157:H7-Stämme ist die komplette Genomsequenz bereits veröffentlicht. Über SF STEC O157:H⁻ sind hingegen nur einige genetische Unterschiede mit STEC O157:H7 bezüglich der Ausstattung an Virulenzfaktoren bekannt. Diese sind vorwiegend auf den Plasmiden beider Serotypen kodiert. In einem Modell, das die Entstehungsweise des O157-Komplexes zu erklären versucht, wird der nicht begeißelte, Sorbit fermentierende O157:H⁻ Serotyp als eigene phylogenetische Linie angesehen. Um einen tieferen Einblick in die genomische Diversität dieser beiden O157-Linien zu erhalten, wurden verschiedene molekularbiologische Methoden eingesetzt. Als Modellstamm für SF STEC O157:H⁻ diente der Stamm 493/89, welcher von einem HUS-Patienten aus Deutschland isoliert wurde. Zum einen wurde eine Cosmid-Genbank des Stamms 493/89 sequenziert und mit dem STEC O157:H7-Referenzstamm EDL933 verglichen. Des Weiteren wurde eine subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) mit beiden Stämmen des gleichen Serotyps durchgeführt. Ein Vergleich beider Genome mit dem kompletten Genom des apathogenen Laborstammes *E. coli* K-12 erfolgte über die Makroarraytechnik. Schließlich wurde der Stamm 493/89 mit Hilfe eines Makroarrays, auf dem bekannte Virulenz-assoziierte DNA-Sequenzen untergebracht sind (Pathoarray) untersucht.

Nach Anwendung dieser Techniken konnten zwei weitere Gene in SF STEC O157:H⁻ identifiziert werden, die für potentielle Virulenzfaktoren kodieren. Mit dem Gen für den „EHEC factor for adherence“ (Efa1), welcher gleichzeitig auch als Lymphostatin (LifA) beschrieben wird, ist in SF O157:H⁻ ein multifunktionelles Gen vorhanden, welches nur fragmentiert in O157:H7 präsent ist. In 90 % der getesteten SF O157:H⁻ Stämme wurden außerdem die Gene für das „Cytotolethale Distending Toxin“ (CDT) detektiert. Diese weisen die größte Ähnlichkeit zu *cdt-III* des *E. coli* O15:H21-Stammes S5 auf, welche dort auf einem Plasmid kodiert vorliegen. Im Gegensatz dazu sprechen die flankierenden Sequenzen von *cdt* in *E. coli* 493/89 für ein Gen, das durch einen temperenten Phagen aufgenommen wurde. So konnte *cdt*, wenn auch nur in geringem Ausmaß in STEC O157:H7-Stämmen durch PCR-Analyse gefunden werden.

Die beiden Makroarrays lieferten für beide Serovare eine bemerkenswerte Anzahl spezifischer Sequenzen. Der *E. coli* K-12 Makroarray bekräftigt zudem die größere Ähnlichkeit des nicht pathogenen *E. coli* K-12 Genoms mit SF STEC O157:H⁻ als mit STEC O157:H7. Mit Hilfe der Cosmid-Genbank wurde in SF STEC O157:H⁻ eine 8,8 Kb große Sequenz ermittelt, die phagenhomologe Bestandteile der *Shigella*-Resistance Locus (SRL)-Pathogenitätsinsel (PAI) von *Shigella flexneri 2a* enthält. Diese Sequenz fehlt in STEC O157:H7 und deutet Gemeinsamkeiten für SF STEC O157:H⁻ und *Shigella flexneri 2a* bezüglich ihrer Phagentransduktion an.

Die Präsenz von *efa1/lifA*, *cdt* und der 8,8 Kb großen SRL-homologen Sequenz wurde auch bei *E. coli* O55:H⁻-Stämmen durch PCR überprüft. Diese werden als vermutliche Vorstufe des O157-Komplexes angesehen. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass *efa1/lifA* bereits in diesem *E. coli* O55-Vorläufer vorhanden war, die SRL-homologe Sequenz aber erst vor und *cdt* nach der Abzweigung in die O157:H⁻-Linie erhalten wurde. In O157:H7 wurden *efa1/lifA* und der SRL-homologe Genbereich teilweise oder vollständig deletiert.

Die Ergebnisse bestätigen in ihrer Gesamtheit SF STEC O157:H⁻ als ein eigenständig entwickeltes Pathogen mit klar erkennbaren Unterschieden zu STEC O157:H7 und bekräftigen damit seine bedeutsame Position innerhalb der epidemiologisch relevanten STEC-Serogruppen.

Summary

Sorbitol-fermenting (SF) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serotype O157:H⁻ (nonmotile) are important causes of diarrhea and the life-threatening hemolytic uremic syndrome (HUS) in Europe. The virulence characteristics of these strains are similar to those of STEC O157:H7, which is the most frequently isolated STEC serotype causing human diseases worldwide. Recently, the complete genome sequences of two STEC O157:H7 strains have been published. In contrast, the sequences of SF STEC O157:H⁻ remain largely uncharacterized. Therefore, differences in virulence characteristics of the two O157 pathogens are poorly understood and have been till now limited to genes encoded on a large plasmid. In a stepwise evolutionary model proposed for the STEC O157 complex, SF STEC O157:H⁻ strains are classified as a unique phylogenetic lineage. In this work, we used different molecular approaches to gain more insight into the genomic diversity of the two O157 lineages. First, a cosmid gene library of a SF STEC O157:H⁻ strain 493/89, which was isolated from an HUS patient in Germany, was sequenced and compared to the genomic sequences of the STEC O157:H7 reference strain EDL933. Second, a subtractive suppressive hybridization (SSH) between these two strains was performed. Third, the genomes of both O157 pathogens were compared to that of *E. coli* strain K-12 using a macroarray. Finally, the SF STEC O157:H⁻ strain 493/89 was analyzed for DNA sequences of major virulence genes using a pathoarray.

Using these techniques, two genes encoding potential virulence factors, which are specific for SF STEC O157:H⁻, have been identified. These include i) a 9669-bp open reading frame (ORF) encoding a multifunctional gene *efa1/lifA*, which is only rudimentarily present in STEC O157:H7; ii) the gene cluster encoding the cytolethal distending toxin (CDT). The *cdt* cluster of SF STEC O157:H⁻ demonstrates a high similarity to *cdt-III* of *E. coli* O15:H21 strain S5, which was reported to be plasmid-encoded. In contrast, the flanking regions of *cdt* in strain 493/89 indicate the acquisition of *cdt* via a temperate bacteriophage. In accordance with this hypothesis, *cdt* could be detected, using a PCR strategy, in 90% of SF STEC O157:H⁻, but also in STEC O157:H7 strains, even though with a low frequency.

Both macroarray methods identified a remarkable amount of specific differences between both O157 serotypes. Moreover, the *E. coli* K-12 macroarray confirmed a higher similarity of nonpathogenic *E. coli* K-12 to SF STEC O157:H⁻ than to STEC O157:H7. By sequencing the cosmid library, an 8,8 kb long sequence could be detected in SF STEC O157:H⁻, which

contains elements of the *Shigella* resistance locus (SRL) pathogenicity island (PAI). These elements are also homologous to bacteriophage sequences. This 8,8 kb sequence is missing in STEC O157:H7 and suggests a common acquisition of bacteriophage elements in SF STEC O157:H⁻ and *Shigella flexneri* 2a.

The presence of *efal/lifA*, *cdt* and the 8,8 kb SRL-homologue sequence was also tested by PCR in *E. coli* O55:H7 strains which are proposed to be ancestors of the O157 complex. The results indicate, that *efal/lifA* was already present in the O157 precursor, but the SRL-homologue sequence was received shortly before branching off the O157:H⁻ lineage. Both sequences were completely or partially deleted in O157:H7. Based on the PCR results, *cdt* was acquired by the SF STEC O157:H⁻ serotype after this lineage diverged from *E. coli* O157:H7.

In conclusion, all results confirm that SF STEC O157:H⁻ represent a distinct pathogenic group of STEC O157 which demonstrates remarkable genomic, virulence and evolutionary differences from STEC O157:H7.

B Einleitung

1. Bedeutung und Erregerspektrum von Durchfallerkrankungen

Unter den Infektionskrankheiten nehmen Durchfallerkrankungen weiterhin eine bedeutsame Stellung in der heutigen Welt ein. Dem aktuellsten Gesundheitsreport bezüglich tödlicher Infektionskrankheiten der WHO zu Folge, liegen diese an dritter Stelle hinter respiratorischen Infektionen und AIDS [WHO, 1999]. In den Entwicklungsländern sind vor allem unter 5-jährige Kinder betroffen, bei denen Durchfallerkrankungen die zweithäufigste Todesursache repräsentiert. Mehr als die Hälfte dieser Erkrankungen sind auf bakterielle Organismen zurückzuführen. In dem bakteriellen Erregerspektrum befinden sich in den Entwicklungsländern vor allem die klassischen Seuchenerreger *Vibrio cholera*, darmpathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Shigellen*. Im heutigen Europa stehen die Arten *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* und einige Pathotypen von *E. coli* an vorderster Stelle. Diese regionale Erregervariabilität ist unter anderem durch die unterschiedlichen Gegebenheiten bei der Ernährung, der Tierhaltung, der Wohnverhältnisse und der Hygiene zu erklären. Hauptinfektionsquelle ist kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser. Daneben können aber auch Tier-Mensch-Kontakte als Übertragungsweg relevant sein. Landwirtschaftlich genutzte Tiere sind als Reservoir für *Salmonellen* (Geflügel, Rinder und Schweine) und pathogene *E. coli* (Rinder, Schafe, Ziegen) bekannt. Von beiden genannten Erregergruppen sind Infektionen vor allem in Ländern mit hochentwickelter Landwirtschaft als sporadische Fälle, Familienerkrankungen oder Epidemien beobachtet worden. Bereits eine geringe Erregeranzahl kann ausreichen, um beim verzehrfertigen Endprodukt über die Infektionsdosis hinaus zu gelangen. Insbesondere ist dies bei einem hygienisch nicht einwandfreien Verarbeitungsprozess von tierischen Lebensmitteln der Fall.

2. Der Pathotyp Shiga Toxin-Produzierende *E. coli* (STEC)

Die meisten Stämme der Gattung *E. coli* gelten als kommensale Darmbewohner, sind also in der Regel apathogen und erfüllen physiologische Funktionen. Doch gerade *E. coli* zeichnet sich auch durch eine Vielfalt an pathogenen Subgruppen aus. Durch ausgeprägten horizontalen Gentransfer, wie etwa durch die Aufnahme von Plasmiden, Bakteriophagen oder sogenannten Pathogenitätsinseln sind im Laufe der Evolution von *E. coli* humanpathogene Erreger entstanden. So werden derzeit sieben Klassen Diarrhoe auslösende *E. coli* definiert

[Clarke, 2001]. Namentlich sind dies die Enteroaggregativen *E. coli* (EAEC), Shiga Toxin-Produzierende *E. coli* (STEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enterotoxische *E. coli* (ETEC), Diarrhoe-assoziierte-hämolytische *E. coli* (DHEC) und die Cytotoxigenes Distending Toxin (CDT)-produzierenden *E. coli*. Global gesehen spielen EPEC und ETEC die größte Rolle, während in den Industriestaaten insbesondere in den letzten Jahren STEC an Bedeutung gewonnen hat [Caprioli und Tozzi, 1998; Griffin 1998; Smith *et al.*, 1998; Spika 1998]. Erstmals wurden STEC als humanes Pathogen im Jahre 1982 mit zwei Ausbrüchen Hämorrhagischer Kolitis (HK) durch *E. coli*-Stämme des Serotyps O157:H7 in den USA in Verbindung gebracht [Riley *et al.*, 1983; Wells *et al.*, 1983]. Der Symptomatik der Erkrankung nach folgend wurden sie zunächst als Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) definiert. Diese Bezeichnung findet oftmals auch heute noch für STEC Verwendung. Weitere bedeutsame Ausbrüche wurden aus unterschiedlichen Bereichen der Welt inklusive Nord-Amerika, West-Europa, Australien und Asien berichtet. Vor allem Säuglinge, Kleinkinder, ältere Menschen und andere abwehrgeschwächte Personen zeigen ein lebensbedrohliches Krankheitsbild. In den überwiegenden Fällen der durch STEC verursachten Erkrankungen treten wässrige Durchfälle auf, welche oft von kolikartigen Bauchschmerzen begleitet sind. In 10 bis 20 % der Fälle zeigt sich im weiteren Krankheitsverlauf die Symptomatik des wässrig-hämorrhagischen Durchfalls. Das lebensbedrohliche sogenannte Hämolytisch-uräemische Syndrom (HUS) tritt bei etwa 5-10 % der Fälle auf und ist gekennzeichnet durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen. STEC-bedingte HUS-Fälle stellen die bedeutsamste Ursache für akutes Nierenversagen bei Kindern dar, 2-7 % der Fälle enden tödlich [Kaplan, 1998]. Die Bedeutung der Hämorrhagischen Kolitis ist bei den über 65-jährigen am höchsten mit einem Letalitätsfaktor von 15 bis 23 % in dieser Altersgruppe [Griffin und Tauxe, 1991]. Als Hauptkontaminationsquelle sind rohe Lebensmittel, nicht ausreichend erhitztes Fleisch oder Fleischprodukte, nicht pasteurisierte Milch und Rohmilchprodukte zu nennen. Epidemiologische Ausbrüche in Altenheimen oder Kindergärten deuten auch auf eine hohe Bedeutung der Mensch-zu-Mensch-Infektkette hin. Der bisher größte STEC-Ausbruch war 1996 in Sakai City, Osaka in Japan zu verzeichnen [Michino *et al.*, 1998]. Mehr als 8000 Menschen waren betroffen, zumeist Schulkinder, 106 Patienten entwickelten ein HUS, drei davon verstarben. Weiße Radieschenkeimlinge, die als Teil der Schulverpflegung dienten, gelten als der wahrscheinlichste Infektionsherd.

In diesem Zusammenhang ist die geringe Infektionsdosis der STEC erwähnenswert, welche nach unterschiedlichen Studien zwischen 20 und 700 Organismen liegt [Tuttle *et al.*, 1999;

Willshaw *et al.*, 1994]. Damit ist diese wesentlich kleiner als bei den EPEC, die mehr als 10^8 Organismen für eine Infektionsauslösung benötigen. Eine Erklärung könnte in der unterschiedlichen Resistenz gegenüber Säure zu finden sein. So kann STEC O157 auch in säurehaltigen Lebensmitteln wie beispielsweise fermentierter Wurst, Mayonnaise, Joghurt oder Apfelsaft längere Zeit lebensfähig bleiben [Meng und Doyle, 1998]. Entscheidend für die größere Pathogenität dürfte jedoch die höhere Ausstattung an Virulenzmechanismen im Vergleich zu EPEC sein. Im Folgenden werden die bisher wichtigsten entdeckten Virulenzfaktoren der STEC beschrieben.

3. Shiga Toxine

Ursache für die schwerere Form des STEC-Krankheitsbilds sind unter anderem die dem *E. coli*-Pathovar namensgebenden Shiga Toxine (Stx) bzw. Shigalike Toxine (Slt), welche den Hauptpathogenitätsfaktor der STEC darstellen. Konowalchuk *et al.* berichteten 1977 als erste über cytotoxische Effekte von Überständen einiger *E. coli*-Isolate auf Verozellen (Nierenzellen des Affen). Später konnte das verantwortliche Toxin, welches zunächst als Verotoxin bezeichnet wurde, aus einem STEC O157:H7-Stamm isoliert werden [O'Brien *et al.*, 1983]. Die aktuellere Bezeichnung „Shiga Toxin“ ist durch die Identität des gefundenen Toxins mit dem Toxin in *Shigella dysenteriae* gegeben. Dieses Bakterium wurde von Kyoshi Shiga erstmals im Jahre 1898 beschrieben und gilt als ein üblicher Erreger der Shigellenruhr. Das Vorkommen des Toxins in weiteren *E. coli*-Isolaten führte zu der Bezeichnung Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC). Diese Bezeichnung ist heutzutage mit der zuvor geltenden EHEC-Namensgebung gleichgesetzt, da STEC das gleiche Krankheitsbild wie EHEC aufweisen. Streng nach Definition geht man davon aus, dass alle EHEC pathologische Wirkungen besitzen, jedoch nicht alle STEC. Daher gelten EHEC vielmehr als Untergruppe innerhalb der STEC [Nataro und Kaper, 1998].

Shiga Toxine wirken als Inhibitoren der Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen [O'Loughlin und O'Brown, 2001]. Sie setzen sich aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten zusammen. Die B-Untereinheiten sind für die Anheftung des Holotoxins an Globotriaosylceramid-Rezeptoren (Gb3) der Membranaußenseite von überwiegend im kapillaren Endothel vorkommenden Zielzellen verantwortlich. Die Untereinheit A stellt die eigentliche enzymatisch aktive Einheit dar und wirkt nach Internalisierung in die Zelle als rRNA-Glykosidase. Durch Hemmung der 60S-ribosomalen Untereinheit kommt es zu einer Inhibierung der Proteinbiosynthese, was letztendlich zum Untergang der betroffenen Zelle führt [Sandvig und van Deurs, 1996]. Pathophysiologisch sind kapillare Endothelschäden für

die Primärwirkung dieses Toxins verantwortlich. Die charakteristischen Symptome einer HUS-Erkrankung, wie hämolytische Anämie, thrombotische Mikroangiopathie und Nierenversagen sind als Sekundärreaktion dieser Endothelzellschädigung anzusehen.

Die Präsenz des gleichen Toxins in zwei unterschiedlichen Erregergruppen, *Shigella* und *E. coli*, warf die Frage auf, ob ein genetischer Zusammenhang vorhanden ist. Während das Shiga Toxin-Gen in *S. dysenteriae* auf dem Chromosom kodiert ist, befindet sich das entsprechende Toxin-Gen in STEC-Stämmen im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen. Dies deutet auf einen Gentransfer via Bakteriophagen von *Shigella* nach *E. coli* hin. Zwei verschiedene Phagen mit zwei antigenetisch unterschiedlichen Shiga Toxinen konnten gefunden werden. Shiga Toxin 1 (Stx1) des Bakteriophagen H19B besitzt 98 % Homologie in der Aminosäuresequenz zu Stx von *S. dysenteriae*. Bakteriophage 933W enthält Shiga Toxin 2 (Stx2), welches weniger als 60 % Homologie zu Stx1 aufweist. Zudem sind weitere Stx2-Varianten gefunden worden (c, d, e und f), die sich vor allem in ihrer B-Untereinheit strukturell voneinander unterscheiden. Diese Sequenzunterschiede scheinen auch pathologisch von Bedeutung zu sein. Epidemiologische Studien ergaben, dass STEC-Stämme, die allein das *stx*₂-Gen in ihrem Genom besitzen, eher mit HUS-Fällen in Verbindung gebracht werden können als STEC-Stämme, die nur das *stx*₁ Gen enthalten [Kleanthous *et al.*, 1990]. In einem Tiermodell wurde zudem eine 400-fache höhere Nierenschädigung durch Stx2 als durch Stx1 ermittelt [Tesh *et al.*, 1993]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Expression von Stx1 eher Umwelteinflüssen wie zum Beispiel der Eisenkonzentration unterliegt. So wird die Stx1-Produktion in eisenhaltigem Medium unterdrückt, während dies bei den Stx2-Varianten nicht der Fall ist [Weinstein *et al.*, 1988; Mühldorfer *et al.*, 1996].

4. Weitere Pathogenitätsfaktoren der STEC

4.1. Die Pathogenitätsinsel LEE

Neben dem charakteristischen Shiga Toxin besitzen STEC eine Vielzahl weiterer für den Infektionsverlauf relevante Pathogenitätsfaktoren. Bevor die Ausschleusung des Toxins erfolgt, ist eine intensive Anheftung des Bakteriums an die Wirtszelle notwendig. Erst durch Anheftung an die Darmschleimhaut wird es enteritischen Pathogenen ermöglicht, der Darmperistaltik entgegenzuwirken und Toxine effizient an das Wirtsorgan abzugeben. Tzipori *et al.* entdeckten durch STEC O157:H7 verursachte sogenannte „attaching and effacing“ (A/E)-Läsionen im Darmepithel von Ferkeln, die den Effekten klassischer EPEC-Stämme ähneln [Tzipori *et al.*, 1995]. Neben der Serogruppe O157 konnten später noch einige andere A/E-Läsionen-auslösende STEC-Serogruppen gefunden werden. A/E-Läsionen zeichnen sich

durch einen Verlust des Bürstensaums des Darmepithels und durch Veränderungen im Cytoskelett aus, welche zu charakteristischen becherartigen Einstülpungen führen, in denen die Bakterien anhaften können. Durch den Fluorescent Actin Staining (FAS)-Test ist es möglich, mit Hilfe von fluoreszierendem Phalloidin diese Einstülpungen, welche aus angereicherten Aktinfilamenten bestehen, mikroskopisch sichtbar zu färben. Für die Ausbildung dieses Pathogenitätsbildes konnte das Protein Intimin, welches von dem Gen *eae* (stehend für „*E. coli* attaching and effacing“) kodiert wird, mitverantwortlich gemacht werden. Das Gen ist Bestandteil einer 35 Kb großen Pathogenitätsinsel, welche außer *eae* noch Gene für einen *eae*-Rezeptor (*tir*, translocated intimin receptor), ein Sekretionssystem (*esp*-Gene, *E. coli* secreted proteins) und weitere für die A/E-Läsionen essentielle Gene für die Signalinduktion trägt. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde diese Pathogenitätsinsel „Locus for enterocyte effacement“ (LEE) genannt [McDaniel *et al.*, 1995].

Pathogenitätsinseln (PAIs) sind als große genomische DNA-Fragmente charakterisiert, die in pathogenen Stämmen vorkommen, während sie in nichtpathogenen Stämmen derselben oder einer verwandten Art fehlen. Sie weisen üblicherweise einen anderen Gehalt der Basen Guanin und Cytidin im Vergleich zum Restgenom auf und sind oft von Wiederholungen einer kurzen Basensequenz flankiert. Zudem sind sie vielfach nahe an tRNA-Genen lokalisiert. Im Falle der LEE sind dies *selC* (Selenocystein spezifische tRNA) und *pheU* (Phenylalanin spezifisch).

Bei Vergleich der vollständigen LEE-PAI-Sequenz des EPEC-Stammes E2348/69 mit der des STEC O157:H7-Stammes EDL933 konnte gezeigt werden, dass die LEE-PAI in O157:H7 um 7,8 Kb größer ist als die 35,6 Kb große LEE-PAI des EPEC-Stammes [Perna *et al.*, 1998]. Diese Differenz ist durch zusätzliche DNA in der O157:H7-LEE-PAI mit Homologie zur P4-Prophagenfamilie erklärbar. Die gemeinsamen 41 Gene zeigen hingegen mit einer durchschnittlichen Identität von 93,9 % eine größere Ähnlichkeit miteinander auf. Die geringste Identität weist das *tir*-Gen mit 33,5 % Unterschied auf. Dies hat allerdings nur Auswirkungen auf die Tir-Phosphorylierung nach der Translokation des Tir-Rezeptors in die Zielzelle. Während das EPEC-Tir-Protein an den Tyrosinresten phosphoryliert wird, erfolgt bei dem EHEC-Tir-Protein keine Phosphorylierung. In beiden Fällen werden daraufhin aber die charakteristischen Änderungen im Cytoskelett ausgelöst [DeVinney *et al.*, 1999].

Zur Zeit sind fünf unterschiedliche Intiminarten basierend auf ihrer unterschiedlichen Antigenstruktur und DNA-Sequenz ermittelt worden. Während α - und δ -Intimin hauptsächlich in EPEC-Stämmen vorhanden sind, sind β - und γ -Intimin sowohl in EPEC als auch in STEC-Stämmen präsent [Adu-Bobie *et al.*, 1998].

4.2. Andere Adhärenzfaktoren

Der Befund, dass Klonierung der LEE-PAI eines EPEC-Stammes in einen apathogenen *E. coli* K-12-Stamm diesem Stamm Adhärenz verleiht [McDaniel *et al.*, 1997], die klonierte LEE-PAI des STEC O157:H7-Serotyps hingegen nicht [Elliott *et al.*, 1999], ließ weitere Adhärenzfaktoren in STEC vermuten. Tarr *et al.* konnten erstmals ein Außenmembranprotein in STEC O157:H7 nachweisen, welches alleine ausreicht, um einen adhärennten Phänotyp bei einem nichtadhärennten *E. coli* zu erzeugen [Tarr *et al.*, 2000]. Da das Protein hohe Ähnlichkeit zu dem Eisenaufnahmeprotein „iron-regulated gene A“ (IrgA) von *Vibrio cholerae* besitzt, wird es als Iha (IrgA homologue adhesin) bezeichnet. Direkt neben dem *Iha*-kodierenden Gen liegend befinden sich Telluritresistenz vermittelnde Gene. Da diese Genstrukturierung in mehreren Stämmen gefunden wurde, wird bei diesem konservierten Bereich von einer Pathogenitätsinsel ausgegangen (Tellurite-resistance and Adherence-confering Island, TAI). Zur Zeit ist noch unklar, ob Iha bei *eae*-negativen STEC-Stämmen entscheidende Adhärenzfunktionen übernehmen kann oder ob Iha eventuell die Expression kryptisch verborgener Adhäsine in nicht adhärennten *E. coli* erhöht.

In einem STEC O111:H⁻ -Isolat eines HUS-Patienten wurde ein 9.669 Bp großer ORF gefunden, welcher für die Adhärenz an kultivierten Epithelzellen, die Hämagglutination und Autoaggregation dieses Stammes essentiell ist [Nicholls *et al.*, 2000]. Das kodierte Protein wird als EHEC factor for adherence (Efa1) bezeichnet und wurde unabhängig zur gleichen Zeit von einer anderen Arbeitsgruppe als Lymphostatin (LifA) benannt [Klapproth *et al.*, 2000]. Für den dort beschriebenen EPEC O127:H6-Stamm konnte eine Hemmung der Lymphozytenproliferation und eine verminderte Produktion von Interleukin-2 (IL-2), IL-4 und γ -Interferon bedingt durch die Expression dieses Proteins nachgewiesen werden. Die Sequenz dieses multifaktoriellen offenen Leserahmens (open reading frames, ORFs) weist im ersten Drittel Homologien zu einem Cytotoxin von *Clostridium difficile* auf, welches GTP-bindende Proteine glykosyliert und dadurch inaktiviert. Inwiefern das *efa1/lifA* Gen zu dem pathophysiologischen Geschehen in STEC oder EPEC beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Der bisher am besten untersuchte Adhärenzmechanismus für EPEC ist die durch Pili oder Fimbrien vermittelte Anheftung an die Wirtszelle. Diese 2 μ m langen und 2-6 nm dicken Zellorganellen bestehen meist aus helikal angeordneten Pilinproteinen und sind mikroskopisch als haarförmige Struktur auf der Zelloberfläche gut sichtbar. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben fimbrielle Strukturen für STEC O157 und O26 [Karch *et al.*, 1987; Maneval *et al.*, 1997]. Der genetische Hintergrund und die genaue molekulare Struktur

dieser Fimbrien ist jedoch weiterhin unbekannt. Kürzlich konnte ein plasmidkodiertes Gencluster in dem Sorbitol fermentierenden (SF) STEC O157:H⁻ Serotyp gefunden werden (sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmidencoded, *sfp*), welches einen neuartigen Typ von Fimbrien kodiert [Brunder *et al.*, 2001]. Es zeigt hohe Ähnlichkeit zu dem P-Fimbrien-Gencluster (pyelonephritis associated pili, *pap*) der Uropathogenen *E. coli* (UPEC). Diese P-Fimbrien bilden an ihrer Spitze eine flexible „Tip-Struktur“ aus, die mit Rezeptoren der Wirtszelle interagiert. Eine Fimbrienstruktur konnte jedoch nur in *sfp*-klonierten *E. coli* Laborstämmen gefunden werden. Unter normalen Laborbedingungen ist bei den *sfp*-Gen tragenden STEC-Wildstämmen keine Fimbrienstruktur erkennbar. Es wird vermutet, dass das Gen nur unter Bedingungen, wie sie während einer Infektion gegeben und im Labor nicht nachahmbar sind, exprimiert werden kann.

4.3. Eisenaufnahmesysteme

Eisen ist für zahlreiche enzymatische lebensnotwendige Redox-Stoffwechselprozesse erforderlich und in der Regel für bakterielle Pathogene im Wirtsorganismus streng limitiert. Daher ergeben sich für Pathogene, die verschiedene Eisenaufnahmesysteme entwickelt haben, entscheidende Wachstumsvorteile. In *E. coli* konnten Eisen-bindende Verbindungen, sogenannte Siderophore, identifiziert werden, die nach Bindung an Zellwandrezeptoren das Eisen in die Zelle hineinschleusen. Von den beiden wichtigsten Siderophoren, der Catecholverbindung Enterobaktin und der Hydroxamatverbindung Aerobaktin, wurde jedoch nur das Erstgenannte in STEC O157:H7 nachgewiesen [Torres und Payne, 1997]. Allerdings konnte bisher eine wirkliche Nutzung dieses Siderophors für O157:H7 nicht beobachtet werden. Hingegen scheint der Blutfarbstoff Häm als Eisenlieferant eine große Bedeutung zu haben. Mit ChuA ist ein möglicher Häm-Rezeptor in STEC identifiziert worden [Torres und Payne, 1997]. Er ist im wesentlichen identisch zum Häm-Rezeptor von *Shigella dysenteriae*. Mit einem derartigen Rezeptor könnte das durch den pathogenen Organismus verursachte hämorrhagische Krankheitsbild mit einer effizienten Eisenaufnahme mittels dieses Häm-Rezeptors in Zusammenhang stehen.

In weiteren Laborversuchen konnte Eisencitrat als Eisenquelle nachgewiesen werden [Torres und Payne, 1997]. Das hierfür verantwortliche Ferric Dicitrate Transport System (Fec) in *E. coli* Stamm K-12 ist jedoch nicht in STEC O157:H7 gefunden worden.

4.4. EHEC-Hämolysin

Neben dem Shiga Toxin ist ein weiteres Toxin am Virulenzgeschehen der STEC beteiligt, das sogenannte Enterohämolysin-Toxin (HlyA). Es ist verantwortlich für porenbildende Prozesse an Lipidmembranen [Schmidt *et al.*, 1996], was letztendlich auch zur Lyse von Erythrozyten führen kann. Auf Blutagarplatten, welche gewaschene Erythrozyten enthalten, sind nach 18- bis 24-stündiger Inkubation um die gewachsenen STEC-Kolonien hämolytische Zonen (Lysehöfe) erkennbar. Das Hämolysinsystem enthält neben dem eigentlichen Toxigen *hlyA*, drei weitere Gene *hlyB*, *hlyC* und *hlyD*. HlyB und HlyD sind für die Sekretion und HlyC für die Aktivierung von HlyA verantwortlich [Schmidt *et al.*, 1996]. Enterohämolysin ist zu 60 % mit dem α -Hämolysin der UPEC identisch, welches im Unterschied zu HlyA bereits nach 4-stündiger Inkubation wesentlich größere Lysehöfe ausbilden kann. Obwohl Enterohämolysin häufig mit HUS- und HK-Isolaten assoziiert ist, ist es nicht essentiell für die Ausbildung dieser schweren Krankheitsformen. Da das Enterohämolysin-Operon jedoch eine hohe Konservierung in unterschiedlichen STEC-Stämmen aufweist, scheint es eine wichtige Rolle für die Überlebensfähigkeit dieser Pathogruppe zu haben [Boerlin *et al.*, 1999]. Für STEC O157 konnte das Enterohämolysin-Operon auf dem Plasmid pO157 identifiziert werden [Schmidt *et al.*, 1994].

4.5. Enteroaggregatives Hitzestabiles Toxin

In mehreren STEC-Serogruppen wurde ein zuvor für EAEC beschriebenes Toxin nachgewiesen, das hitzestabile enteroaggregative EAST1-Toxin [Savarino *et al.*, 1996]. Dieses 38 Aminosäuren große Protein weist strukturelle Ähnlichkeit zum hitzestabilen ETEC-Toxin ST auf. Interessanterweise ist EAST1 in STEC-Stämmen verbreiteter als in EAEC-Stämmen. Im Tiermodell konnte eine enterotoxische Aktivität nachgewiesen werden [Savarino *et al.*, 1991]. Inwieweit die Möglichkeit besteht, dass das Toxin zur initialen Erkrankungsphase mit wässrigen Durchfall bei STEC-Infektionen beiträgt, ist noch nicht ausreichend geklärt worden.

4.6. Typ II-Sekretionssystem

Im Plasmid pO157, neben dem Enterohämolysin benachbart, wird ein sogenanntes Typ-II-Sekretionssystem (Etp) kodiert [Burland *et al.*, 1998]. Derzeit werden für gramnegative Bakterien vier verschiedene Proteinsekretionssysteme unterschieden (Typ I bis IV). Sie werden neben Exportprozessen des allgemeinen Zellstoffwechsels auch für die

Ausschleusung wichtiger Virulenzfaktoren aus der prokaryotischen Zelle benötigt. Bei dem Typ-II-Sekretionssystem, welches unter anderem auch von EPEC zum Transport von Pili eingesetzt wird, sind insgesamt 14 Proteine beteiligt. Kennzeichnend ist auch, dass ein Teil der Transportkomponenten den Sec-abhängigen General Secretory Pathway (GSP) verwendet [Russel, 1998]. Daher wird auch von einem Typ-II-Sec-System gesprochen. Der Transport erfolgt nach Abspaltung einer N-terminalen hydrophoben Signalsequenz des zu transportierenden Proteins durch eine Signalpeptidase. Welche Proteine in STEC über dieses Transportsystem transportiert werden, konnte noch nicht ermittelt werden. Das Etp-Gencluster wurde jedoch in wichtigen STEC-Pathogruppen nachgewiesen [Karch *et al.*, 1998].

4.7. Serinprotease

Ebenfalls auf dem Plasmid pO157 wurde ein Gen gefunden, dessen Expressionsprodukt Ähnlichkeiten mit Serinproteasen besitzt [Brunner *et al.*, 1997]. Das entsprechende Protein EspP (Extracellular serine protease, Plasmid-encoded) wird über einen Autotransportermechanismus in den Extrazellularraum abgegeben und weist in der Tat proteolytische Eigenschaften gegenüber unterschiedlichen Substraten auf. Unter anderem wird der Antikoagulationsfaktor V durch EspP gespalten. Diese Inaktivierung könnte durch Koagulationshemmung eine verstärkte Blutung in den Darm-Trakt bewirken. Dass EspP *in vivo* exprimiert wird, konnte durch spezifische EspP-Antikörper im Blut von Kindern, die an einer STEC-Infektion erkrankt waren, gezeigt werden. Da jedoch nicht in allen STEC-Stämmen, die HK und HUS zu verursachen vermögen, das EspP-Gen bestimmt werden konnte, scheint es nicht essentiell für die Entwicklung des hämorrhagischen Krankheitsprozesses zu sein.

4.8. Katalase/Peroxidase

Die Analyse des pO157-Plasmids erbrachte einen weiteren potentiellen Virulenzfaktor hervor, der eine Rolle bei der Detoxifizierung von oxidierenden und damit cytotoxischen Produkten von beispielsweise lysierten Makrophagen spielen könnte. Das Gen *katP* kodiert für eine bifunktionale Katalase/Peroxidase, welche im Periplasma von Zellen akkumuliert [Brunner *et al.*, 1996]. Allerdings konnte bislang kein Unterschied in der Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid zwischen dem pO157 tragendem Wildstamm und einer plasmidfreien Mutante beobachtet werden. Außerdem weist auch hier die uneinheitliche Verteilung dieses

Gens über verschiedene STEC-Serogruppen auf einen scheinbar nicht bedeutsamen Pathogenitätsfaktor hin.

5. Bedeutung von O157 innerhalb der STEC-Serogruppen

Derzeit sind etwa 200 STEC Serotypen bekannt [Nataro und Kaper, 1998]. Mit Abstand die wichtigste Bedeutung hat Serotyp O157:H7, weshalb dieser bisher auch am besten untersucht worden ist. Allein in den Vereinigten Staaten wird jährlich von 75.000 Fällen einer Infektion mit O157:H7 ausgegangen [Mead *et al.*, 1999]. Bei den HUS- oder HK-auslösenden Nicht-O157-Serotypen sind als wichtigste Vertreter O26, O103, O111 und O113 zu nennen [Griffin *et al.*, 1991]. Im Gegensatz zu den letztgenannten Serotypen zeichnet sich O157:H7 durch eine nur schwach ausgeprägte Fähigkeit, Sorbitol zu fermentieren und der fehlenden Exprimierung von β -Glucuronidase aus. Dies wird für die Routinediagnostik mit Hilfe von Sorbitol MacConkey (SMAC)-Agarplatten ausgenutzt. *E. coli* kann in der Regel auf MacConkey-Agarplatten nachgewiesen werden, der Zusatz des pH-Indikators Neutralrot bewirkt eine Rotfärbung der *E. coli*-Kolonien durch Lactosefermentation. In Sorbitol MacConkey-Platten ist dem Agar an Stelle der Lactose 1 % Sorbitol zugesetzt. Da O157:H7-Isolate nicht in der Lage sind, Sorbitol innerhalb von 24 Stunden zu fermentieren, bleiben diese weiß und färben sich nicht rot wie die Sorbitol-fermentierenden Stämme. Dieses Screening-Verfahren des bedeutsamsten STEC-Erregers ist sehr preisgünstig und hat sich vor allem in den USA durchgesetzt. Für die Detektion der Nicht-O157-Erreger ist allerdings der Nachweis des Shiga Toxins durch PCR oder ELISA notwendig.

In Deutschland wird der Hauptteil der meldepflichtigen STEC-Erkrankungen ebenfalls durch Serotyp O157 verursacht. 1999 lag der O157-Anteil bei 34 % [Robert-Koch-Institut, 2000]. Auffallend ist jedoch, dass neben dem Serotyp O157:H7 der nicht begeißelte und Sorbitol fermentierende (SF) Serotyp O157:H⁻ einen nicht unbeträchtlichen Anteil einnimmt. In unterschiedlichen Studien konnte innerhalb der O157-Serogruppe für SF STEC O157:H⁻ ein Anteil von 13,3 bis 40,5 % bei HUS-Isolaten und von 7,4 bis 25 % bei Durchfall-Isolaten identifiziert werden [Bockemühl *et al.*, 1996, 1997, 1998; Karch *et al.*, 1997; Karch, unveröffentlicht]. Der erste nachgewiesene HUS-Ausbruch in Deutschland wurde 1988 auf eben diesen Serotyp zurückgeführt [Karch *et al.*, 1990]. Da dieser im Gegensatz zu O157:H7 β -Glucuronidase produziert und Sorbitol innerhalb von 24 Stunden fermentiert, verhält er sich demnach auf der SMAC-Platte ebenso wie STEC-Nicht-O157 unauffällig. Daher wird davon ausgegangen, dass die Detektierung von STEC Nicht-O157 und SF STEC O157:H⁻ bei der beispielsweise in den USA üblichen Routinediagnostik nur unzureichend ist. Weitere in

Zusammenhang mit HUS-Ausbrüchen stehende SF STEC O157:H⁻ konnten in Tschechien, Ungarn, Österreich und Finnland isoliert werden [Bielaszewska *et al.*, 1998, 2000; Caprioli und Tozzi, 1998; Keskimäki *et al.*, 1998; Allerberger *et al.*, 2000]. Kürzlich wurde zum ersten Mal von einem außerhalb Europas gefundenen SF STEC O157:H⁻ Isolat berichtet, welches in Australien isoliert worden ist [Bettelheim *et al.*, 2002].

6. Virulenzgenetische Unterschiede zwischen STEC O157:H7 und SF STEC O157:H⁻

Neben den phänotypischen Unterschieden der beiden O157 Serotypen hinsichtlich ihrer Motilität und Fähigkeit, Sorbitol zu fermentieren, konnten mehrere Differenzen in der genetischen Ausstattung an Virulenzfaktoren gefunden werden [Karch und Bielaszewska, 2001]. Diese sind in Tabelle B-1. zusammengestellt. Während in O157:H7 neben *stx₁* auch *stx₂* und *stx_{2c}* entweder allein oder in Kombination vorkommen können, ist bei allen bisher gefundenen SF STEC O157:H⁻ -Isolaten nur das *stx₂*-Gen nachweisbar. Die fehlende Resistenz gegenüber Tellurit bei SF STEC O157:H⁻ im Gegensatz zu STEC O157:H7 ist durch die Abwesenheit der entsprechenden Pathogenitätsinsel TAI in SF STEC O157:H⁻ erklärbar. Die auffälligsten Unterschiede konnten jedoch auf dem in beiden Serotypen vorhandenen ca. 90 Kb großen Plasmid gefunden werden. Während in STEC O157:H7 die Katalase/Peroxidase und Serinprotease kodierenden Gene *katP* und *espP* präsent sind, fehlen diese bei SF STEC O157:H⁻. Im Gegensatz dazu ist mit dem Fimbriencluster *sfp* ein SF STEC O157:H⁻ -spezifisches Gen entdeckt worden, welches bislang noch in keiner anderen Art der Familie *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden konnte. Obwohl in beiden Serotypen das Enterohämolysin kodiert ist, wurde die Expression bei nur 12 % der SF STEC O157:H⁻ -Isolate in einer Studie von 1996 bis 2000 festgestellt [Karch, unveröffentlicht].

Tab. B-1.: Virulenz-assoziierte Gene in STEC O157:H7 und SF STEC O157:H⁻.

Serotyp	Chromosom			Plasmid				
	<i>stx</i>	<i>eae</i>	TAI	EHEC <i>hlyA</i>	<i>katP</i>	<i>espP</i>	<i>etp</i>	<i>sfp</i>
STEC O157:H7	1,2,2c	γ	+	+	+	+	+	-
SF STEC O157:H ⁻	2	γ	-	+	-	-	+	+

Die Mehrheit der Europäischen SF STEC O157:H⁻ -Isolate weisen das gleiche Virulenzgenspektrum auf. Erst kürzlich konnte eine SF STEC O157:H⁻ -Variante in Tschechien gefunden werden, bei der auf dem Plasmid das EHEC HlyA- und Etp-Gen fehlt,

sfp hingegen präsent ist [Bielaszewska *et al.*, 2002]. Das beschriebene Isolat in Australien weist im Gegensatz dazu ein Fehlen von *sfp* und ein Vorhandensein von *katP* auf.

7. Phylogenie des O157-Komplexes

Die gesamte chromosomale Sequenz des STEC O157:H7-Stammes EDL933 wurde 2001 veröffentlicht [Perna *et al.*, 2001]. Mit 5.522.329 Basenpaaren ist das Genom etwa 0,9 Mb größer als das des ebenfalls vollständig sequenzierten apathogenen *E. coli* Laborstammes K-12 mit 4.639.221 Bp [Blattner *et al.*, 1997]. In der Annahme eines gemeinsamen Vorfahren vor etwa 4,5 Millionen Jahren [Reid *et al.*, 2000] hat im Laufe der Weiterentwicklung STEC O157 seine hohe Pathogenität durch die Aufnahme mehrerer Virulenzfaktoren erhalten. Feng *et al.* konnte durch Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) einen phylogenetischen Bezug von STEC O157 zu EPEC O55:H7 herstellen. In der Untersuchung wurden 46 Stämme, darunter STEC O157:H7, SF O157:H⁻, O55:H7, O26, O111 und EPEC O55:H7 auf ihre Ähnlichkeit hinsichtlich 20 verschiedener Enzyme verglichen [Feng *et al.*, 1998]. Die größten Gemeinsamkeiten miteinander wiesen die STEC Serotypen O157:H7, SF O157:H⁻, O55:H7 und EPEC O157:H7 auf. Basierend auf den gefundenen Enzym-Allel-Profilen, den vorhandenen Virulenzfaktoren und der Sequenz des β -Glucuronidase kodierenden Gens *uidA* wurde ein stufenweises Modell für die evolutionäre Entwicklung dieses sogenannten O157-Komplexes erstellt (Abbildung B-1.). Ein mutmaßlicher EPEC-Stamm mit der in *selC* integrierten LEE-PAI gilt als Vorläuferpathovar. Allen Serotypen des O157-Komplexes ist eine Mutation des *uidA*-Gens in der Position 10 gemeinsam, so auch bei EPEC O55:H7, von dem ein repräsentatives Isolat gefunden werden konnte. Aufnahme der Stx2-Phage führte zu STEC O55:H7. Die nachfolgende Auftrennung in den nicht begeißelten O157:H⁻ und den *stx*₁-tragenden, nicht Sorbitol fermentierenden O157:H7-Serotyp erfolgte vermutlich über eine O157:H7-Zwischenstufe. Deren Entwicklung aus O55:H7 wird durch einen Übergang einer *rfbE*-ähnlichen Region des *rfb*-clusters, welches die Enzyme für die Biosynthese der Lipopolysaccharide-O-Seitenketten kodiert, erklärt [Bilge *et al.*, 1996]. Zudem tritt eine weitere Mutation im *uidA*-Gen auf, welche sowohl in O157:H7 als auch in SF O157:H⁻ präsent ist. Für diese hypothetische O157:H7-Zwischenstufe wurde bislang kein entsprechendes Isolat gefunden. Der heute beobachtete weit verbreitete O157:H7-Phänotyp ist diesem Modell zufolge nach Verlust der β -Glucuronidase-Aktivität aus dieser Zwischenstufe entstanden.

In Abbildung B-1. sind die durch MLEE ermittelten Elektrophorese-Typen (ET) der entsprechenden Phänotypen angegeben. Der Phänotyp der getesteten SF STEC O157:H⁻ -

Isolate, der ET4 entspricht, zeigt die größte Abweichung zu den anderen Elektrophorese Typen. ET2, ET3 und ET5 weisen jeweils nur in einem der 20 getesteten Enzyme Unterschiede zu der Referenz ET1 auf. ET4 hingegen besitzt Differenzen in zwei Enzymen zu ET1. Schon vor Erstellung dieses phylogenetischen Modells war durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)- und Phagentypisierungs-Untersuchungen verschiedener O157-Isolate auf die eigenständige Bedeutung von SF STEC O157:H⁷ innerhalb der O157-Gruppe hingewiesen worden [Karch *et al.*, 1993; Liesegang *et al.*, 2000]. Die gegenüber O157:H7 unterschiedliche Virulenzgen-Ausstattung des Plasmids, welches in dem Modell vermutlich durch die hypothetische Zwischenstufe erhalten wurde, unterstützt diesen Befund zusätzlich [Brunner *et al.*, 1999].

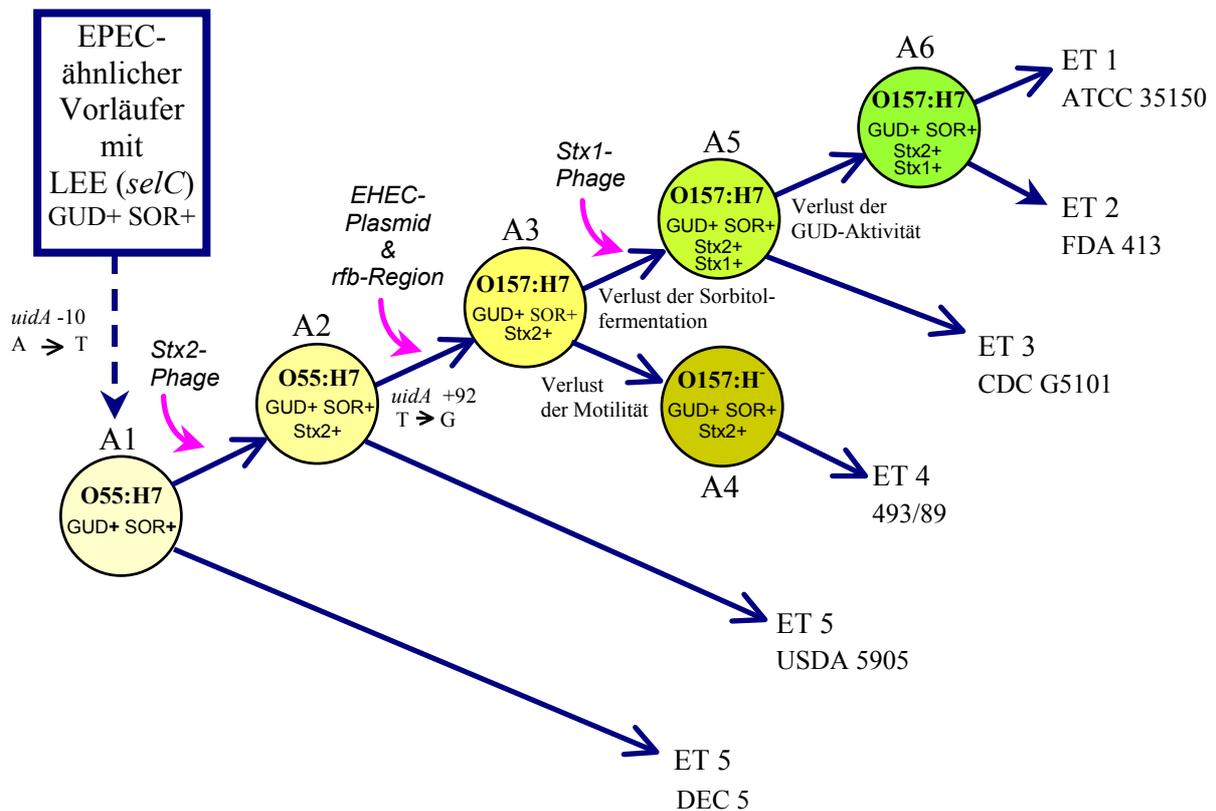


Abb. B-1.: Phylogenetisches Modell der Entwicklung des O157-Komplexes beruhend auf Stx-Produktion, Sorbitolfermentation, Multilokus-Enzym-Elektrophorese-Profilen und Mutationen im *uidA*-Gen [Feng *et al.*, 1998].

8. Aufgabenstellung

Obwohl die eigenständige Bedeutung des SF STEC O157:H⁻-Serotyps bereits hinreichend geklärt werden konnte, ist das volle Pathogenitätsspektrum dieses STEC-Erregers noch nicht ausreichend bekannt. Bislang sind die größten Unterschiede bezüglich der Ausstattung an Pathogenitätsfaktoren vorwiegend auf den beiden Plasmidsequenzen gefunden worden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand unterschiedlicher Analysemethoden weitere chromosomal-assoziierte Virulenzunterschiede der beiden O157-Pathovaren zu ermitteln. Für den genomischen Vergleich wird ein bei dem ersten in Deutschland registrierten HUS-Ausbruch gewonnenes SF STEC O157:H⁻-Isolat (Stamm 493/89) mit dem STEC O157:H7-Referenzstamm EDL933 verwendet. Neben der Sequenzierung einer Cosmidbank des O157:H⁻-Stammes finden subtraktive Hybridisierungsexperimente, ein *E. coli* K-12-Makroarray und ein Pathoarray Anwendung. Vor dem phylogenetischen Hintergrund werden die Befunde auch in EPEC O55:H7-Stämmen untersucht.

C Experimententeil

1. Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien

1.1. Geräte

Brutschränke:	Heraeus, Hanau: verschiedene Modelle
DNA-Sequenzierer:	Perkin Elmer, Weiterstadt: AbiPrism 377A
Elektrophoresekammern:	BioRad, München: mini-Protean-II-Dual Slab Cell; Keutz, Reiskirchen: Horizontale Agarosegel- Elektrophoresekammern, verschiedene Modelle
Elektrophorese-Netzteile:	BioRad, München: Modelle 3000Xi, 300 Biometra, Göttingen: Modelle P23, P24
Entwicklungskassette:	Dr. Goos Suprema GmbH, Heidelberg
Entwicklungsmaschine:	Agfa, Köln: Modell Curix 60
Foto-Dokumentationsanlage:	Intas, Göttingen: Micro-Cam 3000
Hybridisierungsöfen:	Biometra Hybaid, Teddington, GB
Mikrowelle:	AEG, Frankfurt am Main: Micromat
pH-Meter:	WTW, Weilheim i. OB: Modell pH 530
Schüttel-Inkubator:	B.Braun, Melsungen: Certomat R/H
Schüttelwasserbad:	Haake, Karlsruhe: Modell SWB25
Sicherheitswerkbank:	Heraeus, Hanau: Herasafe HS12
Sequenzanalyse-Software:	BLAST algorithm (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) DNASIS 2.0 (Hitachi Software) Oligo 4.0 (National Biosciences, Plymouth, USA)
Speed-Vac:	Jouan, St. Nazaire, Frankreich: Modell RC 10.10
Thermocycler:	Perkin-Elmer, Weiterstadt: GeneAmp 9600 Biometra, Göttingen: Personal Cycler
Tischinkubator:	Eppendorf, Hamburg: Thermostat 5320
Tischzentrifugen:	Heraeus, Hanau: Modelle Sepatech Biofuge 15 und Biofuge fresco
Typhoon™ 8600 Variable Mode Imager:	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
UV-DNA-Linker:	Stratagene, Amsterdam, NL: Stratalinker 1800
UV/VIS-Photometer:	Hitachi, Tokyo, Japan: Modell U-2000
UV-Lampentisch:	Intas, Göttingen: Modell TFX-35M

Vortexer:	Merck, Darmstadt: Modell Test Tube Shaker MELB1719
Waagen:	Sartorius, Göttingen: verschiedene Modelle
Wasserbäder:	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen:	Beckman, München: Ultrazentrifuge TL-100, Rotor TLA45; DuPont, Bad Homburg: Modell RC-5B, Rotor SS34; Sigma, Deisenhofen: Modell 3K20, Rotoren 12153 und 12156

1.2. Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht abweichend vermerkt, in p.A.-Qualität von den Firmen Biomol GmbH (Hamburg), Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-ARK GmbH (Darmstadt) bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

1.3. Sonstige Materialien

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Chemilumineszenzfilm	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg: Hyperfilm ECL
CLONTECH PCR-Select Genome Subtraction Kit®	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Kit)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Faltenfilter	neoLab, Heidelberg
Filterpapier 3 MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Gigapack® III XL-11 Packaging Extrakt	Stratagene, Amsterdam, NL
Hybridisierungsbeutel	Gibco BRL, Eggenstein
Hybridisierungsröhrchen	Hybaid, Heidelberg
MicroAmp Reaktionsgefäße	Perkin Elmer, Weiterstadt
Microspin™ G-50 Columns	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikropipetten 20, 100 und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg: Modell Research
96er Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Nucleobond DNA Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren

Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Hybond N
Panorama™ <i>E. coli</i> Gene Arrays	Sigma-Genosys, Cambridge, GB
Phosphoimagerscreen	Packard-Perkin Elmer, Boston (USA): Packard Cyclone Storage Phosphor Screen (Typ: super resolution)
Prep-A-Gene Kit	Biorad, München
Rotrand Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN PCR purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SS34-Zentrifugenröhrchen	Nalgene, Rochester (USA)
SS34-Teflon-Zentrifugenröhrchen	Nalgene, Rochester (USA)
TA-Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

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

2. Bakterienstämme, Nukleinsäuren und Bioreagenzien

2.1. Bakterienstämme

Für die genomische Charakterisierung des Serotyps SF STEC O157:H⁻ wurde Stamm 493/89 verwendet, der bei dem ersten identifizierten STEC-Ausbruch in Deutschland (Bayern) isoliert wurde. Als „Referenzstamm“ wurde STEC O157:H7 Stamm EDL933, welcher bei einem Ausbruch von hämorrhagischer Kolitis in den USA 1982 [O'Brien *et al.*, 1983; Riley *et al.*, 1983] isoliert wurde, eingesetzt. Für die Untersuchung der Verteilung der während dieser Arbeit ermittelten Gene in anderen O157-Stämmen wurden insgesamt 20 STEC-O157:H7- und 18 SF STEC O157:H⁻-Isolate aus der Stammsammlung von Prof. Karch, Münster, überprüft. Die STEC-Isolate waren 1996 bis 2000 im Rahmen der Routinediagnostik von Patienten mit Verdacht auf STEC-Infektionen isoliert und charakterisiert worden. Zudem wurden zwei EPEC-O55:H7 Stämme untersucht, die freundlicherweise von Prof. P. I. Tarr, Seattle (USA) zur Verfügung gestellt wurden. Im Anhang, Tabelle G-IV, sind alle *E. coli* O157-Stämme, die im Rahmen der PCR überprüft

wurden, im einzelnen aufgeführt. Die jeweiligen Stämme wurden aus einer Stichagarkonserve frisch ausplattiert.

E. coli K-12 Laborstamm DH5 α (GibcoBrl, Eggenstein) und *E. coli* INV \square F', der Bestandteil des TA-Cloning Kits[®] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) ist, wurden als Wirt für rekombinante Plasmide verwendet. Für die Erstellung der Cosmid-Genbank fungierte der Laborstamm *E. coli* K-12 XL1-blue MR (Stratagene, Amsterdam, NL), der im Gigapack[®] III XL-11 Packaging Extrakt[®] enthalten ist, als Wirtsstamm für die Phagentransduktion.

Neben *E. coli*-Stämmen wurden auch zwei *Shigella flexneri*-Isolate eingesetzt. Ein uncharakterisiertes *Shigella flexneri*-Isolat wurde vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, erhalten. *Shigella flexneri*-Stamm MT90 wurde vom Institut für Infektionsbiologie, Würzburg, zur Verfügung gestellt.

2.2. Plasmide

Das Cosmid SuperCosI von Stratagene wurde für die Erstellung der Cosmid-Genbank eingesetzt. Für Subklonierung der Cosmide und der Fragmente der subtraktiven Hybridisierung und anschließende Sequenzierung kam pBluescript II KS (Stratagene) zur Anwendung. Daneben wurde der pCR2.1-Vektor des TA-Cloning-Kits[®] verwendet. Bei allen Vektoren ist eine Ampicillinresistenz, bei pCR2.1 ist zusätzlich Kanamycin- und bei SuperCosI Neomycinresistenz kodiert.

2.3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit für DNA-Sequenzierungen und PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) und Qiagen Operon (Köln) synthetisiert. Zunächst wurde in den Insertbereich der SuperCosI-, BlueScript- und pCR 2.1-Vektoren hineinsequenziert. Für Lücken und Überlappungsbereiche wurden aus erhaltenen Sequenzen interne Primer mit dem Program Oligo 4.0 konstruiert. In den Methodenteilen C-8. und C-14. sind die verwendeten Primer für die Sequenzierung der Vektoren und die PCR-Primer entsprechend aufgeführt.

2.4. Bioreagenzien

AmpliTaq DNA-Polymerase

Perkin Elmer, Weiterstadt

ELONGase

Life Technologies GmbH, Karlsruhe

DNA-Ladder Gene Ruler

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Heringsperma-DNA	Sigma-ARK, Darmstadt
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow Fragment der DNA-Polymerase I	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Lysozym	Serva GmbH, Heidelberg
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	Merck, Darmstadt
Random Hexamer Primer	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Restriktionsendonukleasen	Gibco Brl, Eggenstein New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Ribonuklease A (RNaseA) aus Rinder- pankreas	Serva GmbH, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva GmbH, Heidelberg
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	GibcoBrl, Eggenstein
T4-DNA-Ligase	GibcoBrl, Eggenstein
Trypsin	Serva GmbH, Heidelberg

3. Medien, Puffer und allgemeine Lösungen

3.1. Medien

LB-Medium:	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl	in Aqua dest.; pH 7,5
SOC-Medium:	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10,0 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 20 mM Glukose	in Aqua dest.

Zur Herstellung fester Nährböden aus LB-Medium wurde diesem vor Autoklavierung 1,5 % Bacto-Agar zugesetzt. Bei Bedarf wurde den autoklavierten Medien 100 µg/ml Ampicillin, 30µg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlorindol-3-yl-β-D-galactopyranosid) bzw. IPTG (Isopropyl- D-thiogalactosid, Endkonzentration 0,05 mM) zugesetzt.

3.2. Puffer und allgemeine Lösungen

Tris/HCl:	X M Tris (je nach Bedarf) in Aqua dest.; pH mit HCl einstellen, auffüllen
-----------	--

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0	
	1 mM EDTA	in Aqua dest.
10 x PBS:	1,4 M NaCl	
	27 mM KCl	
	1,0 M Na ₂ HPO ₄	
	15 mM KH ₂ PO ₄	
	0,1 % NaN ₃	in Aqua dest.; pH 7,2
SM-Puffer:	5,8 g NaCl	
	2,0 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O	
	50 mM Tris/HCl, pH 7,5	
	0,01 % Gelatine	in Aqua dest.
Salinelösung:	0,9 % NaCl	in Aqua dest.

4. Bakterienstammhaltung

Zur längerfristigen Lagerung der hergestellten Klone oder der Bakterienwildstämme werden 20 ml einer LB-ÜN-Kultur abzentrifugiert (15 min, 3.500 rpm, 4°C) und die Zellen in PBS-M (75 mM NaCl, 57 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird daraufhin mit 2 VT 87 % Glycerin gemischt und in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

Mittelfristig zu lagernde Bakterienstämme werden in Stichagar gehalten (1 l Aqua dest., 10 g Pepton, 3 g NaCl, 2g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 15 g Bacto-Agar, 5 g Fleischextrakt, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt).

5. Erstellung einer Cosmid-Genbank mit SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89

Für die Herstellung einer Cosmid Genbank wird der SuperCos 1 Cosmid Vector Kit eingesetzt. Die Durchführung entspricht weitestgehend den Vorschriften des Instruktions-Manuals des Herstellers.

5.1. Präparation der DNA des Stammes 493/89

Genomische DNA des SF STEC O157:H⁻ Stammes 493/89 wird wie in C-18. beschrieben mit Nucleobond AXG100 Säulen isoliert. Etwa 50 µg der isolierten DNA werden in einem 100 µl Ansatz mit 2 Units *Sau3AI* für 20 min bei 37°C restringiert. Als Puffer wird der „one for all“-Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Das Enzym *Sau3AI* bietet sich

als ein für *E. coli* geeignetes Restriktionsenzym an, da es dort in gleichmäßiger Verteilung über das Chromosom und zudem relativ häufig schneidet. Nach 20 min sind noch ausreichend große DNA-Fragmente vorhanden, die Restriktion ist nach dieser relativ kurzen Reaktionszeit noch nicht vollständig. Um eine Religierung der erhaltenen DNA-Fragmente auszuschließen, werden diese unter Zugabe von 2 Units Shrimp Alkaline Phosphatase in den Restriktions-Ansatz dephosphoryliert.

5.2. Präparation der Cosmidvektor-DNA

Der SuperCos I Vektor wird nach den Angaben des Herstellers entsprechend mit *XbaI* restringiert und ebenfalls mit Shrimp Alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Durch diese Restriktion wird der circular geschlossene Vektor linearisiert und die *cos*-Stellen, die für die Verpackung in die Bakteriophagenköpfe notwendig sind, freigelegt. Anschließend wird der Vektor mit *BamHI* erneut geschnitten. Die *BamHI*-Schnittstelle der Multiple-Cloning-Site des SuperCos1-Vektors ist mit den *Sau3AI*-Schnittstellen der chromosomalen Fragmente kompatibel.

5.3. Ligation und Verpackung in Phagenköpfe

Die aufgereinigten dephosphorylierten DNA-Fragmente werden in die Cosmidarme ligiert. Dies erfolgt in 10 µl mit T4-Ligasepuffer gepufferten Ansätzen, wobei 5µg der *Sau3AI*-Fragmente mit 2 µg des präparierten SuperCos1-Vektors mit 0,4 Units T4-Ligase für 16 h bei 8°C ligiert werden. Eine erfolgreiche Ligation wird mit 5 µl eines jeden Ligationsansatzes durch eine Gelelektrophorese überprüft. Mit Hilfe des Gigapack III XL-4 Systems werden verschiedene Ligationsansätze den dortigen Arbeitsanweisungen folgend in Phagenköpfe verpackt. Nur etwa 47-51 Kb große DNA-Fragmente können in Phagenköpfe verpackt werden. Bei einer Vektorlänge von etwa 7 Kb berechnet sich damit eine Insertlänge von etwa 40-44 Kb. Für die Reaktion werden jeweils 5 µl eines Ligationsansatzes in ein Reaktionsgefäß mit frisch aufgetautem Packagingextrakt pipettiert und vorsichtig gemischt. Ein kurzes Anzentrifugieren des Reaktionsgefäßes bewirkt eine Beseitigung eventuell vorhandener Luftblasen und eine Ankonzentrierung des Inhalts am Gefäßboden. Bei RT wird für 2 h inkubiert und die Reaktion nach Zusatz von 500 µl SM-Puffer gestoppt. Durch Zugabe von 20 µl Chloroform wird nicht verpackte DNA unter Zentrifugation ausgefällt. Der Überstand wird in 25 µl-Portionen für die Transduktion in die Wirts-*E. coli*-Zellen bereitgestellt.

5.4. Präparation der Wirtszellen

Der *E. coli* Stamm XL-blue des Gigapack-III-XL-4-Systems dient bei der Transduktion als Wirtszelle. Er wird direkt aus der Glycerin-Stammlösung auf LB-Agar ausplattiert und eine einzelne ÜN-Kultur wird in 50 ml LB-Medium, dem 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose zugesetzt sind, überimpft. Nach exponentiellem Wachstum werden die Zellen abzentrifugiert und in autoklavierter 10 mM MgSO₄ aufgenommen, so dass eine OD₆₀₀ von 0,5 resultiert.

5.5. Transduktion

Für die Transduktion wird in mehreren Ansätzen 25 µl der präparierten Phagenlösung mit jeweils 25 µl der Wirtszellenlösung zusammen pipettiert und bei RT für 30 min reagieren gelassen. Anschließend werden 200 µl LB-Medium in den jeweiligen Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C belassen, wobei einige Male der Ansatz kurz invertiert wird. Während dieser Zeit kann sich die Antibiotikaresistenz des durch die Phagen eingeführten Cosmides voll entfalten. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 rpm) wird der Bodensatz zusammen mit etwa 50 µl Überstand auf Ampicillin-LB-Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Über Nacht wachsen nur diejenigen Wirtszellen an, die ein Cosmid während der Transduktion erhalten haben.

5.6. Präparation der Genbank

Einzelne nach der Transduktion erhaltene Kolonien werden dem Muster eines 48er Koloniestempels entsprechend (sechs Reihen mit jeweils acht Kolonien) auf 15 weitere Ampicillin-LB-Agarplatten überführt und ÜN inkubiert. Die gewachsenen Kolonien werden mit Hilfe des Stempels in 48 Vertiefungen einer sterilen 96er Mikrotiterplatte überführt. Die Vertiefungen sind mit ca. 100 µl LB-Medium, dem 20 % steriles Glycerin und 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt sind, befüllt. Die Platten werden für 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei -80°C konserviert. Für die spätere Cosmidisolierung werden die Mikrotiterplatten angetaut und mit Hilfe eines Multipipettors ca. 10 µl aller 48 Konserven entnommen und vorsichtig auf eine oder mehrere Ampicillin-Agarplatten pipettiert, ohne dass sich die Konservenlösungen vermischen. Die Kulturen werden ÜN bei 37°C inkubiert und stehen der Cosmidisolierung zur Verfügung. Die Bezifferung der einzelnen Klone erfolgt nach der Plattennummer (1 bis 15) und der Koloniennummer (1 bis 48). Der Klonnummer 4-34 ist also zu entnehmen, dass sie die 34. Kolonie der Platte 4 darstellt.

6. Isolierung der Cosmid-DNA mit Qiagen Plasmid Midi Kit

Folgende Puffer und Lösungen des Qiagen Plasmid Midi Kits wurden verwendet:

Resuspendierungspuffer P1

Lysepuffer P2

Neutralisationspuffer P3

Äquilibrierungspuffer QBT

Waschpuffer QC

Elutionspuffer QF

Für die Isolierung der Cosmide einzelner Klone der Cosmid-Genbank wird der Qiagen Plasmid Midi Kit eingesetzt. Dazu wird eine Kolonie des entsprechenden Klons in 100 ml Ampicillin-LB ÜN inkubiert. Zwei mal 40 ml der Kulturlösung werden in SS34-Röhrchen zentrifugiert (15 min, 5.000 rpm, 4°C). Der Überstand beider 40 ml Ansätze wird verworfen und die Rückstände in 8 ml Puffer P1 aufgenommen. Eine Resuspension erfolgt durch Auf- und Abziehen in einer 10 ml Meßpipette. Nach Hinzufügung von 8 ml Puffer P2 und fünfmaligem Umschütteln wird für 5 min bei RT inkubieren gelassen. Anschließend werden 8 ml des im Kühlschrank vorgekühlten Puffers P3 hinzugegeben, erneut 5 mal umgeschüttelt und der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wird das Gemisch zentrifugiert (40 min, 14.500 rpm, 4°C). Während dieser Zeit wird eine Qiagen tip 100 Säule mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation durch einen Faltenfilter filtriert und auf die präparierte Qiagen tip Säule gegeben. Der Durchfluß durch die Matrix der Säule erfolgt jeweils durch Gravitationskraft ohne zusätzliche Druckaufgabe. Eine Aufgabe der nachfolgenden Wasch- und Elutionslösung erfolgt erst nach vollständigem Durchfluß der vorher aufgebrauchten Lösung. Das Auswaschen der im Überstand vorhandenen Zucker- und Proteinrückstände erfolgt durch zweimalige Zugabe von je 10 ml Puffer QC auf die Säule. Anschließend wird die DNA mit 5 ml Puffer QF in ein 10 ml Greinerröhrchen eluiert. Das Eluat wird mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und mehrere Male invertiert. Die erhaltene Mischung wird in sechs 1,5ml-Reaktionsgefäße gleichmäßig abgefüllt und zentrifugiert (40 min, 14.500 rpm, RT). Hierbei fällt die DNA in der jeweiligen Bodenspitze der Reaktionsgefäße sichtbar aus. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das verbleibende DNA-Pellet mit 200 µl Ethanol (70%) versetzt, invertiert und erneut zentrifugiert (15 min, 14.500 rpm, RT). Das Ethanol wird anschließend vorsichtig verworfen und die Pellets für 15 min bei geöffnetem Cap trocknen gelassen. Die sechs erhaltenden DNA-Pellets werden in 50 µl dest. Wasser aufgenommen und ÜN bei 4°C quellen gelassen. Danach ist das DNA-Isolat welches vornehmlich Cosmid- neben Spuren an chromosomaler

DNA enthält, bereit für Sequenzier, PCR oder Restriktions-Reaktionen. Für die Ermittlung der DNA-Konzentration, um ein geeignetes Einsatzvolumen für eine Sequenzierung zu bestimmen, wird entweder eine Verdünnung direkt photometrisch vermessen oder 1 µl des Isolates mit einer Lösung bekannter DNA-Konzentration über horizontaler Gelelektrophorese verglichen.

7. Horizontale Agarosegel-Elektrophorese

Verwendete Lösungen und Puffer:

10x TBE-Puffer:	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 25 mM EDTA
50x TAE-Puffer:	2,0 M Tris 1,0 M Essigsäure 50 mM EDTA
Blaumarker:	50 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol FF 25 mM EDTA
Ethidiumbromid- Färbebad:	200 µg Ethidiumbromid in 1 l Aqua. dest.

Für die Analyse von DNA-Fragmenten werden etwa 7 mm dicke, flach ausgegossene Agarosegele eingesetzt. Die Agarose wird hierfür in der gewünschten Konzentration (Standard 1 %, bei Fragmenten kleinerer Größe 1,5 %) in TBE (1 x) oder 0,5%ig für präparative Zwecke in 0,5 x TAE in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgekocht. Diese Lösung wird nach Abkühlung auf etwa 60°C in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach Erstarrung des Gels wird es in eine Elektrophoresekammer in dem Puffer, mit dem es hergestellt wurde, als Elektrodenpuffer überschichtet. Die zu analysierende DNA-Lösung wird mit Aqua dest. in einer 96er-Mikrotiterplatte zu 19 µl verdünnt und mit 1,5 µl Blaumarker versetzt. Diese Lösung wird in die Geltaschen, die sich knapp unter der Elektrodenpufferoberfläche befinden, hineinpipettiert. Zur Kontrolle der Fragmentgröße wird in eine Geltasche der DNA-Molekulargewichtsmarker (Gene Ruler) pipettiert. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 1,5 V/cm² Gel durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande etwa ¾ des Gels durchlaufen hat. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wird das Gel aus der Kammer entnommen und für 20 min in ein

Ethidiumbromidbad gelegt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wird das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und bei 312 nm begutachtet und gegebenenfalls fotografiert.

8. DNA-Sequenzierung

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

Terminator-Prämix: Dye-Terminatoren (A, C, G, T)
 dATP, dCTP, dTTP, dITP
 Tris/HCl pH 9,0
 MgCl₂
 thermostabile Pyrophosphatase
 Ampli*Taq*-DNA-Polymerase

Gelfiltrationssäulen (Centri-Step-Säulen)

Außerdem werden benötigt:

Probenlösung: 1 VT 50 mM EDTA pH 8,5
 5 VT Formamid

Acrylamid-Lösung: 38 % Acrylamid
 2 % N,N'-Methylenbisacrylamid
 über Amberlite-Kationenaustauscher deionisiert

APS: 10 % Ammoniumpersulfat

Polyacrylamidgel 7 %: 30 g Harnstoff
 10,5 ml Acrylamidlösung
 6 ml 10 x TBE-Puffer
 22 ml Lichrosolv[®]
 180 µl APS
 24 µl TEMED

Die Sequenzierungsreaktion wird auf Basis der Didesoxy-Kettenterminations-Methode nach Sanger [1981] durchgeführt. Die Nukleotidsequenzen werden hier jedoch unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Terminatoren bestimmt.

Reaktionsansatz: 0,5 bis 0,6 µg doppelsträngige DNA
 4 µl Terminator-Prämix
 1 µl Primer (0,15 pMol)
 Wasser (autoklaviert, HPLC-grade, Merck) ad 10 µl

Im Anschluss wird eine PCR durchgeführt, welche aus folgenden Schritten besteht: 5 min 94°C, 35 x (30s 94°C, 60s 45-60°C, 120s 72°C) und 5 min 72°C. Der 60 Sekunden-Hybridisierungs-Schritt richtet sich nach der Schmelztemperatur des eingesetzten Primers. In Tabelle C-1. sind die Primer der durchgeführten Cosmid- und Plasmid-Sequenzierungsreaktionen mit den entsprechend verwendeten Temperaturen bei jenem 60 Sekunden-Schritt aufgeführt. Die erhaltenen PCR Produkte werden durch Gelfiltration über Centri-Sep Säulen des Sequenzier Kits von nicht eingebauten Nukleotiden befreit. Anschließend wird in der Speed-Vac zur Trockne eingedampft und in 4 µl der Probenlösung aufgenommen. Diese Proben werden in einem 7 % Polyacrylamidgel mit einfachem TBE-Elektrodenpuffer im Applied-Biosystems Sequenzer aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt automatisch im Sequenziergerät.

Tab. C-1.: Verwendete Primer für die Sequenzierung von Vektor-Insertfragmenten.

*: pCR2.1-Vektorsequenz nicht in Datenbank publiziert, Sequenz erhältlich unter http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1_seq.txt

Primer	Sequenz	Vektor und Position (Accession-Nr.)	Hybridisierungstemperatur
scos1fwd	5'-CGG CCG CAA TTA ACC CTC AC-3'	supercos1 8-27 (M99566)	60°C
scos1rev	5'-GCG GCC GCA TAA TAC GAC TCA CT-3'	supercos1 64-42 (M99566)	60°C
M13 fwd	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Bluescript II KS 600-616 (X52327)	54°C
M13 rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC AT-3'	pCR 2.1 404-388* Bluescript II KS 809-828 (X52327)	54°C
		pCR 2.1 205-224*	

Bei Sequenzierungen eines längeren DNA-Abschnittes werden Primer mit Hilfe der Oligo 4.0-Software (National Biosciences, Plymouth, USA) aus dem bereits sequenzierten DNA-Bereich konstruiert und diese für eine weitere Sequenzierung eingesetzt. Zur Analyse der überlappenden Sequenzbereiche wird die DNAsis-Software (Version 2.0, Hitachi-Software) angewendet. Auf diese Weise werden beide Nukleotidstränge doppelt sequenziert, so dass jede Base mindestens viermal sequenziert wird.

9. Subklonierung von Cosmid-Insertfragmenten

Um die Sequenz eines Cosmid-Insertfragments näher zu charakterisieren, wird dieses mit *EcoRI* restringiert und die entstandenen Fragmente in den BlueScript-Vektor ligiert.

Für die Vorbereitung der Vektor-DNA wird diese zunächst mit *EcoRI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert.

9.1. Restriktion genomischer und vektorieller DNA

Für einen Restriktionsansatz von 20 µl werden pro Unit Enzym etwa 1 µg DNA umgesetzt. Dazu werden 1 µg DNA in ster. Wasser zu 17 µl verdünnt, mit 2 µl Reaktionspuffer (2x) (GibcoBrl, Eggenstein) und 1 µl Restriktionsenzym versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Auswahl des Reaktionspuffers richtet sich dabei nach den Empfehlungen des Herstellers des Restriktionsenzym.

9.2. Dephosphorylierung

Um eine Religierung des mit Restriktionsenzym behandelten Vektor zu verringern, werden die neu entstandenen frei liegenden DNA-Enden dephosphoryliert. Dazu werden 14 µl des Restriktionsansatzes (entsprechend 0,6 µg Vektor-DNA) mit 14 µl ster. Wasser, 3,6 µl Dephosphorylierungspuffer (2x) (GibcoBrl, Eggenstein) und 4 µl alkal. Shrimp-Phosphatase versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Der geringe Zusatz des Dephosphorylierungspuffers berechnet sich durch den bereits im Restriktionsansatz vorhandenen Anteil an Restriktionspuffer. Das Enzym wird durch 15 minütige Erhitzung des Ansatzes auf 65°C im Wasserbad inaktiviert.

9.3. Aufreinigung von DNA aus Elektrophoresegel mit prep-a-gene®

Binde-, Wasch- und Elutionspuffer sowie die Bindematrix entstammen dem Prep-A-Gene DNA Purification Kit.

Der linearisierte Vektor und die Restriktionsfragmente werden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel von anderen unerwünschten DNA-Fragmenten aufgereinigt. Dazu wird das Gel, welches das oder die entsprechenden DNA-Fragmente enthält wie bei C-7. beschrieben mit Ethidiumbromid gefärbt. Auf einem UV-Lampentisch wird das DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dies wird möglichst schnell ausgeführt, um die DNA-Schädigung durch das UV-Licht gering zu halten. Außerdem wird das Agarosestück so

klein wie möglich präpariert, um eine erhöhte DNA-Ausbeute sicherzustellen. Das Agarosestück wird in einem 2 ml Reaktionsgefäß auf der Analysenwaage gewogen und pro 100 mg ausgewogenem Agarosefragment werden 300 µl Bindepuffer zugesetzt. Der Ansatz wird 15 min unter gelegentlichem Umschwenken bei 55°C auf dem Wasserbad gehalten, bis das Agarosefragment vollständig gelöst ist. Das Bindematrix enthaltende Vorratsgefäß wird sorgfältig gevortext. Danach wird dem Ansatz pro 100 mg zuvor ausgewogenem Agarosefragment 1 µl Bindematrix zugesetzt. Bei RT wird 10 min inkubiert, wobei zwei bis drei mal invertiert wird. Die Suspension wird zentrifugiert (1 min, 14.500 rpm) und daraufhin der Überstand abpipettiert. Das Sediment wird in 500 µl Waschpuffer suspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wird zwei weitere Male wiederholt. Das verbliebene Sediment wird mit einem 2 µl größeren Volumen Elutionspuffer als der zuvor verwendeten Bindematrixmenge suspendiert. Bei 50°C im Wasserbad wird für 15 min die DNA aus der Matrix herausgelöst. Nach Zentrifugation für 2 min wird der Überstand abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis zwischengelagert. Der Rückstand wird auf gleiche Weise zwei weitere Male behandelt und der jeweilige Überstand mit dem vorherigen vereinigt. Der gepoolte Überstand wird 2 min zentrifugiert und anschließend von den sedimentierten Matrixresten abgenommen. Er enthält die aufgereinigte DNA des ausgeschnittenen Agarosegel-Fragmentes.

9.4. Ligation

Die Ligation des dephosphorylierten Vektors mit dem zu klonierenden DNA-Fragment wird im Verhältnis 1:5 durchgeführt, um so eine hohe Einbaurate des Fragmentes in den Vektor zu gewährleisten. Für 2,5 µg Fragment-DNA und 0,5 µg Vektor-DNA wird eine Unit T4-Ligase eingesetzt. Die entsprechenden DNA-Mengen werden in ster. Wasser zu 16,7 µl gelöst, mit 2 µl Ligase-Puffer (10 x) (GibcoBrl, Eggenstein), 1 µl ATP (10 mM) (GibcoBrl, Eggenstein) und 0,3 µl T4-Ligase gemischt und für 16 h bei 16°C inkubiert. Dieser Ansatz wird direkt für die nachfolgend beschriebene Transformation eingesetzt.

10. Herstellung kompetenter DH5α-Zellen und Transformation

10.1. Erstellung kompetenter DH5α-Zellen

Ein ml einer frischen ÜN-Kultur des *E. coli* K-12 Laborstammes DH5α werden mit 49 ml LB gemischt und in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben bei 37°C für etwa 2,5 h im Brutschrank geschüttelt. Vor dem weiteren Vorgehen sollte die OD_{600nm} der Kultur 0,4 – 0,5 betragen. Der

Ansatz wird in zwei SS34-Röhrchen aufgeteilt und zentrifugiert (5 min, 3.000 rpm, 4°C). Der Überstand wird abgenommen und die beiden SS34 Röhrchen sofort auf Eis gestellt. Beide Pellets werden in jeweils 12,5 ml 0,1 M CaCl₂ suspendiert und erneut zentrifugiert. Jedes Pellet wird danach in 1,25 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und für 60 min auf Eis gestellt. Die Suspensionen werden vorsichtig vereinigt und mit 1,14 ml Glycerol (80%) versetzt. Die Glycerolendkonzentration beträgt hierbei 25 %. Die erhaltene Suspension wird zu jeweils 150 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Alle vorgenannten Schritte werden ohne Unterbrechung auf Eis in einer größeren Styroporbox durchgeführt. Die Glycerolkonserven werden bei -70°C gelagert und können für 2 bis 3 Monate verwendet werden. Zur Kontrolle auf Kompetenz wird der nachfolgenden Anweisung entsprechend eine Transformation mit einem Plasmidvektor bekannter Konzentration durchgeführt.

10.2. Transformation

Für die Transformation werden je nach Vektorgröße 1-2 µg ligierte Vektor-DNA eingesetzt. Für BlueScript oder pCR2.1 reichen 1 µg aus, für SuperCos1 sind 2 µg optimal. Vor der Zugabe in die Wirts-Zellen-Glycerolkonserven wird das frisch aus der -70°C Gefriertruhe erhaltende Konservengefäß für 30 min auf Eis aufgetaut. Nach DNA-Zugabe wird der Ansatz kurz geschnippt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Erneut wird auf Eis für 30 min stehen gelassen. Anschließend wird der Ansatz für exakt 3 min auf 43°C im Wasserbad erwärmt, danach für 5 min auf Eis heruntergekühlt und in 1 ml LB-Medium in einem autoklavierten Reagenzglas gegeben. Für 2 h wird bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 200 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluß wird die Kultur mit Hilfe eines Drigalskispatels in unterschiedlich hohen Volumina auf Amp-X-Gal-IPTG-Selektionsplatten verstrichen. Bei einem Volumen größer als 400 µl wird zuvor anzentrifugiert (1 min, 5.000 rpm) und das Sediment auf die Agarplatte verstrichen. Um eine Satellitenbildung zu vermeiden, wird nicht länger als 16 h im 37°C-Brutschrank inkubiert. Es wachsen nur diejenigen Zellen in Kolonien heran, die das Plasmid aufgenommen haben. Während blaue Kolonien auf ein Insertfreies Plasmid hinweisen, zeigen weiße Kolonien an, dass im Plasmidvektor ein Insert vorhanden ist, welches das LacZ-Vektor-Gen unterbrochen hat. Somit kann kein LacZ exprimiert werden, welches X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzt. IPTG wirkt als Verstärker der LacZ-Expimierung.

11. Schnellmethode Plasmid-DNA-Isolierung

Um aufgereinigte DNA für Restriktions- oder PCR-Versuche zu erhalten, wird die Plasmidminipräp-Methode mit Qiagenpuffern (siehe C-6.) angewendet. Ausreichende Mengen an Bakterienkultur werden erhalten, indem der entsprechende Klon entweder auf der Hälfte einer Agarplatte ausgestrichen oder in 1 ml Ampicillin-LB-Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß ÜN angezüchtet wird. Die Kulturen der Agarplatte werden am nächsten Tag mit einem in Saline getauchten Wattestäbchen aufgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl P1-Puffer des Qiagen-Plasmid-Purification-Kits suspendiert. Im Falle der Anzucht im Reaktionsgefäß wird der Ansatz zentrifugiert (5 min, 5.000 rpm), das LB-Medium verworfen und der Rückstand in 100 µl P1-Puffer suspendiert. Nach 5 min Stehenlassen bei RT werden 200 µl P2-Puffer zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß werden 150 µl eisgekühlter Puffer P3 zugesetzt und der Ansatz erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 14.500 rpm) wird durch Zugabe von 150 µl Phenol/Chloroform (1:1) und kräftigem Umschütteln die DNA von restlichem Protein und Kohlenhydratanteilen befreit. Die wäßrige Phase wird nach erneuter Zentrifugation vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und mit 550 µl 100%igem Ethanol versetzt. Das durch Zentrifugation (15 min, 14.500 rpm) erhaltene Pellet wird mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und in 10 bis 20 µl ster. Wasser gelöst.

12. Plasmid-DNA-Isolierung mittels Qiagen mini Purification Kit[®]

Die bei der Methode erwähnten Puffer und Tip-Säulen sind in dem Qiagen mini purification kit[®] enthalten. Die Puffer sind identisch mit den bei der Qiagen midi-Aufreinigung aufgeführten Puffern (siehe C-6.).

Für Sequenzierungsreaktionen von Plasmiden wird qualitativ hochwertig aufgereinigte DNA benötigt. Die Plasmidisolierung mittels des Qiagen mini Purification Kits genügt den Anforderungen einer Sequenzierung. Dazu werden 3 ml einer ÜN-Kultur in LB- oder entsprechendem Selektivmedium in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und zentrifugiert (5 min, 6.500 rpm). Die beiden erhaltenen Pellets werden vereinigt und in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert und 5 min stehen gelassen. Nach Zusatz von 0,3 ml Puffer P2 wird einige Male leicht umgeschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 0,3 ml auf Eis vorgekühlter Puffer P3 zugesetzt, umgeschüttelt, der Ansatz 5 min auf Eis gestellt und zentrifugiert (10 min, 14.500 rpm). Währenddessen wird eine Qiagen tip 20 Säule mit 1 ml QBT-Puffer

äquiliibriert. Der Überstand der Zentrifugation wird auf die Säule gegeben und nach Ablauf wird die Säule vier mal jeweils mit 1 ml QC-Puffer gewaschen. Die DNA wird im Anschluß mit 0,8 ml QE-Puffer in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert und durch Zugabe von 0,56 ml Isopropanol gefällt und zentrifugiert (30 min, 14.500 rpm). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das erhaltene DNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 14.500 rpm) wird das Pellet 15 min luftgetrocknet und in 30 µl ster. Wasser gelöst. Die DNA ist nun für die Sequenzierungsreaktion (siehe C-8.) bereit.

13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um das Vorhandensein eines Gens im Genom eines Stammes oder Klonen zu detektieren, werden verschiedene PCRs durchgeführt. Dabei wird von folgendem Standardansatz ausgegangen. Als DNA-Template wird entweder isolierte DNA (Qiagen, Plasmidminipräp oder DNA-Isolierung), welche 1:50 in ster. Wasser verdünnt wird, oder die Suspension einer auf Agaroseplatte frisch angezüchteten Kolonie in 50 µl Saline eingesetzt. Für eine Reaktion werden in ein 0,2 µl-PCR-Reaktionscap folgende Reagentien zusammenpipettiert:

2,5 µl Template-DNA

2,5 µl PCR-Puffer (Perkin Elmer)

2 µl MgCl₂-Lösung (25 µM, Perkin Elmer)

0,5 µl Primer 1

0,5 µl Primer 2

0,5 µl dNTP (Perkin Elmer)

16,2 µl ster. Wasser

0,3 µl Taq-Polymerase (AmpliTaq-Polymerase, Perkin Elmer)

Dieser 25 µl-Gesamtreaktionsansatz liefert ausreichend gute Amplifikate. In der Regel werden mehrere Amplifikationen mit den selben Primern aber unterschiedlichen Templates durchgeführt, daher werden zunächst die unterschiedlichen Template-Lösungen in entsprechend gekennzeichnet PCR-Reaktionscaps pipettiert, ein nach der Reaktionsanzahl berechneter Reaktionsmastermix aus den übrigen Bestandteilen zurecht gemischt und in die PCRcaps aliquotiert. In Tabelle C-2. sind alle durchgeführten Reaktionen mit den eingesetzten Primern und den Reaktionsbedingungen angegeben.

Tab. C-2.: Primersequenzen und PCR-Konditionen der im Ergebnissteil und Experimentaltteil beschriebenen PCR-Ansätze; *: PCR-Produktlänge nicht definierbar.

Primer- Name	Sequenz	Region des amplifizierten PCR- Produkts (Accession-Nr.)	PCR-Bedingungen			Länge des PCR- Produkts
			Denatur- ierung	Annealing	Extension	
AJ3877	5'-ACT GGG CCG GGA ACA ACA TA-3'	7181-7494 (AJ459584)	94°C, 30s	53°C, 60s	72°C, 30s	314 Bp
AJ3878	5'-CTG GTA AAC GAG CTG ACG AG-3'	Prüfung auf <i>efa1/hf4</i> (siehe D-2.3.)				
E643f	5'-TAT CAG GCC AAT CAA AAC AG-3'	113-1068 (AJ459584)	94°C, 30s	50°C, 60s	72°C, 60s	974 Bp
E1598r	5'-AGA CAC TGG TAA ATT TCG C-3'	<i>efa1/hf4</i> -PCR 1 (siehe Abb. D-2.3.)				
E5242f	5'-TAA GCG AGC CCT GAT AAG CA-3'	4812-5324 (AJ459584)	94°C, 30s	55°C, 60s	72°C, 60s	630 Bp
E5854r	5'-CGT GTT GCT TGC CTT TGC-3'	<i>efa1/hf4</i> -PCR 2 (siehe Abb. D-2.3.)				
E7044f	5'-TGT CTA ACT GGA TTG TAT GGC-3'	6514-7180 (AJ459584)	94°C, 30s	56°C, 60s	72°C, 60s	685 Bp
E7710r	5'-ATG TTG TTC CCG GCC CAG T-3'	<i>efa1/hf4</i> -PCR 3 (siehe Abb. D-2.3.) bis 1183 (AJ508930)				
c338f	5'-AGC ATT AAA TAA AAG CAC GA-3'	<i>cdt4</i> (siehe Abb. D-4.3.)	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 60s	1329 Bp
c2135r	5'-TAC TTG CTG TGG TCT GCT AT-3'	338-1701 (AJ508930)	94°C, 30s	54°C, 60s	72°C, 60s	1363 Bp
c1309f	5'-AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA-3'	<i>cdtB</i> (siehe Abb. D-4.3.)				
c2166r	5'-AGC CTC TTT TAT CGT CTG GA-3'	1554-2302 (AJ508930)	94°C, 30s	49°C, 60s	72°C, 60s	748 Bp
P105	5'-GTC AAC GAA CAT TAG ATT AT-3'	<i>cdtC</i> (siehe Abb. D-4.3.)				
c2767r	5'-ATG GTC ATG CTT TGT TAT AT-3'	338-1424 (AJ508930)	94°C, 30s	58°C, 60s	72°C, 60s	1086 Bp
c1309f	5'-AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA-3'	<i>cdt</i> -Überprüfung (siehe D-4.4.)				
c1890r	5'-CTG GGT CTC GGC TGT CAC G-3'	1078-2271 (AJ534392)	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 60s	1388 Bp
4366	5'-TGT TGT TTG TGC CGT TTT AC-3'	SRL-PCR1 (siehe Abb. D-1.4.)				
4379	5'-CAG CAT CAG TAA CGG AAG TA-3'	4031-4774 (AJ534392)	94°C, 30s	55°C, 60s	72°C, 60s	763 Bp
RL11679f	5'-GTA GAT ATT CGG ATG ACA CA-3'	SRL-PCR2 (siehe Abb. D-1.4.)				
4290	5'-CAG ACA ACC TTA TCC CAT CG-3'	7402-8771 (AJ534392)	94°C, 30s	54°C, 60s	72°C, 60s	1213 Bp
4052	5'-TGA CCC GGC AGA GAA AGA G-3'	SRL-PCR3 (siehe Abb. D-1.4.)				
RL16419r	5'-ATA ACC TCT GTC CAA CGC T-3'	39436-40878 (AF326777)	94°C 30s	57°C, 60s	72°C, 60s	1442 Bp
Fec1	5'-TGC CTT TGT TGT TGT CGT CA-3'	<i>fec</i> -Sonde (siehe D-1.4.)				
Fec3	5'-GAG ACG CAC AAC CTG ATG GT-3'	Kontrolle der Adapterligation	94°C 30s	65°C 30s	68°C 60	-*
2317	5'-GTG CTG TCG CTG TTA TTT CTG-3'	Kontrolle der Adapterligation	94°C 30s	65°C 30s	68°C 60	-*
Primer1	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	Kontrolle der Adapterligation	94°C 30s	65°C 30s	68°C 60	-*
2318	5'-GTC GGT AGC GTG TAA ATC AAG-3'					
Primer1	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	(siehe C-19.4.)				

geschnitten. Im Anschluß wird das Gel für 1 h in einer Lösung von 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH bei RT in einer Plastikwanne auf einem Schüttel-Inkubator behandelt. Die Lösung wird verworfen, durch eine 1 M Tris HCl (pH 8.0), 1,5 M NaCl-Lösung ersetzt und das Gel für 1 h auf dem Schüttel-Inkubator neutralisiert. Zwei Stücke 3 MM Filterpapier werden so zurecht geschnitten, dass sie über eine Glasplatte passen, welche quer über einer Plastikwanne liegt. Das Papier sollte so lang sein, dass es in die Wanne ausreichend hinein ragt. Es wird nun soviel 10 x SSC Puffer auf das Papier gegeben, dass die Papieroberfläche ausreichend benetzt ist und die Wanne zu etwa 2/3 mit Puffer gefüllt ist. Etwaige Luftblasen zwischen der Glasplatte und dem Papier werden mit Hilfe einer Meßpipette ausgestrichen. Sechs Lagen Papier werden in der gleichen Größe wie das zu blottende Gel zurecht geschnitten. Drei Lagen davon werden auf die feuchte Papierfläche gelegt und darüber wird das Gel mit der Oberseite nach unten plaziert. Erneut wird ein Luftblaseneinschluß vermieden. Mit einer sauberen Schere wird eine Nylonmembran etwas größer als das Gel zurecht geschnitten. Die Membran wird mit 2 x SSC in einer weiteren Plastikwanne befeuchtet und anschließend exakt gerade auf das Gel gelegt, so dass alle vier Ecken übereinander liegen. Die drei übriggebliebenen Lagen Papier werden ebenfalls mit 2 x SSC befeuchtet und auf die Membran gelegt, so dass sie in exakt der gleichen Position wie das darunter befindliche Gel liegen. Ein etwa 5 cm dicker Stapel Papiertücher wird genau auf die Größe des Gels geschnitten und auf die Papiere aufgelegt. Auf den Stapel wird eine Glasplatte und ein etwa 500 g schweres Gewicht aufgelegt. Für ca. 3 h wird geblottet. Wenn die Papiertücher vollgesaugt sind, wird ein neuer Stapel trockener Tücher eingesetzt. Nach dem Blotten wird das Papier über der Membran abgenommen und die Taschen des darunterliegenden Gels auf der Membran markiert. Die Membran wird vom Gel getrennt, für 5 min in 5 x SSC getaucht und anschließend für ca. 30 min bei RT auf einem 3 MM Papier getrocknet. Danach erfolgt die Fixierung der DNA durch Belichtung der Membran in einem UV-Crosslinker bei 2.400 Joule. Die Membran ist nun bereit für die Hybridisierung.

15.2. Hybridisierung markierter DNA mit immobilisierter Ziel-DNA

Vor der Hybridisierung wird die Membran kurz in 5 x SSC geschwenkt und mit der DNA-Seite nach innen gerollt in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Dieses enthält 15 ml auf 42°C vorgewärmte Hybridisierungslösung. Die Membran wird etwa 2 h bei 42°C im Hybridisierungsofen bei 9 rpm prähybridisiert. Zur Herstellung der Sonde wird das aufgereinigte PCR-Fragment mit dem ECL-System markiert. Dazu werden 100 ng des DNA-Fragmentes in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit ster. Wasser zu 10 µl gelöst und für 5 min bei

96°C im Wasserbad denaturiert. Im Anschluß wird der Ansatz sofort auf Eis heruntergekühlt, mit 10 µl Labellingreagent versetzt und gevortext. Daraufhin werden 10 µl Glutaraldehydlösung dazugegeben, gevortext und 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Hälfte der Hybridisierungslösung wird aus dem Hybridisierungsröhrchen in ein 12 ml Greinerröhrchen abgegossen und die markierte DNA-Sonde dazupipettiert. Nach kurzem Mischen wird die Lösung zurück in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und ÜN bei 42°C weiterinkubiert. Die Hybridisierungslösung wird abgegossen und die Membran mit ca 50 ml 5 x SSC für 5 min im Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungsofen bei 42°C gewaschen. Erneut wird abgegossen, 50 ml auf 42°C vorgewärmter Waschpuffer I dazugegeben und für 20 min bei 42°C weitergewaschen. Dieser Waschvorgang wird zwei weitere Male wiederholt. Die Membran wird in eine Schale überführt und 2 mal 5 min bei RT mit Waschlösung II gewaschen. Danach wird die Membran mit der DNA-Seite nach oben liegend in eine neue Schale gelegt.

15.3. Detektion der hybridisierten DNA

Je nach Größe der Membran werden gleiche Teile Detektionslösung I+II in einem Greinerröhrchen zusammen gemischt und für 1 min auf die Membran gebracht. Dabei wird pro cm² Membran 0,125 ml Detektionslösung I bzw. II eingesetzt. Die Detektionslösung wird abgegossen und die Membran auf ein großes Stück Haushaltsfolie gelegt, welche auf der nicht DNA-enthaltenden Seite zusammengefaltet wird. Die bedeckte Membran wird mit der DNA-Seite nach oben in eine Entwicklungskassette gebracht und ein Film aufgelegt. Bei geschlossener Kassette wird für etwa 5 min exponiert. Der Film wird in der Entwicklermaschine Curix 60 von Agfa (Köln) entwickelt. Bei zu schwach sichtbaren Signalen wird ein weiterer Film auf die Membran mit längerer Exponierungszeit aufgelegt.

16. Southern Blot mit Digoxigenin nach Böhlinger

Hexanucleotid-Mix*

dNTP labeling kit*

Klenow-Enzym*

Hybridisierungslösung: 5 x SSC
 0,1 % N-laurylsarcosin, Na-salz
 0,02 % SDS
 1 % Blockingreagenz*
 in ster. Wasser gelöst durch 1 h Inkubation bei 50-70°C

Puffer 1:	100 mM Tris-HCl; pH 7,5 150 mM NaCl
Puffer 2:	0,5 % Blocking-Reagenz* in Puffer 1; 1 h gelöst bei 70°C
Puffer 3:	100 mM Tris-HCl; pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Antikörper-Konjugat*	
Färbelösung:	45 µl NBT* 35 µl X-phosphat* 10 ml Puffer 3
TE-Puffer; pH8,0:	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA

*: enthalten im DIG DNA Labeling and detection Kit®

Das Gel wird wie bei C-15. beschrieben geblottet.

16.1. Markierung der Sonden-DNA

Etwa 1 µg der aufgereinigten, in ster. Wasser gelösten und zu markierenden DNA werden für 10 min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. In einem weiteren Reaktionsgefäß werden 2 µl Hexanucleotid-Mix, 2 µl dNTP labeling kit, die mit ster. Wasser auf 19 µl aufgefüllte entsprechende Menge DNA und 1 µl Klenow Enzym zusammenpipettiert, kurz zentrifugiert und etwa 75 min bei 37°C im Inkubatorschrank inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA beendet. Nach Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eisgekühltem Ethanol wird gemischt und die DNA durch 30 minütige Lagerung bei -70°C ausgefällt. Der Ansatz wird zentrifugiert (10 min, 1.300 rpm, 4°C) und das resultierende Pellet in 40 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in der Speed-Vac getrocknet und für 30 min bei 37°C in 50 µl 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA (pH 8,0) gelöst.

16.2. Hybridisierung markierter DNA mit immobilisierter Ziel-DNA

Der präparierte Filter wird in einer verschweißten Plastiktasche mit 20 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Filter bei 68°C im Wasserbad für 1 h prähybridisiert. Dabei wird die Lösung von Zeit zu Zeit über den Filter verteilt. Dann wird die Hybridisierungslösung verworfen und durch frische Hybridisierungslösung ersetzt. Die markierte DNA wird nochmalig bei 96°C für 10 min denaturiert und nach schneller

Abkühlung zum frischen Hybridisierungsansatz gegeben. Die Plastiktasche wird verschweißt und ÜN bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Hybridisierung kann die Hybridisierungslösung für weitere Hybridisierungs-Reaktionen verwendet werden, eine Lagerung erfolgt bei -18°C. Die hybridisierte Membran wird zwei Mal für 5 min bei RT in 50 bis 80 ml 2 x SSC und 0,1 % SDS pro 100 cm² in einer Plastikwanne auf dem Schüttel-Inkubator gewaschen. Anschließend wird zwei Mal für 15 min bei 60°C mit einer 0,04 x SSC, 0,1 %igen SDS-Lösung gewaschen. Der Filter ist daraufhin für die Färbung bereit.

16.3. Färbung der „Sonden-DNA-Ziel-DNA-Hybride“

Der Filter wird ca. 1 min in Puffer 1 gewaschen und im Anschluß für 30 min in ca. 100 ml Puffer 2 bei 68°C auf dem Wasserbad inkubiert. Nach erneutem kurzem Waschen in Puffer 1 wird der Filter für 30 min ruhig stehend in 20 ml einer 1:5000 -Verdünnung vom Antikörper-Konjugat in Puffer 1 inkubiert. Danach wird die Membran für 2 min in 20 ml Puffer 3 äquilibriert und im Dunkeln in 10 ml Färbelösung in einer verschweißten Plastiktasche inkubiert. Wenn die Banden sichtbar sind, wird die Färbereaktion durch Waschen in 50 ml TE pH 8,0 gestoppt. Der Filter wird bei RT getrocknet.

17. Chromosomale DNA mit Phenolmethode

Puffer 1:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 50 mM EDTA
Lysozymlösung:	1 % Lysozym in 250 mM Tris/HCl; pH 7,5 (frisch angesetzt)
STEP-Lösung:	50 mM Tris/HCl; pH 7,5 400 mM EDTA 0,5 % SDS 0,1 % Proteinase K (kurz vor Verwendung zugeben)
RNaseA-Lösung:	1 % in 50 mM Na-Acetat pH 5,0 (20 min aufkochen, um DNase-Aktivität zu beseitigen)

Eine LB-ÜN-Kultur von 40 ml wird in einem SS34-Teflonröhrchen für 15 min bei 5.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Puffer 1 aufgenommen. Nach mindestens einstündiger Inkubation bei -20°C wird 0,5 ml Lysozymlösung zu den gefrorenen Zellen zugesetzt und unter Invertieren aufgetaut. Daraufhin wird der Ansatz für 45 min auf Eis belassen. Nach Zugabe von 1 ml STEP-Lösung wird für 1 h bei 50°C im

Wasserbad inkubiert. Anschließend werden 4 µl RNase zugegeben, 10 ml ster. Wasser zugegeben, gut umgeschwenkt und für 10 min bei RT belassen. Danach wird mit 6 ml Phenol gut gemischt und zentrifugiert (15 min, 10.000 rpm). Die wäßrige Phase wird mit Hilfe einer gekappten Pipettenspitze entnommen und in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Etwa ein Zehntel des erhaltenen wäßrigen Volumens werden an Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,2) hinzugegeben und umgeschwenkt. Die DNA-Fällung erfolgt durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an 96%igem technischen Ethanol. Durch Umschwenken wird die Lösung von einem trüben in einen klaren Zustand gebracht. Danach ist das fädige Präzipitat sichtbar, welches mit Hilfe einer Pipettenspitze in einen anderen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, ein Mal mit 100 %igem und ein Mal mit 70 %igem Ethanol gewaschen wird. Die so erhaltene DNA wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gebracht und darin je nach DNA-Menge mit 500 bis 700 µl ster. Wasser gelöst. Um etwaige RNA-Reste zu entfernen, werden der DNA-Lösung 7 µl RNase zugesetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert.

18. Isolierung chromosomaler DNA mit Nucleobond-Säulen

Lysozymlösung:	100 mg/ml (in ster. Wasser)
Proteinase K-Lösung:	20 mg/ml (in ster. Wasser)
RNase Puffer G3:	zu Puffer G3* wird RNase A (200 µg/ml) zugesetzt
G4-Puffer*	
N2-Puffer*	
N3-Puffer*	
N5-Puffer*	

*: im Nucleobond DNA Purification Kit® enthalten

Eine 40 ml ÜN-LB-Kultur wird in einem SS34-Röhrchen zentrifugiert (10 min, 6.000 rpm), der Überstand verworfen und das Sediment mit 4 ml RNase Puffer G3 mit dem Vortexer resuspendiert. Danach werden 80 µl Lysozymlösung, 100 µl Proteinase K-Lösung zugegeben und 40 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,4 ml G4-Puffer wird erneut gevortext und 30 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Die Probe wird mit 5 ml N2-Puffer gevortext und auf die zuvor mit 2 ml N2-Puffer äquilibrierte Nucleobond-Säule (Typ AX G100) gegeben. Die Säule wird drei Mal mit 4 ml N3-Puffer gewaschen und die DNA zwei Mal mit 5 ml N5-Puffer von der Säule in ein 25 ml Greinerröhrchen eluiert. Die DNA wird durch Zugabe von 7 ml Isopropanol, guter Durchmischung und 60 minütiger Inkubation gefällt. Nach Umfüllung in 1,5 ml Reaktionsgefäße wird zentrifugiert (25 min, 14.500 rpm, 4°C), das erhaltene Pellet für 15 min an der Luft getrocknet und in 500 µl ster. Wasser aufgenommen.

19. Erstellung einer subtraktiven Genbank mit Hilfe des CLONTECH PCR-Select Genome Subtraction Kit[®]

19.1. Allgemeines zur Methodik

Subtraktive Methoden werden angewendet, um Sequenzen zu identifizieren, die in einem zu untersuchenden Genom präsent sind, in einem anderen zu vergleichendem Genom aber fehlen. Die genomische DNA, welche die gesuchten Sequenzen trägt, ist die sogenannte „Tester“-DNA. Das Referenzgenom, mit der das Testergenom verglichen wird, wird als „Driver“-DNA bezeichnet. Bei der Methodik der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) bedient man sich spezifischer Adaptoren, die an durch Restriktion erhaltene DNA-Fragmente der Tester-DNA ligiert werden. Im späteren Prozess können aufgrund der bekannten Sequenzen dieser Adaptoren spezifische PCRs durchgeführt werden. Das Prinzip ist in Abbildung C-1. schematisch dargestellt. Die DNA-Isolate der Tester- und Driver-DNA werden zunächst mit dem gleichen Restriktionsenzym behandelt. Die resultierenden Fragmente der Tester-DNA wird in zwei Portionen aufgeteilt und diese mit jeweils unterschiedlichen Adaptoren ligiert. Bei der anschließenden Hybridisierung mit den Driver-DNA-Fragmenten, die für beide Adaptorarten separat durchgeführt wird, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Nur diejenigen Tester-Fragmente, deren Sequenz nicht im Driver-Genom vorhanden ist, werden kein entsprechendes Driver-Fragment für die Hybridisierung vorfinden (Abbildung C-1. a und b). Diese für das Testergenom spezifischen Fragmente können nur untereinander hybridisieren oder bleiben einzelsträngig. Die unspezifischen Testerfragmente werden vorwiegend mit im Überschuß vorhandenen Driverfragmenten hybridisiert, sie sind demnach doppelsträngig (Abbildung C-1. c). Von Interesse sind diejenigen spezifischen Tester-Fragmente die einzelsträngig bleiben und daher im nachfolgenden zweiten Hybridisierungsschritt noch hybridisieren können. Spezifische im Drivergenom nicht vorhandene Tester-Sequenzen, die eventuell in höherer Kopienzahl auf dem Genom vorhanden sind, werden eher doppelsträngig vorzufinden sein. Damit werden spezifische Sequenzen, die nur einmal auf dem Genom vorkommen mit den mehrfach vorhandenen angeglichen. Nach Vereinigung der beiden separaten Ansätze der ersten Hybridisierung resultieren doppelsträngige Fragmente, teilweise ohne Adaptoren, teilweise mit den gleichen oder mit unterschiedlichen Adaptorarten an ihren beiden Enden (Abbildung C-1. e).

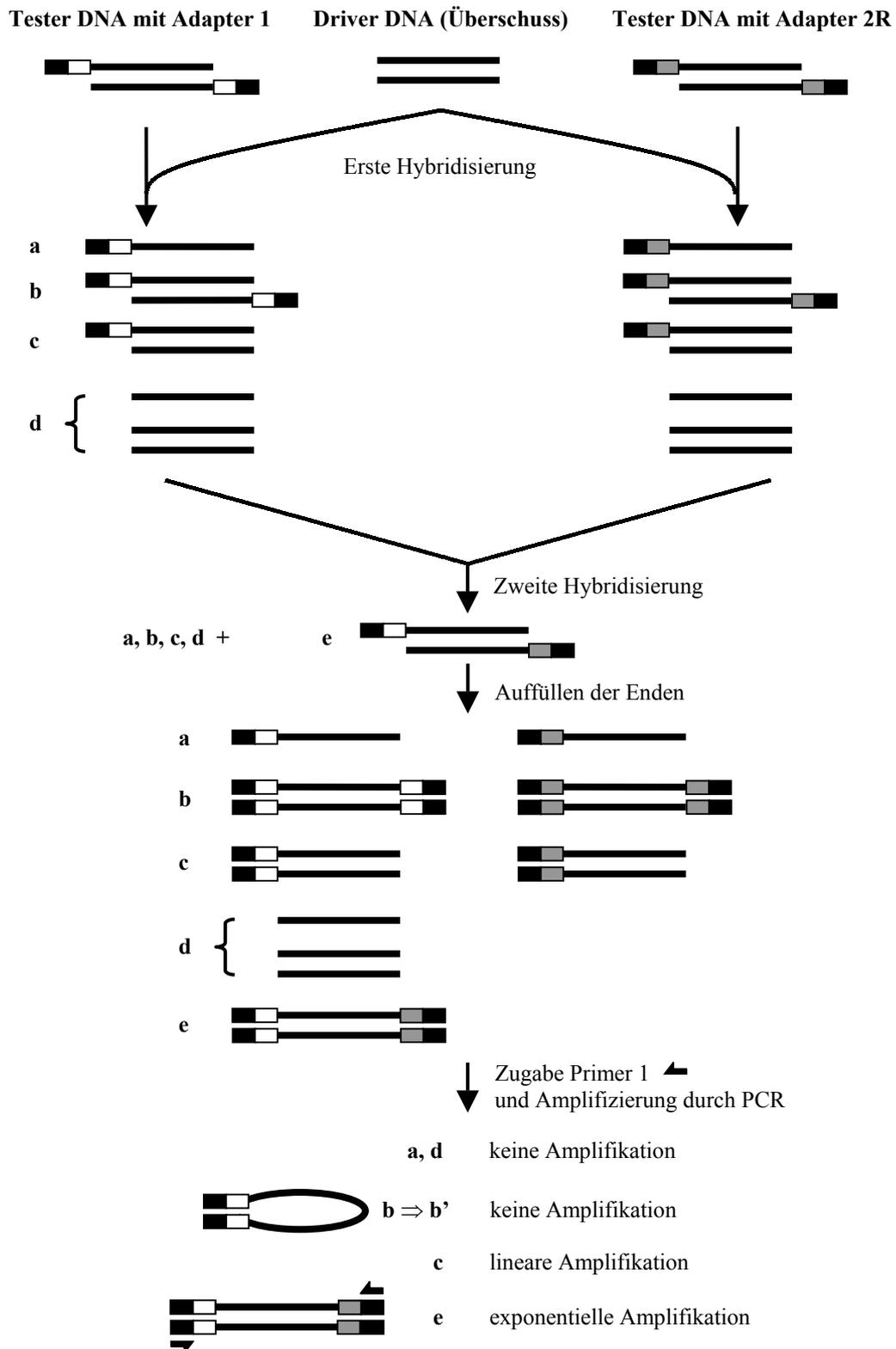


Abb. C-1.: Schematisches Diagramm der subtraktiven Hybridisierung. Die schwarzen Balken repräsentieren *RsaI*-restringierte DNA. Die schwarz gefüllten Kästchen stellen den äußeren Teil der Adaptern 1 und 2R dar, welche eine identische DNA-Sequenz besitzen. Weiß gefärbte Kästchen repräsentieren die spezifische Adapter1-, graue Kästchen die spezifische Adapter 2R-Sequenz. Moleküle des Typs e werden nur gebildet, wenn die Sequenz in der Tester DNA präsent, in der Driver DNA jedoch nicht vorhanden ist.

In der sich anschließenden PCR werden nur diejenigen Fragmente amplifiziert, die an beiden Enden einen Adaptor besitzen. Beide Adaptorarten haben einen gemeinsamen identischen Sequenzbereich. In der ersten PCR wird ein Primer verwendet, der diesen gemeinsamen Bereich abdeckt. Dabei werden nur testerspezifische Fragmente amplifiziert, die nach dem ersten Hybridisierungsschritt sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig waren. (Abbildung C-1. b und e). Da jene doppelsträngigen Fragmente an beiden Enden die gleiche Adaptorssequenz tragen, können die Fragmentenden miteinander hybridisieren und „panhandle“-ähnliche Strukturen ausbilden, die eine Amplifizierung unterdrücken (Abbildung C-1. b'). Nur die Fragmente mit den an beiden Enden unterschiedlichen Adaptorsequenzen werden exponentiell amplifiziert. In einer darauffolgenden zweiten PCR werden Primer eingesetzt, die den jeweiligen spezifischen Adaptorbereichen entsprechen. Dabei werden hintergründig amplifizierte unspezifische Produkte weiter reduziert.

Folgende Komponenten aus dem CLONTECH PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit[®] werden verwendet:

Rsa I Restriktionspuffer (10 x)

Rsa I (10 units/ μ l)

Adaptor 1 (10 μ M) und Adaptor 2R (10 μ M)

Hybridisierungspuffer (4x)

Dilutionspuffer

PCR Primer 1 (10 μ M), Nested Primer 1 (10 μ M) und Nested Primer 2R (10 μ M)

als Kontrollreagentien: PCR Control Subtracted cDNA, *E. coli* Genomic DNA (1mg/ml)

Control DNA (3ng/ μ l; \square X174/*Hae* III digest)

19.2. Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wird wie beschrieben entweder mit Nucleobond-Säulen (siehe C-18.) oder nach der Phenol-Methode (siehe C-17.) verfahren. Für die nachfolgenden Experimente wird chromosomale DNA des STEC O157:H7-Stammes EDL933 (Driver) und des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89 (Tester) eingesetzt. Dabei finden jeweils beide genannten Isolationsmethoden Verwendung.

19.3. Restriktion der Tester- und Driver-DNA

Sowohl Tester- als auch Driver-DNA werden mit *Rsa*I verdaut. Ebenso wird die dem Kit beigelegte genomische DNA eines Kontroll-*E. coli*-Stammes behandelt. Das Ansatzvolumen

beträgt 50 μl . Für die unterschiedlich konzentrierten DNA-Isolate findet folgender allgemeiner Ansatz in einem 500 μl -Reaktionsgefäß Anwendung:

genomische DNA (2 μg)	x μl
10x <i>RsaI</i> Restriktionspuffer	5 μl
<i>RsaI</i> (10 units/ μl)	1,5 μl
ster. Wasser.	y μl
<hr/>	
Gesamtvolumen	50 μl

Der Ansatz wird gevortext, kurz zentrifugiert und für 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 2,5 μl 0,2 M EDTA zugegeben, um die enzymatische Reaktion zu beenden. Zur Überprüfung der Restriktion werden 5 μl des Ansatzes entnommen und mittels horizontaler Elektrophorese auf ausreichenden Verdau kontrolliert. Als Vergleich werden 0,2 μg ungeschnittener DNA eingesetzt. Anschließend werden 50 μl einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) dazugegeben und gevortext. Die Mischung wird zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm), der DNA-enhaltende wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 μl einer Chloroform:Isoamylalkohol-Mischung (24:1) versetzt und sorgfältig gevortext. Die Reaktionsgefäße werden wie zuvor zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues 500 μl -Reaktionsgefäß überpipettiert. Im Anschluß wird mit dem 0,5-fachen Volumen einer 4 M NH_4OAc -Lösung und dem 2,5-fachen Volumen (aus dem vorher resultierenden Volumen) 95 %igen Ethanols versetzt und sorgfältig gemischt. Die Mischung wird zentrifugiert (20 min, 14.000 rpm) und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das so erhaltende DNA-Pellet wird vorsichtig mit 200 μl 80%igem Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm). Nach vorsichtiger Entfernung des Überstands wird das Pellet für 5-10 min bei RT getrocknet und danach in 6,5 μl ster. Wasser gelöst.

19.4. Ligation der Tester-DNA mit Adaptoren

1,2 μl der *RsaI*-restringierten DNA des *E. coli* 493/89-Stammes werden mit 1,8 μl ster. Wasser verdünnt. Dies ist die experimentelle Tester DNA. Zur Präparierung der Kontroll-Tester-DNA werden 3 μl der dem Kit beigegeführten Kontroll-DNA ($\phi\text{X174}/\text{HaeIII}$ digest) mit 42 μl ster. Wasser auf eine Konzentration von 0,2 ng/ μl verdünnt. 1,2 μl der *RsaI*-verdauten Kontroll-*E. coli*-DNA (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) werden mit 1,8 μl der verdünnten $\phi\text{X174}/\text{Hae III}$ digest-DNA gemischt. Diese Mischung stellt die Kontroll-Tester-DNA dar. Sie enthält eine Kopie der *HaeIII*-verdauten ϕX174 -DNA pro *E. coli*-Genom des *E. coli*-Kontrollstammes. Nach

Subtraktion der Kontroll-Tester-DNA gegen die Kontroll-Driver-DNA sollten die resultierenden Banden mit den Fragmenten des ϕ X174-DNA-Verbaus korrespondieren.

Für die Ligation der präparierten Tester-DNA mit zwei unterschiedlichen Adaptoren wird ein Master-Mix angesetzt. Dazu werden 4 μ l ster. Wasser, 2 μ l 5x Ligationspuffer und 1 μ l T4 DNA Ligase (400 units/ μ l) in einem 500 μ l-Reaktionsgefäß miteinander vermischt. Für die experimentelle Tester DNA und für die Kontroll-Tester-DNA werden nach folgendem Schema die Reagentien in einem 500 μ l-Reaktionsgefäß gemischt:

Komponente	Cap	1	2
		Tester 1-1*	Tester 1-2*
		(μ l)	(μ l)
Verdünnte Tester-DNA		1	1
Adapter 1 (10 μ M)		2	-
Adapter 2R (10 μ M)		-	2
Master Mix		7	7
Gesamtvolumen		10	10

* für Kontroll-Tester 2-1 und 2-2 wird derselbe Ansatz verwendet

In ein anderes 500 μ l-Reaktionsgefäß werden 1,5 μ l des Tester 1-1- und 1,5 μ l des Tester 1-2 - Gemisches pipettiert. Dies ist die unsubtrahierte Tester-Kontrolle 1-c. In gleicher Weise wird mit der Tester-Kontroll-DNA verfahren (2-c). Nach kurzer Zentrifugation der Ansätze wird ÜN (16 h) bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 μ l 0,2 M EDTA beendet. Je 1 μ l der unsubtrahierten Tester Kontrolle (1-c bzw. 2-c) werden in 1 ml Wasser verdünnt. Diese Verdünnungen werden für die spätere PCR-Amplifikation eingesetzt. Um eine erfolgreiche Ligation zu kontrollieren wird eine PCR mit einem für die Tester-DNA spezifischem Primerpaar (Primer 2317 bzw. 2318) und einem Adapterprimer (Primer 1) durchgeführt. Nach folgendem Schema wird die DNA der beiden Adaptorenligationsansätze und die drei eingesetzten Primer zusammenpipettiert:

Komponente	Reaktion			
	1	2	3	4
Verdünnte Tester-DNA 1-1	1	1	-	-
Verdünnte Tester-DNA 1-2	-	-	1	1
Primer 2317	1	1	1	1
Primer 2318	-	1	-	1
Primer 1	1	-	1	-
Gesamtvolumen	3	3	3	3

Der jeweilige Ansatz wird mit 22 μl PCR-Mastermix, bestehend aus 18,25 μl ster. Wasser, 2,5 μl PCR-Puffer (High fidelity system), 0,5 μl dNTP und 0,75 μl Taq-Polymerase (High fidelity system), versetzt. Das Temperaturprogramm im Thermocycler GeneAmp 9600 (Perkin Elmer) ist für alle vier Ansätze identisch: 2 min 72°C, 1 min 94°C, 24 x (30s 94°C, 30s 65°C, 1 min 68°C).

19.5. Erste Hybridisierung

Im ersten Hybridisierungsschritt werden die mit den jeweils unterschiedlichen Adaptoren ligierten Tester-DNA-Ansätze des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89 mit der restringierten Driver-DNA des STEC O157:H7-Stammes EDL933 hybridisiert. Für jede der experimentellen und der Kontroll-Subtrahierungen werden die Reagentien nach folgendem Schema in einem 500 μl -Reaktionsgefäß gemischt:

Komponente	Hybridisierung 1 (μl)	Hybridisierung 2 (μl)
<i>RsaI</i> -verdaute Driver DNA	2,0	2,0
Adapter 1-ligierte Tester 1-1*	1,0	--
Adapter 2R-ligierte Tester 1-2*	--	1,0
4x Hybridisierungspuffer	1,0	1,0
Gesamtvolumen	4,0	4,0

*der gleiche Ansatz wird für Kontroll-Tester 2-1 und 2-2 verwendet

Die Mischungen werden mit Mineralöl überschichtet und kurz zentrifugiert. Im Anschluß werden die Proben im Thermocycler für 1,5 min bei 98°C inkubiert. Daraufhin werden die Proben bei 63°C für 90 min inkubiert und anschließend sofort für die zweite Hybridisierung bereitgestellt.

19.6. Zweite Hybridisierung

Im zweiten Hybridisierungsschritt werden diejenigen Fragmente miteinander hybridisiert, welche bei der ersten Hybridisierung nicht mit Driver-DNA-Fragmenten hybridisiert werden konnten. Der 4x Hybridisierungspuffer wird mit der gleichen Menge Wasser auf 2x verdünnt. 1 μl davon wird mit 1 μl Driver DNA gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Der Ansatz wird im Thermocycler bei 98°C für 1,5 min inkubiert und daraufhin sofort aus dem

Thermocycler genommen. Eine Mikropipette wird auf 15 µl eingestellt. Die Pipettenspitze wird vorsichtig an die Wasser/Öl-Grenzfläche des Reaktionsgefäßes mit dem Hybridisierungsansatz 2 geführt und die wässrige Lösung vollständig aufgenommen. Kleine Mengen eventuell mit aufgenommenen Mineralöls wirken sich im Folgenden nicht störend aus. Nach Herausnehmen der Pipettenspitze aus dem Reaktionsgefäß wird etwas Luft in die Pipettenspitze gesaugt und anschließend in gleicher Weise wie zuvor die frisch denaturierte Driver-DNA aufgenommen. Beide Lösungen in der Pipettenspitze werden daraufhin in den Hybridisierungsansatz 1 überführt und vermischt. Nach kurzer Zentrifugation wird die Mischung 16 h bei 63°C inkubiert. Danach werden 200 µl des Dilutionspuffers hinzugefügt und gemischt. Um unspezifische Hybridisierungen zu eliminieren wird der verdünnte Ansatz für 7 min bei 63°C im Thermocycler erhitzt.

19.7. PCR-Amplifizierung

Die im zweiten Hybridisierungsschritt miteinander hybridisierten Fragmente werden im nachfolgenden PCR-Schritt amplifiziert. Diese PCR wird für sämtliche experimentelle und Kontrollansätze durchgeführt. 2 µl der verdünnten Hybridisierungsansätze werden mit folgendem PCR-Master-Mix gemischt:

- 2,5 µl PCR-Puffer (ohne MgCl₂-Zusatz, Roche Diagnostics)
- 1,0 µl MgCl₂ (25 mM, Perkin Elmer)
- 1,0 µl Primer 1
- 0,5 µl dNTP (Perkin Elmer)
- 17,5 µl ster. Wasser

Der Ansatz wird für 1 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wird sofort 0,5 µl Taq-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics) zugesetzt und folgendes PCR-Temperaturprogramm angewendet:

1. 5 min 72°C
2. 25s 94°C
3. 10s 94°C
4. 30s 60°C
5. 90s 72°C

Die Schritte 3. bis 5. werden 28 Mal ausgeführt. Dieses Programm entspricht einem sogenannten „hot start“-Programm, bei dem vor der Taq-Zugabe unspezifisch ablaufende Reaktionen durch ein kurzzeitiges Vorerhitzen des Ansatzes auf 75°C unterdrückt wird. Bei

dieser ersten PCR werden alle Fragmente amplifiziert, die an beiden Enden sowohl gleiche als auch unterschiedliche Adaptoren tragen. Danach wird eine zweite PCR durchgeführt, bei der nur jene Fragmente amplifiziert werden, die unterschiedliche Adaptoren an beiden Enden besitzen. Dazu wird jeweils 1 µl der amplifizierten Ansätze aus der ersten PCR mit 39 µl Wasser verdünnt. Daraus wird 1 µl entnommen und mit folgendem PCR-Master-Mix versetzt:

- 2,5 µl PCR-Puffer (ohne MgCl₂-Zusatz, Roche Diagnostics)
- 1,0 µl MgCl₂ (25 mM, Perkin Elmer)
- 1,0 µl Nested Primer 1
- 1,0 µl Nested Primer 2R
- 0,5 µl dNTP (Perkin Elmer)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics)
- 17,5 µl ster. Wasser

Anschließend wird unverzüglich folgendes Temperaturprogramm durchgeführt:

1. 25s 94°C
2. 10s 94°C
3. 30s 63°C
4. 90s 72°C

Die Schritte 2 bis 4 werden 15 mal ausgeführt. Zur jeweiligen Analyse der amplifizierten Produkte wird mit je 7 µl der ersten und der zweiten PCR eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt.

19.8. Unterschiedliche experimentelle Bedingungen

Die Resultate des subtraktiven Hybridisierungsexperiments können durch unterschiedlich gewählte Bedingungen abgewandelt und somit optimiert werden. Im Folgenden sind die einzelnen entsprechenden Abweichungen von der zuvor beschriebenen Verfahrensweise dargestellt. Die Reaktionsansätze sind bei allen anderen Bedingungen identisch zu dem zuvor beschriebenen Experiment.

19.8.1. Änderung des Temperaturprogramms am Thermocycler

In einem Experiment wird an Stelle des Hot-Start-Programms ein normales PCR-Programm gewählt, bei der erst nach der Taq-Zugabe das Temperaturprogramm gestartet wird. Dieses entspricht dem Programm welches bei der Ligationskontrolle verwendet wird: 2 min 72°C, 1 min 94°C, 24 x (30s 94°C, 30s 65°C, 1 min 68°C).

19.8.2. Erhöhung der Zyklusanzahl in der ersten PCR

Bei einem weiteren Versuch wird die Zyklusanzahl der ersten PCR und die Menge der eingesetzten hybridisierten DNA erhöht. So werden 2 µl der verdünnten hybridisierten DNA-Lösung an Stelle der zuvor verwendeten 1 µl eingesetzt. Dementsprechend wird eine geringere Menge ster. Wasser (16,5 µl) im PCR-Mastermix verwendet. Folgendes Hot-Start Temperaturprogramm wird daraufhin angewendet: 5 min 72°C, 25s 94°C, 27 x (10s 94°C, 30s 66°C, 90s 72°C).

19.8.3. Verwendung eines anderen Taq-Polymerase-Systems

In einem anderen Experiment wird an Stelle des High-fidelity-Systems das Amplitaq-Polymerase-System von Perkin Elmer und 2 µl der Verdünnung der jeweiligen Hybridisierung in einem 50 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Der Ansatz setzt sich aus 35,65 µl ster. Wasser, 4 µl MgCl₂ (Perkin Elmer), 5 µl PCR-Puffer (Perkin Elmer), 2 µl Primer 1, 1 µl dNTP (Perkin Elmer) und 0,5 µl Amplitaq-Polymerase zusammen. In der zweiten PCR finden entsprechend 2 µl einer 1:40-Verdünnung der ersten PCR in ster. Wasser, 35,65 µl ster. Wasser, 4 µl MgCl₂, 5 µl PCR-Puffer (Amplitaq-System), 2 µl nest. Primer 1, 2 µl nest. Primer 2R, 1µl dNTP und 0,5 Amplitaq-Polymerase Anwendung.

19.8.4. Erhöhung der MgCl₂-Konzentration im PCR-Mastermix

Auch die MgCl₂-Konzentration kann variiert werden. Um die Menge des Magnesiums zu erhöhen wird an Stelle des Mg-freien PCR-Puffers ein Mg-haltiger Puffer (Roche Diagnostics) eingesetzt. Der entsprechende PCR-Mastermix besteht aus 17,5 µl ster. Wasser, 2,5 µl PCR-Puffer (+MgCl₂, 20mM, Roche Diagnostics), 1 µl MgCl₂ (Perkin Elmer), 1 µl Primer 1, 0,5 µl dNTP (Perkin Elmer) und 0,5 µl AmpliTaQ-Polymerase. Erneut finden 2 µl der verdünnten Hybridisierung Verwendung. Die zweite PCR ist mit den Basisbedingungen identisch, nur dass auch hier der MgCl₂-haltige PCR-Puffer verwendet wird.

19.8.5 Erhöhung der eingesetzten DNA-Konzentration der restringierten Driver- und Tester-DNA

Um die subtraktive Hybridisierung effektiver zu gestalten wird in zwei weiteren Ansätzen die Ausgangsmenge an restringierter DNA für die Adaptorligation und die Hybridisierung erhöht. Bei dem Basisansatz wird laut Herstellervorschrift am Ende der Restriktion der Tester- bzw. der Driver-DNA von einer DNA-Konzentration von 300 ng/µl ausgegangen. Um diese

Konzentration zu gewährleisten, wird in einem dreifachen Ansatz Tester- und Driver-Genom mit *RsaI* restringiert und die Endkonzentration photometrisch ermittelt. Daraufhin wird die erhaltene DNA auf die erwähnte Konzentration von 300 ng/μl eingestellt. Die Hybridisierung und subtraktive PCR wird wie beschrieben mit der erhöhten MgCl₂-Konzentration durchgeführt.

In einem letzten Ansatz wird die Driver-Konzentration in beiden Hybridisierungen erhöht. An Stelle der bislang verwendeten 600 ng werden bei der ersten Hybridisierung 1.000 ng eingesetzt und bei der zweiten Hybridisierung wird die ursprünglich verwendete Menge von 300 ng auf 500 ng erhöht. Wie zuvor wird mit der erhöhten MgCl₂-Konzentration verfahren.

20. Bestätigung Tester-spezifischer Sequenzen

Um zu bestätigen, dass die amplifizierten Fragmente der subtraktiven PCR nur im Chromosom des SF STEC O157:H7 Stammes 493/89 und nicht im STEC O157:H7-Stamm EDL933 vorhanden sind, werden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen werden die amplifizierten Fragmente nach Klonierung mit Hilfe des BlueScript- oder pCR2.1-Vektors sequenziert und zum anderen wird eine Makroarray-Untersuchung durchgeführt.

20.1. Ligierung der subtraktiven PCR-Produkte in den Bluescriptvektor und Transformation in kompetente DH5α-Zellen

Die PCR-Amplifikate, welche idealerweise an einem Ende die Adaptersequenz 1 und am anderen Ende 2R tragen, werden mit Restriktionsenzymen von den Adaptersequenzen getrennt und in den Bluescript-Vektor ligiert. Adapter 1 wird mit *NotI* und Adapter 2R mit *EagI* vom Amplifikat getrennt. Hierzu werden 10 μl des amplifizierten Ansatzes der zweiten PCR, welche nicht länger als 12 h zurückliegt, mit 1 μl *EagI*, 1 μl *NotI*, 5 μl React 3-Puffer (New England Biolabs), 0,5 μl Rinderserumalbumin (BSA) und 33,5 ml ster. Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt. Durch Auf- und Abziehen mit dem Mikropipettor wird gemischt, kurz an zentrifugiert und anschließend 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird das Enzym durch 20 minütige Erhitzung des Ansatzes bei 65°C im Wasserbad denaturiert und die DNA mittels Qiagen PCR purification Kit (siehe C-14.) aufgereinigt. Die DNA wird in 20 μl ster. Wasser aufgenommen. Parallel werden 1,7 ng Bluescript Vektor (entspricht 1 μl) mit 1 μl *NotI*, 5 μl React 3-Puffer (New England Biolabs), 0,5 μl BSA und 42,5 μl ster. Wasser in gleicher Weise wie beschrieben für 1 h bei 37°C inkubiert. Der linearisierte Vektor wird durch Zugabe von 0,2 μl SAP in den Ansatz und 1 stündiger Inkubation bei 37°C

dephosphoryliert. Auch hier erfolgt die Enzymaktivierung durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 20 min. Für die Ligation werden die 20 µl der aufgereinigten PCR-DNA mit 2 µl des linearisierten und dephosphorylierten Vektoransatzes mit 5 µl T4-Ligase und 3 µl Ligasepuffer zusammenpipettiert und für 16 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wird die Ligase durch Erhitzen auf 72°C im Thermoblock inaktiviert. Die Transformation des gesamten Ansatzes in einem Aliquot kompetenter DH5α-Zellen wird wie bei C-10.2. beschrieben durchgeführt.

Die weißen Kolonien der X-Gal-Ampicillin-Agarplatten werden einzeln auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen, ÜN bebrütet und die entsprechenden Plasmide werden mit Hilfe der Schnellmethodik (siehe C-11.) isoliert. Die resultierenden DNA-Pellets werden in 20 µl ster. Wasser aufgenommen. Um zu ermitteln, welche Plasmide ein DNA-Insert der amplifizierten subtraktiven PCR-Fragmente enthalten, werden die Plasmide mit *SacI* und *EcoRI* restringiert. Die *NotI*-Schnittstelle im geschlossenen Bluescriptvektor liegt zwischen den *SacI* und *EcoRI*-Schnittstellen. Somit werden in die *NotI*-Schnittstelle ligierte Fragmente durch gleichzeitige Restriktion mit *SacI* und *EcoRI* von dem Vektor entfernt. Für die Restriktion werden jeweils 5 µl jedes einzelnen Plasmidisolates mit 1 µl *SacI*, 1 µl *EcoRI*, 2 µl React 3-Puffer (New England Biolabs) und 11 µl ster. Wasser für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Gesamtansätze werden mittels horizontaler Gelelektrophorese daraufhin überprüft, ob neben dem linearisierten Bluescript Vektor ein zusätzliches DNA-Fragment enthalten ist. Ist dies der Fall, wird der entsprechende Klon für eine Sequenzierung vorbereitet. Als Sequenzierprimer dienen die beiden Bluescript-Primer (Tabelle C-1.).

20.2. Ligierung der subtraktiven PCR-Produkte in pCR 2.1 und Transformation in kompetente INVαF'-Zellen

Für eine direkte Ligierung der amplifizierten PCR-Fragmente in einen Vektor ohne vorherige Restriktion wird das Original TA Cloning® Kit verwendet. Dazu wird ein mit Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigter subtraktiver PCR-Ansatz, dessen Durchführung nicht länger als 24 h zurückliegt, mit 8 µl ster. Wasser aus der Qiagen-Säule eluiert. Davon werden 7 µl in einem 200 µl-Reaktionsgefäß mit 1 µl Ligationspuffer, 2 µl pCR 2.1 Vektor (entsprechend 50 ng) und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt und für 24 h bei 16°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wird kurz anzentrifugiert und auf Eis gegeben. Auf Eis wird ein Behältnis mit gefrorenen kompetenten INVαF'-Zellen, welche zu 200 µl aliquotiert sind, aufgetaut. Zu den kompetenten Zellen werden 2 µl der Ligation gegeben und das Gefäß zur Durchmischung kurz angestippt. Dieser Ansatz wird für 30 min auf Eis belassen. Für exakt 30s wird daraufhin das Gefäß in ein Wasserbad der Temperatur von 42°C gebracht. Anschließend wird dem

Ansatz 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37°C im Rotationsschüttler bei 210 rpm geschüttelt. Von den 550 µl Gesamtansatz werden jeweils 50 µl, 150 µl und 350 µl auf eine jeweils separate X-Gal-Ampicillin-Agarplatte mit einem Drigalski-Spatel verstrichen und ÜN bebrütet. Die weißen Kolonien werden mit Hilfe von autoklavierten Zahnstochern in 1 ml LB-Medium überführt und in verschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäßen in schräger Lage bei 37°C ÜN inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, das überständige LB-Medium verworfen und der Rückstand über die Plasmidminipräm-Methodik (siehe C-11.) aufgearbeitet. Die Kontrolle der Klone auf Vorhandensein von subtraktiven PCR-Fragmenten wird durch Restriktion des Plasmidisolats mit *HindIII* oder durch eine PCR mit nested Primer 1 und nested Primer 2R durchgeführt. Für die erste Methode werden 5 µl des in 30 µl ster. Wasser gelösten DNA-Pellets der Plasmidminipräparation mit 1 µl *HindIII*, 2 µl React 2-Puffer (New England Biolabs) und 12 µl ster. Wasser vereinigt und für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Der Gesamtansatz wird daraufhin mittels horizontaler Gelelektrophorese kontrolliert.

Für die Insertkontrolle mittels PCR wird 1 µl Plasmidisolat mit einem PCR-Mastermix, bestehend aus 1 µl nested Primer 1, 1µl nested primer 2R, 0,5 µl dNTP, 2,5 µl PCR-Puffer, 2 µl MgCl₂, 18,5 µl ster. Wasser und 0,25 µl Taq versetzt und mit folgendem Temperaturprogramm eine PCR durchgeführt: 5 min 94°C 30 x (30s 94°C, 30s 63°C, 90s 72°C), 5 min 72°C. Acht µl der jeweiligen PCR-Ansätze werden durch eine horizontale Gelelektrophorese überprüft.

Die ermittelten Plasmide, die ein PCR-Fragment als Insert besitzen, werden wie zuvor beschrieben (siehe C-20.1.) mit Bluescriptprimern ansequenziert.

20.3. Spezifitätskontrolle mittels Makroarray

An Stelle einer Sequenzierung kann auch eine Bestimmung der Spezifität der durch PCR amplifizierten Plasmidinserts für Stamm 493/89 mittels Makroarray herangezogen werden. Hierfür werden 5 µl der nach C-19.7. durchgeführten PCR mit 5 µl einer frisch hergestellten 0,6N NaOH-Lösung versetzt. Bei einem hohen Probendurchsatz wird dies in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Von der resultierenden Lösung werden jeweils 1-2 µl eines jeden PCR-Ansatzes in einer gereihten Anordnung auf eine Nylonmembran mit Hilfe einer Mikropipette gespottet und trocken gelassen. Die fertig gespottete Membran wird in einer ausreichend großen Plastikwanne für 4 min in einer 0,5 M Tris-HCl-Lsg. (pH 7,5) neutralisiert. Anschließend wird die Membran mit dem. Wasser kurz gewaschen und die Spots werden unter dem UV-Crosslinker mit einer Bestrahlungsenergie von 2.400 Joule

fixiert. Die Membran ist nun für eine Hybridisierung mit P^{33} -markierter chromosomaler DNA bereit. Die Vorgehensweise ist unter C-21. detailliert beschrieben.

21. Genomvergleich mittels *E. coli* K-12 Makroarray

SSPE:	0,18 M NaCl 10 mM Natriumphosphat; pH 7,7 (Na_2HPO_4 - wird zu einer NaH_2PO_4 -Lsg. zugesetzt bis ein pH von 7,7 erreicht wird) 1 mM EDTA	in Aqua dest.
Denhardt' s Reagenz:	0,02 % Ficoll (MW 400.000) 0,02 % Polyvinylpyrolidin (PVP; MW 40.000) 0,02 % Rinderserumalbumin (BSA)	in Aqua dest.
Hybridisierungslösung:	5 x SSPE 2 % SDS 1 % Denhardt's Reagenz 1 % denaturierte Heringssperma-DNA	in Aqua dest.
Waschlösung:	0,05 x SSPE 0,2 % SDS	in Aqua dest.
Stripping-Lösung:	10 mM Tris, pH 7,5 1 mM EDTA 1 % SDS	in Aqua dest.

Für ein Hybridisierungs-Experiment mit einem PanoramaTM *E. coli* Gene Array werden 2 µg chromosomaler DNA benötigt. Die Isolierung von chromosomaler DNA des SF STEC O157:H⁻ -Stammes 493/89 und des STEC O157:H7-Stammes EDL933 wird wie in C-17. beschrieben durchgeführt. Für den direkten Einbau von [³³P]-dATP in eine Polymerisationsreaktion mit Hexamerprimern und der entsprechenden chromosomalen DNA als Template wird der nachfolgende Reaktionsansatz gewählt. 2 µg DNA werden mit 1 µl Random Hexamer Primern (entsprechend 0,75 µg), je 0,5 µl 5 mM dGTP, 5 mM dCTP, 5 mM dTTP, und 5 µl Klenowpuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Mit ster. Wasser wird auf ein Endvolumen von 43 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird auf einem Thermoblock für 10 min bei 96°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis heruntergekühlt. Nach weiteren 5 min werden 5 µl 1 mM [³³P] dATP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 2 µl Klenow-Enzym (entsprechend 10 units) zugesetzt, gemischt, kurz anzentrifugiert und 120 min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Nichteingebaute Nukleotide

werden mit Microspin S200 HR spin-Säulen entfernt. Dazu wird der Bodenverschluß der Säule entfernt, der Deckel etwas aufgedreht, die Säule in ein Auffanggefäß gegeben und anschließend zentrifugiert (1 min, 3.000 rpm). Das Äquilibrierungs-Eluat wird verworfen und auf die Säulenmatrix der chromosomale Reaktionsansatz aufgegeben. Die Säule wird mit leicht geöffnetem Deckelverschluß in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und erneut zentrifugiert (1 min, 3.000 rpm). Das so erhaltene Eluat wird mit dem Geigerzähler auf Radioaktivität überprüft und kann sofort für die Hybridisierung bereitgestellt werden.

Während der Inkubation wird die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wird zunächst die Hybridisierungslösung für 10 min im 65°C Wasserbad vorgewärmt. Die zu hybridisierende Membran wird 5 min in 50 ml 2x SSPE geschwenkt und mit 5 bis 10 ml der vorgewärmten Hybridisierungslösung in einem geeigneten Hybridisierungsröhrchen für 3 h bei 65°C im Hybridisierungsofen bei 9 rpm prähybridisiert. Im Anschluß wird der Ansatz der markierten DNA für 10 min auf dem Thermoblock bei 96°C denaturiert und in die präparierten Hybridisierungsröhrchen gegeben. Dabei wird ein Auftropfen direkt auf die Membran vermieden. Nach Verschluß des Hybridisierungsröhrchens wird für 18 h im Hybridisierungsofen bei 65°C und 9 rpm hybridisiert. Die Lösung wird verworfen und fachgerecht in Radioaktivabfall entsorgt. Die Membran wird drei mal mit 40–50 ml Waschlösung im Hybridisierungsröhrchen gewaschen, indem jeweils bei RT für 2-3 min umgeschwenkt und die Lösung anschließend verworfen wird. Für den darauffolgenden Waschvorgang wird die Waschlösung auf 65°C vorgewärmt. Das Hybridisierungsröhrchen wird zu einem Drittel mit der vorgewärmten Lösung gefüllt und 20 min im Hybridisierungsofen bei 65°C und 14 rpm gewaschen. Nach Ausgießen der Waschlösung wird dieser Vorgang noch zwei weitere Male wiederholt. Danach wird der Array aus dem Hybridisierungsröhrchen entnommen und auf ein Blotpapier gebracht. Dort wird er 5 min an der Luft getrocknet. Für eine eventuelle erneute Verwendung des Arrays ist es notwendig, dass dieser nicht vollständig austrocknet. Die Ablösung der miteinander hybridisierten DNA-Fragmente durch „Stripping“ wäre in diesem Falle nur unzureichend. Der Array wird in durchsichtiger Autoklavierfolie luftblasenfrei eingeschweißt und mit der aufgespotteten Seite unverzüglich auf einen zuvor ausreichend belichteten Phosphoimagerscreen gelegt. Die Exponierung erfolgt bei RT ÜN oder bei –20°C über 2 bis 3 Tage in einer Entwicklungskassette. Der Phosphoimagerscreen wird in möglichst dunkler Umgebung vom Array genommen und mit einem Typhoon™ 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics) gescannt. Die Auflösung beträgt 50 Pixel. Für eine Wiederverwendung des Arrays wird der Array von der markierten DNA gestrippt. Dazu wird in einer Plastikwanne etwa

300 ml Stripping-Lösung in einem Wasserbad mit Schwenkeinrichtung auf etwa 90°C gebracht. Der Array wird aus der Autoklavierfolie ausgeschnitten und in die heiße Stripping Lösung gelegt. Für 20 min wird bei leicht eingestellter Schwenkstellung bei 90°C im Wasserbad belassen. Daraufhin wird die Membran entnommen und auf einem Blottpapier getrocknet. Um zu gewährleisten, dass die Stripping vollständig war, wird der Blott erneut in Autoklavierfolie eingeschweißt und wie beschrieben mit einem Phosphorimagerscreen zusammengelegt und dieser exponiert. Falls nach dem Scannen des Imagers immer noch Signale erkennbar sein sollten, wird die Membran erneut in gleicher Weise behandelt.

Für jeden der beiden untersuchten Stämme werden vier Hybridisierungsexperimente durchgeführt mit jeweils voneinander unabhängig markierter chromosomaler DNA. Die eingescannten *E. coli* Gene Arrays werden mit ArrayVision™ software (Imaging Research, St. Catharines, Canada) ausgewertet mit anschließender visueller Bestätigung. Offene Leserahmen wurden als fehlend detektiert, wenn die Signalintensität beider korrespondierender Doppelspots in mindestens drei der vier durchgeführten Experimente vergleichbar mit dem Membranhintergrund sind. Mit Hilfe der Software wird eine Liste erstellt, in der die fehlenden offenen Leserahmen den entsprechenden Genen zugeordnet werden. Die offenen Leserahmen sind auf der Membran nicht der Lage auf dem Chromosom entsprechend angeordnet. Im Chromosom benachbarte Gene sind auf unterschiedlichen Bereichen der Membran aufgespottet. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein aus mehreren offenen Leserahmen bestehendes Gencluster als falsch negativ bewertet wird, minimal, da benachbarte Gene aufgrund durch die Hybridisierung bedingter Artefakte nur geringfügig als fehlend eingestuft werden. Die *E. coli* Gene Arrays werden mit den markierten chromosomalen DNAs des *E. coli* Stammes MG1655 als Positiv und des *Staphylococcus aureus* Stammes Wood 46 als Negativkontrolle hybridisiert.

22. Genomvergleich mittels Pathoarray

Für die schnelle Ermittlung bekannter Virulenzfaktoren auf dem SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 wird ein Pathoarray verwendet, der freundlicherweise vom Institut für Infektionsbiologie, Würzburg zur Verfügung gestellt wird. Auf einer Nylonmembran sind dem gleichen Prinzip wie beim *E. coli* K-12-Makro-Array folgend 456 PCR-Produkte von Virulenz assoziierten ORFs von extraintestinalen und intestinalen *E. coli*, und außerdem von *Shigella flexneri* gespottet. Die Hybridisierung wird auf die gleiche Art und Weise wie bei der C-21. beschriebenen Makroarray-Prozedur durchgeführt. Die Auswertung erfolgt visuell.

23. Kolonie-Blot hybridisierung

Denaturierungslösung:	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
0,2 % Triton X100-Lösung	
Neutralisierungslösung	1M Tris_HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl

Eine schnelle Methodik, um aus einer großen Anzahl von Klonen zu ermitteln, welcher Klon ein gesuchtes Gen besitzt, ist die Hybridisierung mit einem Kolonie-Blot. Diese Methode wird für die unter C-5. hergestellte Cosmid-Genbank eingesetzt. Dazu wird jede der 15 Mikrotiterplatten mit dem 48er Stempel auf jeweils eine Ampicillin-Agarplatte überimpft und 24 Stunden wachsen gelassen. Eine Nylonmembran wird der Größe der Agarplatten entsprechend zurechtgeschnitten und luftblasenfrei auf die mit den Kolonien bewachsene Agarplatte aufgelegt. Nach Markierung der Position der Membran wird diese zügig abgezogen und für 20 min mit der Koloniseite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung getränktes 3MM Papier aufgelegt. Die Membran wird anschließend 5 min auf einem weiteren 3MM-Filterpapier getrocknet und 15 min auf ein mit 0,2%iger Triton X100- und 0,5 N NaOH-Lösung getränktes 3MM-Papier gelegt. Nach erneuter 5 minütiger Trocknung wird die Membran 5 min in einer Schale in 2 x SSC gewaschen und trocken gelassen. Zur DNA-Fixierung wird unter dem UV-Crosslinker mit 2.400 Joule bestrahlt. Zur Entfernung der Zellreste wird die Membran zunächst für 20 min in 2xSSC, 1% SDS bei 50°C, danach 10 min in 2xSSC, 0,1% SDS bei RT und anschließend 10 min mit 2xSSC bei RT gewaschen. Gegebenenfalls werden nach dem ersten Waschschrift Zellreste vorsichtig mit einem Wattestab entfernt. Zur Hybridisierung wird wie bei C-15. beschrieben weiterverfahren.

24. Sequenz-Identifikationsnummern

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Nukleotidsequenzen für die *E. coli* 493/89-spezifischen Sequenzen wurden unter den Accession-Nummern AJ459584, AJ508930 und AJ534392 in der EMBL-Nukleotid-Datenbank zur Verfügung gestellt.

D Ergebnisse

1. Sequenzierung der Cosmid-Genbank eines SF STEC O157:H⁻-Stammes

Für den Vergleich der chromosomalen Genome zweier O157-Pathovaren wurden vier verschiedene molekularbiologische Techniken angewendet. Um repräsentative Aussagen über die chromosomale Sequenz eines SF STEC O157:H⁻-Stammes zu erhalten, wurde zunächst eine Cosmid-Genbank des Stammes 493/89 angefertigt, der als erstes in Zusammenhang mit einem HUS-Ausbruch in Deutschland gebracht werden konnte [Karch *et al.*, 1990]. Durch die Herstellungsweise bedingt, liegt die Größe eines chromosomalen Inserts in einem Cosmid zwischen 39 und 43 Kb. Bei einer Anzahl von 720 Klonen der erstellten Genbank errechnet sich damit statistisch eine etwa sechsfache Abdeckung des verwendeten 4,9 Mb großen SF STEC O157:H⁻-Genoms, ($720 \times 0,04 \text{ Mb} / 4,9 \text{ Mb} = 5,9$). Die Genomgröße von 4,9 Mb konnte mit Hilfe der Pulsfeld-Technik abgeschätzt werden [Dobrinth *et al.*, 2003]. Zunächst wurde die Cosmid-DNA von 300 verschiedenen Klonen isoliert und das jeweilige Insertfragment von beiden Seiten ansequenziert. Die durchschnittliche Länge einer Sequenzierung betrug etwa 500 bis 600 Basenpaare. Auf diese Weise konnten 188 Cosmid-Insertfragmente mindestens von einem Ende her ansequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Sequenzdaten in der Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Datenbank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA) verglichen. Daraufhin konnte für 110 Cosmide an beiden Insertenden eine 95 bis 100 prozentige Identität zu der veröffentlichten chromosomalen Sequenz des STEC O157:H7-„Referenz“-Stammes EDL933 gefunden werden (Accession-Nr. NC_002655). Bei 93 dieser Cosmide lag der Abstand der beiden ermittelten Identitäten an den Insertfragmentenden zwischen 18 und 100 Kb innerhalb der chromosomalen *E. coli* EDL933-Sequenz. Davon stimmte bei 87 Cosmiden die gefundene Distanz auf dem *E. coli* EDL933-Chromosom mit der wahren Insertgröße von etwa 40 Kb überein. Drei Cosmide wiesen eine größere Distanz (50, 86 und 100 Kb) und drei Cosmide eine kleinere Distanz (18, 31 und 34 Kb) auf. In Abbildung D-1.1. sind diejenigen Bereiche in der *E. coli* EDL933-Genomsequenz illustriert, die den 93 Cosmid-Insertfragmenten entsprechen. Die dargestellten Cosmid-Insert-Bereiche deuten nur auf den wahrscheinlichen Genbereich im *E. coli* EDL933-Genom hin. Aufgrund des nur sehr geringen sequenzierten Areals am Anfang und Ende der jeweiligen Insertfragmente ist keine vollständige Homologie des Fragmentes mit dem *E. coli* EDL933-Chromosom erwiesen. Dennoch kann aus der Übereinstimmung der Fragmentgröße mit dem Abstand auf dem *E. coli* EDL933-Genom davon ausgegangen werden, dass jene *E. coli*

493/89-Fragmente mit der *E. coli* EDL933-Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit identisch oder zumindest ähnlich sind.

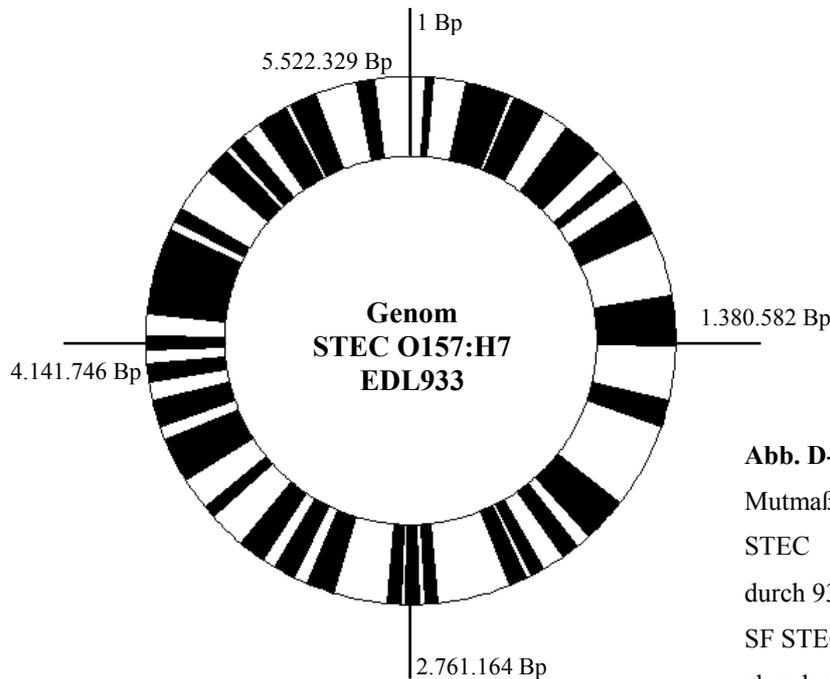


Abb. D-1.1.:

Mutmaßliche Bereiche (schwarz) im STEC O157:H7 EDL933-Genom, die durch 93 Cosmid-Insertfragmente des SF STEC O157:H7 -Stammes 493/89 abgedeckt werden.

Neben den Fragmenten mit Identitäten zur chromosomalen *E. coli* EDL933-Sequenz konnten auch 22 Cosmid-Insertfragmente identifiziert werden, welche Homologie zu Plasmidsequenzen aufweisen, unter anderem zu den Sequenzen der Plasmide pO157 (Accession-Nr. AF074613) und R100 (Accession-Nr. AP000342). Unter den 300 Cosmid-Isolaten befanden sich 54 Cosmide, die nur auf einem Ende sequenziert werden konnten. Davon besaßen zwei Cosmide zum Zeitpunkt des Vergleichs keinerlei Homologie zu den vorhandenen Sequenzen in der Datenbank. Die bisher noch nicht erwähnten restlichen 112 der 300 Cosmid-Isolate lieferten nur ungenügend Cosmid-DNA oder ergaben schlechte Sequenziererergebnisse. Aufgrund der ausreichend vorhandenen Datenmenge und der Anwendung anderer Vergleichsmethoden wurden weitere Cosmid-Isolationen nicht weiter vorgenommen. Die Ergebnisse aller 188 Cosmidinsertsequenzen sind im Anhang, Tabellen G-I.1. bis G-I.4. aufgelistet.

1.1. Subklonierung interessanter Cosmidinsert-Fragmente

Von großem Interesse waren jene Cosmid-Insertfragmente, bei denen an einem Fragmentende keinerlei Homologie mit der *E. coli* EDL933-Sequenz vorhanden ist. Um diese Fragmente näher zu charakterisieren, wurden diese subkloniert und weiter sequenziert. Auf diese Weise konnten spezifische Sequenzen detektiert werden, die nicht in dem Genom von *E. coli*

EDL933 und dem bisher anderen vollständig sequenzierten STEC O157:H7-Stamm RIMD 0509952 (Accession-Nr. NC_002695) [Hayashi *et al.*, 2001] vorhanden sind. Zwei Sequenzen weisen Homologien zur Sequenz des Laborstammes *E. coli* K-12 (Accession-Nr. NC_000913, bzw. AE000111 bis AE000510) auf (Tabelle D-1.1.) und konnten im Fortgang weiterer Subklonierungen in zwei anderen Cosmid-Isolaten nachgewiesen werden. Neben einem vermutlichen Regulator der Transkription wird eine mögliche Protease auf jenen Sequenzen kodiert. Die *E. coli* K-12-Sequenz, auf der die Protease kodiert ist, besitzt ebenso Homologien zu einer Sequenz des kürzlich veröffentlichten kompletten Genoms von *Shigella flexneri 2a*-Stamm 301 (Accession-Nr. NC_004337) [Jin *et al.*, 2002]. Die Identität der beiden *E. coli* 493/89-Sequenzen beträgt sowohl zur *E. coli* K-12- als auch zur *Shigella flexneri 2a*-Sequenz 96 %.

Auf der Endsequenz eines weiteren Cosmid-Insertfragmentes wurden Bereiche mit Homologien zur Sequenz des Bakteriophagen P27 (Accession-Nr. AJ298298) gefunden. Ein Bereich (1,5 Kb) kodiert für eine Serinprotease und ein anderer (0,6 Kb) für ein Repressor-Protein. Da sowohl die *E. coli* K-12-, die *Shigella flexneri 2a*- als auch die Bakteriophagen P27-Sequenzen keinen Hinweis auf zusätzlich vorhandene Virulenz-assoziierte Bereiche ergaben, wurde eine weitere Charakterisierung nicht verfolgt.

Tab. D-1.1.: Nukleotid- und Protein-Homologien von drei Cosmid-Insertfragmenten, die keine Homologie zu den STEC O157:H7-Stämmen EDL933 und RIMD 0509952 aufweisen.

Größe des sequenzierten Fragmentes	Nucleotidhomologie		Aminosäurehomologie			
		Accession-Nr.	Identität		Protein-Id.	Identität
4 Kb	<i>E.coli</i> K-12 MG 1655, Sektion 105 von 400	AE000215	97 %	vermutlicher Regulator der Transkription	AAC74246	99 %
2,4 Kb			96 %	vermutlich Protease	AAC74252	93 %
7 Kb	teilweise Bakteriophage P27	AJ298298	92 %	Serinprotease	NP_543057	97 %
				Repressorprotein (Regulatorprotein CI des Phagen HK022)	CAA34222	36 %

Bei den zuvor erwähnten drei Cosmiden, deren Insertend-Sequenzen einen wesentlich kürzeren Abstand auf dem *E. coli* EDL933-Chromosom besitzen, als er durch die wahre Insertgröße vorgegeben ist, kann zusätzliche DNA erwartet werden. Jene DNA wird in dieser Weise nicht im *E. coli* EDL933-Genom präsent sein. Durch Subklonierung konnte in einem

der drei Cosmid-Insertfragmente ein Sequenzbereich identifiziert werden, der nicht auf dem *E. coli* EDL933-Chromosom vorhanden ist. Die Subklone der beiden anderen Insertfragmente wiesen an ihren Fragmentenden hingegen lediglich Homologien mit dem *E. coli* EDL933-Genom auf.

1.2. Charakterisierung eines 8,8 Kb spezifischen SF STEC O157:H⁻-Fragmentes

Der durch Subklonierung gefundene *E. coli* 493/89-spezifische Bereich konnte durch weitergehende Sequenzierung vollständig charakterisiert werden. Von dem entsprechenden Cosmid-Insertfragment wurden einmalig 19,9 Kb durchgängig sequenziert. Dies erbrachte einen 8,8 Kb großen Bereich, der keine Homologien zu *E. coli* EDL933 und RIMD 0509952 aufweist. In Abbildung D-1.2. sind die Anordnung der auf dieser Sequenz präsenten offenen Leserahmen (Open Reading Frames, ORFs) und die Nukleotidhomologien dargestellt. Mehrere Bereiche weisen Homologien zu der DNA-Sequenz einer Pathogenitätsinsel (PAI) auf, die in *Shigella flexneri* 2a-Stamm YSH6000 identifiziert werden konnte (Accession-Nr. AF326777) [Turner *et al.*, 2001]. Diese 66 Kb große PAI kodiert für Antibiotika-Resistenzgene gegen Streptomycin, Ampicillin, Chloramphenicol und Tetrazyklin und wird daher als *Shigella* Resistance Locus PAI (SRL-PAI) bezeichnet. Neben der multiplen Antibiotikaresistenz ist auf der SRL-PAI ein Gencluster für ein Eisen-Dicitrat-Aufnahmesystem kodiert, welches als *fec* (ferric dicitrate uptake system) bezeichnet wird [Luck *et al.*, 2001]. Die Antibiotikaresistenz ist auf den ORFs 10 bis 22 der 59 ORFs umfassenden PAI kodiert. Der *Fec*-Cluster ist in den ORFs 26 bis 33 zu finden. Für sieben offene Leserahmen der *E. coli* 493/89-Sequenz ergeben sich Identitäten zu den ORFs 38, 39, 41, 42, 46 und 48 der SRL-PAI. Die ermittelte Identität liegt zwischen 88 und 97 %. Die Reihenfolge und der Abstand der auf dem Stamm 493/89 gefundenen SRL-PAI-homologen ORFs sind mit den entsprechenden ORFs in der SRL-PAI vergleichbar. Bisher konnte nur für zwei jener sechs ORFs der SRL-PAI eine Funktion bestimmt werden. ORF 41 ist ähnlich zu *Vis*, einem Protein, das eine Rolle in der späten Regulation der Bakteriophage P4 zu haben scheint [Polo *et al.*, 1996], und ORF 46 zeigt Ähnlichkeit zu *YfjP*, einem vermutlichen GTP-bindenden Protein [Blattner *et al.*, 1997]. Die Leserahmen 39 und 48 sind ebenso Bakteriophage P4-bezogen, die Leserahmen 46 und 48 weisen zusätzlich Homologien zur Sequenz der 933L-Prophage auf.

Die Nukleotidhomologien des 19,9 Kb großen Fragmentes geben ein verschachteltes Bild wieder (Abbildung D-1.2. unten). Der sich über 8,8 Kb erstreckende Bereich, der keine Homologien zu *E. coli* EDL933 besitzt, ist von zwei *E. coli* EDL933 Bereichen flankiert, die

zwar einen lokalen Bezug auf dem *E. coli* EDL933 Genom aufweisen, aber gegenläufig angeordnet sind. Die Endsequenzen des Cosmid-Insertfragments weisen hingegen auf einen *E. coli* EDL933-Bereich hin, der auf dem Genom weit entfernt dazu liegt. Um diesen Befund näher zu ergründen, wurde eine Shotgun-Genbank des entsprechenden Cosmides bei der AGOWA GmbH, Berlin hergestellt. Dabei konnten Shotgun-Klone identifiziert werden, deren Plasmidinsert den Übergang von der Sequenz des einen *E. coli* EDL933-Bereichs in die Sequenz des anderen *E. coli* EDL933-Bereiches erkennen lassen. Aufgrund dieser Sequenzen konnte eine mutmaßliche 39,6 Kb große Struktur des gesamten Cosmidinserts entworfen werden. In Abbildung D-1.2. ist diese Struktur unterhalb des durchgängig sequenzierten *E. coli* 493/89-Bereichs aufgeführt.

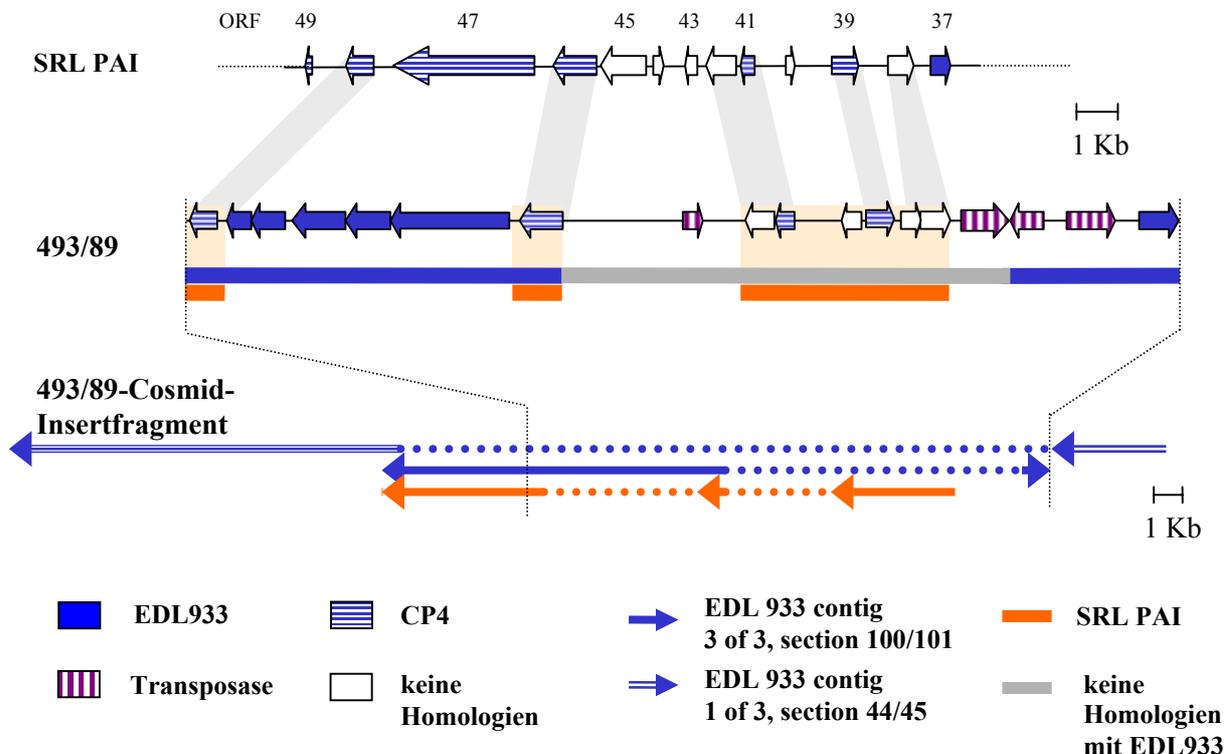


Abb. D-1.2.: Protein- und Nukleotid-Homologien eines 19,9 Kb großen durchgängig sequenzierten Fragments (Mitte) des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89. Darüber der Vergleich mit der SRL-PAI des *Shigella flexneri* 2a-Stamms YSH6000 und darunter die vermutliche Nucleotid-Homologie des entsprechenden Cosmid-Insertfragmentes.

Ein 17 Kb großes Fragment mit Homologie zu einem *E. coli* EDL933-Bereich ist durch ein 22,6 Kb großes Fragment eines anderen *E. coli* EDL933-Bereichs „insertiert“. Dieser wiederum ist durch die 8,8 Kb große *E. coli* 493/89-spezifische Sequenz unterbrochen. Die 17 Kb große Sequenz, der „flankierende“ *E. coli* EDL933-Genombereich, kodiert unter anderem für einen mutmaßlichen Außenmembranrezeptor für Eisen oder Colicin, ein

penicillinbindendes Protein, eine Exonuklease und daneben für andere Stoffwechselproteine und hypothetische Proteine. Die 12,9 Kb große Sequenz, der „insertierende“ *E. coli* EDL933-Bereich, kodiert neben Transposase-assoziierten Proteinen in der Mehrzahl für Proteine mit bisher unbekannter Funktion. Neben den Nukleotidhomologien zu *E. coli* EDL933 sind auch partielle Homologien zur SRL-PAI Sequenz nachweisbar. Diese befinden sich im Bereich der acht SRL-PAI homologen offenen Leserahmen und bei einem großen Teilstück der „insertierenden“ *E. coli* EDL933-Sequenz. Die Identitäten des einfach 19,9 Kb durchgängig sequenzierten *E. coli* 493/89-Fragmentes mit den *E. coli* EDL933 Sequenzen liegen zwischen 90 und 99 %, die zu den SRL PAI Sequenzen zwischen 92 bis 98 %.

1.3. Southern Blot zur Überprüfung des Vorkommens von *fec*-Komponenten

Eine Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika, wie sie bei *Shigella flexneri* 2a-Stamm YSH6000 aufgrund der dort vorhandenen multiplen Antibiotikaresistenzgene in der SRL-PAI gegeben ist, ist bei dem SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 nicht zu beobachten. Dies deutet auf eine Abwesenheit der SRL-PAI trotz der genannten ORF-Befunde auf dem Stamm 493/89 hin. Um zu ermitteln, ob der *fec*-Gencluster auf dem *E. coli* 493/89-Genom präsent ist, wurde ein Southern Blot mit einer markierten 1442 Bp großen Sonde, die die Gene für den FecA-Präkursor und FecA abdeckt, durchgeführt. Beide Gene befinden sich in dem mittleren Bereich des 6256 Bp großen *fec*-Genclusters. In Abbildung D-1.3. ist ein Blot mit *Shigella flexneri* 2a-Stamm MT90 als Positiv- und STEC O157:H7-Stamm EDL933 als Negativ-Kontrolle dargestellt. Daneben wurde ein nicht weiter klassifiziertes *Shigella flexneri*-Isolat verwendet, das von dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg zur Verfügung gestellt wurde. Für *E. coli* EDL933 und das *Shigella flexneri*-Isolat wurden nur unspezifische Hybridisierungen beobachtet, bei SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 war das Ergebnis negativ. MT90 wies hingegen ein klar erkennbares *fecA*-enthaltendes Fragment auf.

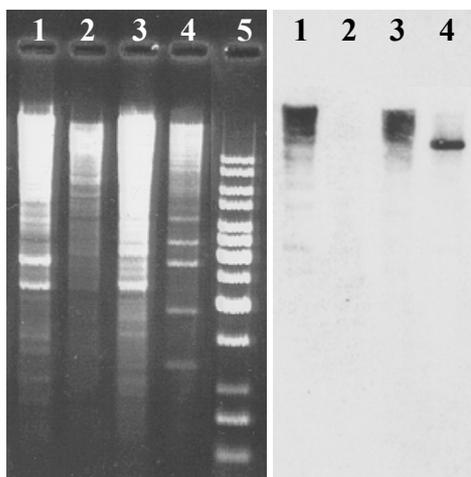


Abb. D-1.3.:

Southern Blot (rechts) mit *fec*-Fragment, links daneben elektrophoretische Auftrennung der entsprechenden mit *Hind*III restringierten chromosomalen DNA. 1: *Shigella flexneri*-Isolat, 2: STEC O157:H⁻-Stamm 493/89, 3: STEC O157:H7-Stamm EDL933, 4: *Shigella flexneri*-Stamm MT90, 5: DNA Ladder Gene Ruler (10 Kb bis 0,5 Kb).

Tab. D-1.2.: Verteilung der *E. coli* 493/89-spezifischen Sequenz in *E. coli* O157- und O55-Stämmen aufgrund von PCR-Ergebnissen mit drei verschiedenen Primer-Paaren.

Serotyp	Anzahl der Isolate	Anzahl der Isolate positiv für						Isolate von Patienten mit	
		493/89-spezif. Sequenz			<i>stx</i>	<i>eae</i>	SF	HUS	Diarrhöe
		PCR 1	PCR 2	PCR 3					
O157:H ⁻	10	10	10	10	10	10	10	9	1
O157:H7	10	0	0	0	10	10	0	6	4
O55:H7	2	0	0	0	0	2	2	0	2

2. Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)

Die Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) ist eine hocheffektive PCR-gestützte Methode, um Sequenzen zu identifizieren, welche auf einem Genom, dem „Tester“-Genom, präsent sind, aber auf einem anderen Genom, dem „Driver“-Genom, abwesend sind [Diatchenko *et al.*, 1996]. Die Mehrzahl der SSH-Studien wurde bei eukaryotischen Systemen angewendet, wobei der Schwerpunkt eher auf die differentielle Genexpression als auf Unterschiede zwischen Genomen gelegt wurde. In den wenigen Experimenten, bei denen diese Technik für die Analyse bakterieller Genome eingesetzt wurde, sind genomische Differenzen zwischen uropathogenen *E. coli* und *E. coli* K-12 [Janke *et al.*, 2001], neuartige Gene im Genom von *Salmonella typhimurium*, die abwesend in *Salmonella typhi* sind [Emmerth *et al.*, 1999; Morrow *et al.*, 1999] und das Kapsel-Polysaccharid von *Burkholderia pseudomallei* als ein wichtiger Virulenzfaktor [Reckseidler *et al.*, 2001] ermittelt worden. Des Weiteren konnte mit Hilfe dieser Technik eine große genomische Region, welche spezifisch für *Yersinia pestis* ist und zur Identifizierung dieser Spezies herangezogen werden kann, identifiziert werden [Radnedge *et al.*, 2001].

Die theoretischen Grundlagen und die Durchführung der Methodik ist im Experimententeil C-19.1. detailliert dargestellt.

2.1. Einfluß von Veränderungen der Reaktionsbedingungen auf das Ergebnis der SSH

Insgesamt wurden acht voneinander unabhängige Experimente mit SF STEC O157:H⁻ -Stamm 493/89 als Tester und STEC O157:H7-Stamm EDL933 als Driver durchgeführt. Um ein optimales Subtraktionsergebnis zu erhalten, wurden dabei verschiedene experimentelle

Bedingungen gewählt. Neben einem exakt nach Instruktionsbeschreibung durchgeführten Experiment, wurden die eingesetzten DNA-Mengen, die Zyklenzahl der suppressiven PCR und die Konzentration an $MgCl_2$ im PCR-Mastermix variiert. Bis auf das Experiment mit der veränderten $MgCl_2$ -Konzentration konnte jedoch keine entscheidende Optimierung des Subtraktionsergebnisses erzielt werden.

In Abbildung D-2.1. ist das Ergebnis eines Subtraktionsexperiments dargestellt, in welchem in der suppressiven PCR eine höhere $MgCl_2$ -Konzentration zur Anwendung kam als im Instruktionshandbuch empfohlen. Durch die Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM auf 2,5 mM konnte eine entscheidende Verbesserung des Ergebnisses erzielt werden und mehrere einzelne für *E. coli* 493/89 spezifische DNA-Banden sind nach der zweiten suppressiven PCR erkennbar (Abb. D-2.1., 2B) Die Bestätigung der *E. coli* 493/89-spezifischen Fragmente wurde durch zwei unterschiedliche Methoden gewährleistet, zum einen durch Sequenzierungs-Analyse und zum anderen mittels Makroarray.

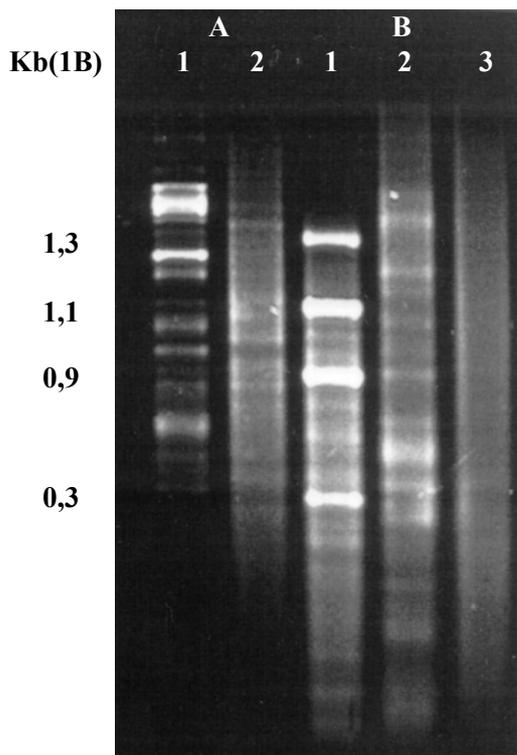


Abb. D-2.1.:

1,5 %-Agarose/EtBr-Gel der primären (A) und sekundären (B) PCR-Amplifikation eines subtraktiven Hybridisierungsexperimentes.

1: Kontroll-DNA des SSH-Kits mit Fragmentgrößen (1B),
2: 493/89 vs. EDL933, 3: Nicht subtrahierte Negativkontrolle.

2.2. Durch SSH von *E. coli* 493/89 vs. *E. coli* EDL933 ermittelte spezifische Fragmente

Insgesamt konnten 21 unterschiedliche 475 bis 1187 Kb große Fragmente nachgewiesen werden, deren Sequenzen in *E. coli* 493/89 vorhanden sind und in *E. coli* EDL933 fehlen. In

Tabelle D-2.1. sind die Fragmente und die entsprechend ermittelten Nukleotidhomologien zusammengestellt.

Tabelle D-2.1.: Durch subtraktive Hybridisierung gefundene *E. coli* 493/89-spezifische Fragmente, die nicht in *E. coli* EDL933 präsent sind. Angegeben sind die Nukleotidhomologien, die Größe der Identität und das vermutliche Genprodukt. Die Fragmente sind nach ihren *efal*-, *E. coli* K-12-, Bakteriophagen-, und Plasmid-Homologien eingeteilt.

Fragment	Homologie	GenBank Accessionno.	Bereich in Referenzsequenz	Sequenz- Identität	Genprodukt/ Funktion
S1-9	<i>efal</i>	AF159462	8369-7782	97%	Efa1 / Adhärenz
S5-91	<i>efal</i>	AF159462	1747-2454	98%	Efa1 / Adhärenz
S7-23	<i>efal</i>	AF159462	3167-3898	99%	Efa1 / Adhärenz
S1-10	<i>E. coli</i> K-12	AE000381	6394-5801	98%	ORF B2981 / unbekannt
S1-17	<i>E. coli</i> K-12	AE000252	1154-598	98%	YdfK / unbekannt
S1-4	<i>E. coli</i> K-12	AE000254	98-650	95%	RspB / "starvation sensitive protein"
S5-1	<i>E. coli</i> K-12	AE000499	624-1099	95%	IS911B (partiell) / IS-Phage, Transposon- bezogene Funktionen
S5-12	<i>E. coli</i> K-12	AE000237	6618-7059	99%	IS30 /Transposon- bezogene Funktionen
Ss2	<i>E. coli</i> K-12	AE000215	5466-6653	97%	YcgZ / unbekannt
S5-89	<i>E. coli</i> K-12	AE000218	8484-7733	95%	B1201 "sensor type regulator"
S5-18	Bakterio- phage λ	NC_001416	39404-38690	97%	„O“ / DNA Replikation
S6-17	Bacterio- phage P2	NC_001895	6230-6933	97%	essentielles Phagenschwanz Gen "Y" / Wirtszell-Lyse
S5-60	Bacterio- phage P2 / EDL933	NC_001895/ AE005579	22188-21980/ 10375-9900	95%	"T" / essentielles Phagenschwanz-Protein; vermutlich die Länge betreffend
S5-80	Bacterio- phage λ	NC_001416	30813-30095	95%	ea22 / unbekannt
S5-19	pSFO157:H	AF228759	29456-28816	97%	IS100 (unvollständig)
S5-23	pSFO157:H	AF228759	13454-12837	98%	Tn2501 –Transposon (unvollständig)
S5-25	pSFO157:H	AF228759	22817-22314	99%	nicht kodiert
S6-2	pSFO157:H	AF228759	8527-9292	98%	RepA1 / unbekannt
S5-21	F-Plasmid, genomische DNA	AP001918	81225-80507	96%	TraN / Stabilisierung von „mating pairs“
S6-8	Plasmid F	NC_002483	53131-52446	98%	FinO / direct repeat YfcA, yfcB
S5-90	PlasmidF	NC_002483	48833-48309	98%	IncB / direct repeat

Neben sieben Homologien zu Plasmid- und fünf Homologien zu Phagensequenzen wurden sieben Sequenzen mit Homologien zu *E. coli* K-12 ermittelt. Diese Homologien liegen auf dem *E. coli* K-12-Chromosom in fünf verschiedenen Bereichen vor, welche mindestens 150 Kb entfernt voneinander liegen. Die *E. coli* K-12-homologen Sequenzen der *E. coli* 493/89-Fragmente S1-10 und S5-89 befinden sich auch auf dem *Shigella flexneri 2a* Stamm 301. Die Identität beider Fragmente zu *E. coli* K-12 und *Shigella flexneri 2a* Stamm 301 ist jeweils gleich hoch. Von besonderem Interesse waren drei Fragmente, die Homologien zu einem in STEC O111 entdeckten Adhärenzfaktor *efal*, dem EHEC factor of adherence, aufweisen. Die Fragmente der Experimente 1 bis 3 wurden mittels Southern Blot mit markierten PCR-Produkten der sequenzierten Fragmente als spezifisch für *E. coli* 493/89 nachgewiesen und sind in der Fragmentbezeichnung als S1, S2 und S3 vermerkt. Die Fragmente der restlichen fünf Experimente wurden mittels Makroarray als spezifisch für *E. coli* 493/89 bestätigt. Nach acht auf unterschiedliche Weise durchgeführten subtraktiven Experimenten konnten keine zusätzlichen neuen spezifischen Tester-Fragmente detektiert werden und es wurden keine weiterführenden Experimente mehr vorgenommen.

2.3. Detektierung des gesamten offenen Leserahmens für *efal/lifA*

Drei spezifische *E. coli* 493/89-Fragmente der subtraktiven Hybridisierung wiesen Homologien zu drei unterschiedlichen Bereichen des offenen Leserahmens für *efal* auf. Dieser Leserahmen wurde in STEC O111:H⁻-Stamm E45035 als essentiell für die Adhärenz an Epithelzellen erkannt [Nicholls *et al.*, 2000]. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde der gleiche Leserahmen in EPEC O127:H6-Stamm E45035 aufgrund seiner Lymphozyten hemmenden Eigenschaften als Lymphostatin (*lifA*) benannt [Klapproth *et al.*, 2000]. Im Folgenden wird daher von dem ORF *efal/lifA* gesprochen. Um den Befund weiter zu konkretisieren, wurde versucht, ein Cosmid der *E. coli* 493/89-Genbank zu identifizieren, welches die *efal/lifA*-Sequenz auf dessen Insertfragment trägt. Dies erfolgte über eine PCR, welches einen spezifischen *efal/lifA*-Bereich amplifiziert. Da die *efal/lifA*-Sequenzen der drei gefundenen SSH-Fragmente keine verwertbaren PCR-Primer lieferten, so dass ein repräsentatives PCR-Fragment hätte amplifiziert werden können, wurde auf die publizierte *efal*-Sequenz zurückgegriffen (Accession-Nr. AF159462). Dabei wurde ein Primerpaar gewählt, welches in der Nähe eines der drei subtraktiven Fragmente auf der *efal*-Sequenz liegt. Zum Screening der Cosmid-Genbank wurden jeweils zehn DNA-Isolate der bisher geprüften Cosmid-Klone gemischt und auf Anwesenheit des Gens geprüft. Eine der so erhaltenen 15 Mischungen zeigte ein positives Ergebnis. Die zehn Isolate dieser Mischung

wurden einzeln geprüft und nachfolgend konnte ein Cosmid gefunden werden, welches die *efal/lifA*-Sequenz besitzt. Das Cosmid-Insertfragment gibt aufgrund seiner beiden Endsequenzen Hinweise auf einen 36,8 Kb großen *E. coli* EDL933-Bereich (Accession-Nr. AE005525 bis AE005528). In diesem Bereich befinden sich O-island #121 und #122, welche nicht in *E. coli* K-12 vorhanden sind. Das Cosmid wurde subkloniert und anschließend konnten die flankierenden Bereiche des *efal/lifA*-ORF sequenziert werden. Vektoren der Subklone, deren Insert einen großen Teil *efal/lifA*-Sequenz enthielten, verloren das Insert während einer kurzen Lagerungszeit. Diese Beobachtung ist bereits von einer anderen Arbeitsgruppe gemacht worden [Nicholls *et al.*, 2000]. Der gleiche Effekt trat ebenso bei dem Cosmid der Genbank auf. Daher wurden zur Sequenzierung der kompletten *efal/lifA*-Sequenz drei etwa 4 bis 4,5 Kb große PCR-Produkte verwendet. Für deren Amplifizierung wurden erneut Primer eingesetzt, die aus der publizierten *efal*-Sequenz generiert wurden. Auf diese Weise konnte eine durchgängig sequenzierte 12.080 Bp große Sequenz erhalten werden, die den 9.669 Bp großen *efal/lifA*-ORF enthält. Er zeigt jeweils 99,9 % Identität zu dem *efal*-ORF von STEC O111:H⁻-Stamm E45035 (Accession-Nr. AF159462) und zu *lifA* von EPEC O127:H6-Stamm E2348/69 (Accession-Nr. AJ133705). In Abbildung D-2.2.A ist ein Vergleich der drei Nukleotid-Sequenzen miteinander dargestellt. Acht der 9.669 Nukleotide dieses ORFs zeigen Unterschiede zwischen Stamm 493/89 und dem *efal*-ORF von Stamm E45035, aber nur drei dieser Unterschiede verursachen einen Austausch von Aminosäuren innerhalb der jeweils kodierten Proteine. Zu dem *lifA*-ORF konnten elf Unterschiede in Stamm 493/89 bestimmt werden, welche sechs Differenzen in der Zusammensetzung der Aminosäuren bewirken. Diese Abweichungen in der Nukleotidsequenz sind in Abbildung D-2.2.A markiert und wurden durch fünf unabhängig durchgeführte Sequenzierungen bestätigt. Im 3'-Ende des ORF ist ein kleines Areal, auf welchem sich mehrere Unterschiede befinden. Allein fünf der elf Unterschiede zwischen *efal* und 493/89-*efal/lifA* und drei der acht Abweichungen zwischen *lifA* und 493/89-*efal/lifA* befinden sich in diesem 252 Bp großen Areal. Die restlichen Unterschiede sind gleichmäßig über die ORF-Sequenz verteilt. Insgesamt gibt sich ein hoher Konservierungsgrad des ORFs zu erkennen.

2.4. Vergleich der *efal/lifA* Sequenz von *E. coli* 493/89 mit der von *E. coli* EDL933

STEC O157:H7-Stamm EDL933 besitzt nur etwa ein Drittel des *efal/lifA*-ORFs. Die Lokalisation des spezifischen SF STEC O157:H⁻-Bereichs ist in Abbildung D-2.2.B gezeigt. Zu STEC O157:H7 –Stamm EDL933 ist nur der Beginn und das Ende des 12 Kb großen

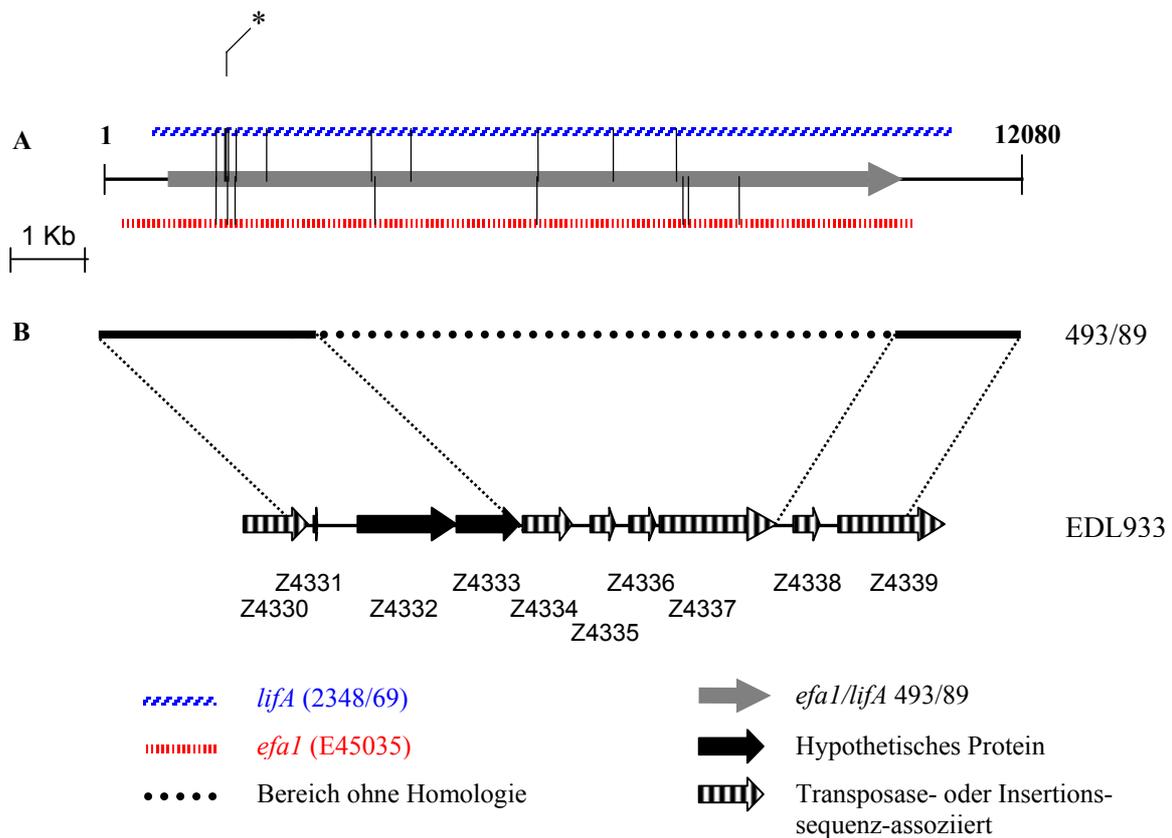


Abb. D-2.2.: Position von *efa1/lifA* innerhalb des 12 Kb großen sequenzierten Fragmentes des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89. Im Vergleich dazu ist *efa1* des STEC O111:H⁻-Stammes E45035 und *lifA* von EPEC O127:H6-Stamm 2348/96 (A) und die entsprechende chromosomale Region von STEC O157:H7-Stamm EDL933 (B) dargestellt.

Unterschiede in der Nukleotidzusammensetzung sind über und unter dem *efa1/lifA*-ORF gekennzeichnet. Der Asterisk demonstriert einen Bereich, in dem drei Unterschiede zu *lifA* innerhalb einer 40-Basensequenz auftreten.

E. coli 493/89-Fragmentes homolog. Der Bereich ohne Homologie ist 7,6 kB groß, *E. coli* EDL933 besitzt daher ein nur 2,1 Kb großes *efa1/lifA*-Restfragment. Direkt benachbart zu diesem Restfragment befindet sich in 5'-Richtung auf dem *E. coli* EDL933-Genom ein 3,4 Kb großer Bereich, welcher vier offene Leserahmen enthält (Z4330 to Z4339), die für Transposasen oder Insertionssequenzen kodieren.

2.5. Vorkommen von *efa1/lifA* in anderen SF STEC O157:H⁻ und STEC O157:H7-Stämmen

Nach dem Befund der Präsenz des kompletten *efa1/lifA*-Leserahmens in SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 und des Fehlens eines großen Bereichs davon in STEC O157:H7-Stamm EDL933 ergibt sich die Fragestellung, ob dies auch für andere Stämme des gleichen Serotyps

3. Genomvergleich mittels *E. coli* K-12-Makroarray-Methode

Eine andere Möglichkeit, die genetische Diversität zweier Stämme zu bestimmen, ist die Hybridisierung mit spezifischen DNA-Arrays. Mittels eines Arrays kann eine große Anzahl DNA-Proben gleichzeitig daraufhin geprüft werden, ob diese auf der zu testenden DNA vorhanden sind oder nicht. In einem einzigen Versuchsansatz kann somit ein Genom von Interesse auf die Präsenz einer Vielzahl von DNA-Fragmenten eines anderen Genomes getestet werden. Neben der Makroarraymethodik, bei der radioaktiv markierte DNA mit auf Nylonmembranen fixierter DNA hybridisiert wird, gewinnt die Microarray-Technik zunehmend an Bedeutung. Bei Letzterer werden Tausende einzelner Proben auf einer kleinen Glasfläche fixiert und erlauben somit die gleichzeitige Analyse einer noch größeren Probenanzahl als bei einem Makroarray. Die Auswertung erfolgt im Gegensatz zu den Makroarrays fluorimetrisch nach Markierung der zu testenden DNA mit fluoreszierenden Verbindungen. Vorwiegend werden Expressionsanalysen mit Hilfe der Arraytechnik durchgeführt, um beispielsweise die Auf- oder Abregulierung bestimmter Gene bei ausgewählten Umgebungsbedingungen zu analysieren [Weber und Jung, 2002]. Aufgrund der immer größer werdenden Anzahl kompletter Genomsequenzen von bedeutenden pathogenen Organismen wird zunehmend aber auch der Genomvergleich von Pathovaren untereinander über einen Array durchgeführt [Fitzgerald und Musser, 2001].

Zum Zeitpunkt des hier beschriebenen Versuchsansatzes war das komplette Genom des *E. coli*-Laborstammes K-12 als Makroarray kommerziell erhältlich. Auf diesem sind alle übersetzbaren 4290 offenen Leserahmen des Chromosoms in einem bestimmten Muster auf einer Nylonmembran in Form von etwa 1 mm großen kreisrunden Spots untergebracht. Es wird davon ausgegangen, dass der *E. coli* K-12-Stamm und die beiden zu vergleichenden STEC O157-Serotypen vor 4,5 Millionen Jahren einen gemeinsamen Vorläufer hatten [Reid *et al.*, 2000]. Bezüglich der Ähnlichkeit dieser drei Stämme sind daher weiterführende Erkenntnisse von einem Vergleich der beiden jeweiligen STEC O157-Hybridisierungsmuster mit dem *E. coli* K-12-Array zu erwarten. Obwohl neben dem *E. coli* K-12-Genom auch das Genom des STEC O157:H7-Stammes EDL933 vollständig sequenziert worden ist, wurde ebenfalls für diesen Stamm ein Makroarray durchgeführt. Somit wurden Ergebnisse erhalten, die unter gleichen Bedingungen ermittelt wurden und daher besser vergleichbar sind. Die Auswertung der Spots erfolgte zunächst mit Hilfe einer Software (ArrayVision™, Imaging Research, St. Catharines, Kanada). Hierbei wurden jene Spots identifiziert, die ein schwächeres oder gleich starkes Hybridisierungssignal wie der Hintergrund außerhalb der

Spotbereiche ergaben. Um Artefakte auszuschließen, wurden vier eigenständige Ansätze ausgewertet und diejenigen ORFs als fehlend bewertet, welche in mindestens drei dieser Ansätze Signale mit gleicher oder schwächerer Intensität als der Hintergrund lieferten. Zur weiteren Absicherung wurden alle auf diese Weise ermittelten Spots noch einmal visuell überprüft. In Abbildung D-3.1. ist ein kompletter Makroarray mit herausgestellter Detailansicht gezeigt. Jeder ORF des *E. coli*-K-12-Chromosoms ist als Doppelspot auf der Membran vorhanden. Beispielhaft sind die beiden Spots markiert, die ein negatives Signal für das *fec*-Operon *fecR* des *fec*-Clusters, welches für das Zitrat-abhängige Eisentransport-System in *E. coli* K-12 kodiert, ergaben.

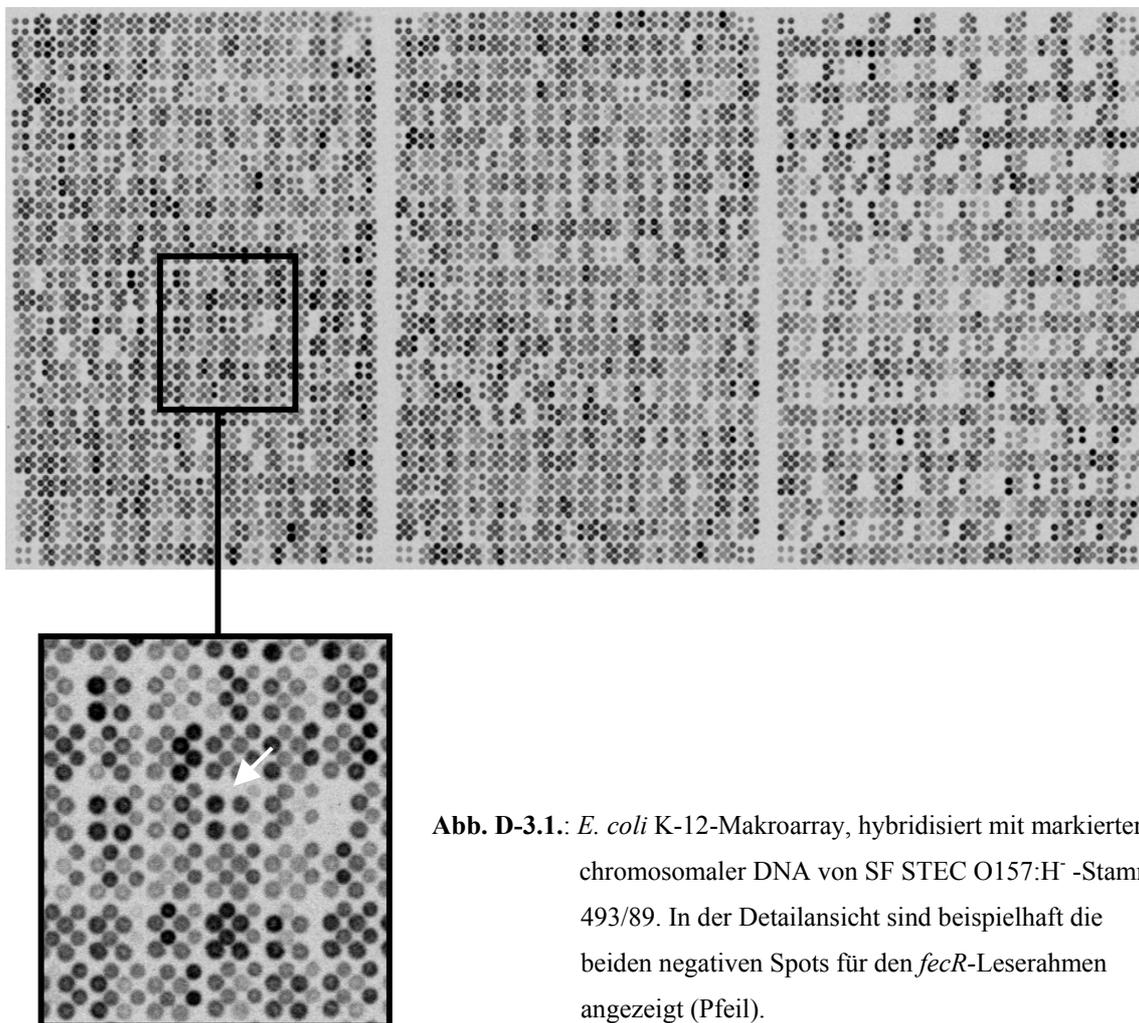


Abb. D-3.1: *E. coli* K-12-Makroarray, hybridisiert mit markierter chromosomaler DNA von SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89. In der Detailansicht sind beispielhaft die beiden negativen Spots für den *fecR*-Leserahmen angezeigt (Pfeil).

3.1. Anzahl nicht hybridisierter Spots für *E. coli* 493/89 und *E. coli* EDL933

Von den 4290 DNA-Proben des Arrays konnte bei STEC O157-Stamm EDL933 für 195 Proben kein erkennbares Hybridisierungssignal gefunden werden. Bei SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 ergaben 132 Proben ein derartig negatives Signal. Damit lagen hier etwa 30 %

weniger negative Signale als bei *E. coli* EDL933 vor. Von den 195 bzw. 132 Proben waren 92 Proben bei beiden Stämmen gleichermaßen negativ. Daraus resultieren 40 Proben, die bei Stamm 493/89 negativ waren, bei *E. coli* EDL933 jedoch ein positives Hybridisierungssignal zeigten. Im umgekehrten Falle ergaben sich 103 Proben, die nur bei *E. coli* EDL933 negative, bei *E. coli* 493/89 hingegen positive Ergebnisse lieferten. Im Anhang, Tabelle G-II.1. sind die 92 ORFs aufgelistet, die in beiden Stämmen gleichermaßen negative Hybridisierungsergebnisse lieferten.

3.2. Aufschlüsselung nach Funktionsklassen

In Tabelle D-3.1. sind die als negativ ermittelten *E. coli* K-12-Leserahmen der beiden getesteten O157-Stämme in Funktionsklassen unterteilt. Für den Hauptteil der ORFs ist bisher keine Funktion nachgewiesen worden, die kodierten Proteine sind lediglich hypothetischer Natur. Bei *E. coli* EDL933 beträgt dieser Anteil über 50 %. Bei den Genen mit bekannter Funktion ragt die Gruppe der für den Stoffwechsel verantwortlichen Gene heraus.

Tab. D-3.1.: Unterteilung der negativ ermittelten *E. coli* K-12-ORF in Funktionsklassen. In den rechten Spalten sind die für beide Stämme spezifischen fehlenden ORFs aufgeführt.

	Anzahl negativer Arrayspots					
	493/89 (Prozent)		EDL933 (Prozent)		nur 493/89 nicht EDL933	nur EDL933 nicht 493/89
Gesamt	132	(100)	195	(100)	40	103
Funktionsklasse						
Metabolismus	22	(16,6)	30	(15,4)	9	17
Transport/Sekretion	11	(8,3)	13	(6,7)	5	8
Fimbriensynthese	10	(7,6)	11	(5,6)	1	2
IS-bezogen	9	(6,8)	7	(3,6)	6	4
Regulation	8	(6,1)	16	(8,2)	1	9
DNA/RNA-Stoffwechsel	4	(3,0)	6	(3,1)	5	6
LPS Synthese	3	(2,3)	4	(2,1)	-	1
Zellwand/Zellteilung	3	(2,3)	4	(2,1)	-	1
Phagenbezogen	3	(2,3)	5	(2,6)	2	4
hypothetisch	59	(44,7)	99	(50,8)	11	51

In beiden O157-Stämmen sind ca. 16 % der fehlenden *E. coli* K-12-Gene mit dem Metabolismus assoziiert. Daneben können Gene für den Transport durch Membranen oder die Sekretion, für die Synthese von Fimbrien, Insertionssequenzen und Regulatorgene in einer bedeutenden Anzahl identifiziert werden. Zusätzlich, aber in geringerem Ausmaß, findet man Gene für die Synthese der Lipopolysaccharide (LPS), für den Zellwandaufbau bzw. der Zellteilung und mit Phagen in Zusammenhang stehende Leserahmen. Eine Vielzahl der Gene

fehlt in zusammenhängenden Clustern. Dies verdeutlichen auch die Tabellen D-3.2. und D-3.3. Hier sind die jeweils in beiden Stämmen spezifisch fehlenden Gene aufgelistet, deren Funktion bekannt ist. Im Anhang, Tabelle G-II.2. sind die ORFs, deren Funktion bislang noch unbekannt ist, aufgelistet. Für *E. coli* EDL933 konnten acht für den Phosphonatmetabolismus verantwortliche Gene identifiziert werden, die nur auf *E. coli* EDL933 fehlen, in *E. coli* 493/89 hingegen vorhanden sind. Von dem für den Phenyllessigsäure-Abbau kodierenden *ydb*-Gencluster sind in *E. coli* EDL933 insgesamt sieben Gene nicht vorhanden, doch nur vier davon fehlen spezifisch für diesen Stamm, drei fehlen sowohl in *E. coli* EDL933 als auch in *E. coli* 493/89. Ebenso in beiden Stämmen fehlen größere Bestandteile des *yad*-, *rfa*- und *fec*-Clusters. Die Gene des *yad*-Clusters kodieren vermutlich für fimbrielle Proteine, die *rfa*-Leserahmen sind für die Lipopolysaccharidhüllen-Biosynthese verantwortlich und *fec* kodiert das Zitronensäure abhängige Eisenaufnahmesystem. Wie der Tabelle D-3.3. zu entnehmen ist, fehlen in STEC O157:H7-Stamm EDL933 mehr Gene des *yad*- und *rfa*-Clusters als in SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89.

Tab. D-3.2.: Durch den *E. coli* K-12-Makroarray ermittelte in SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 spezifisch fehlende Leserahmen, die in STEC O157:H7–Stamm EDL933 vorhanden sind.

Genbezeichnung	Funktion
	<i>alpA</i> Prophage CP4-57-Regulatorprotein AlpA
	b2352 vermutlich Ligase
	b2970, <i>yheE</i> vermutlich allgemeiner Sekretionsweg für Protein-Export
	<i>hisL</i> <i>his</i> -Operonpeptid
	<i>hofD</i> integrales Membran Protein (Peptidase)
	<i>hsdR</i> Endonuklease R
<i>insA_1, insA_3, insA_5, insA_7, insB_6</i>	IS1 Proteine InsA und InsB
	<i>lasT</i> vermutlich Methyltransferase
	<i>pheM</i> Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (<i>pheST</i>)-Operon-Peptid
	<i>pshM</i> vermutlich allgemeine Sekretion
	<i>tpr</i> Protamin-ähnliches Protein
	<i>yagD, yagE</i> Methyltransferase; mutmaßliche Lyase
	<i>ycbU</i> (b0557) Bakteriophage lambda Bor-Protein-ähnlich
	<i>ycdV</i> (b1031) vermutlich ribosomales Protein
	<i>yghD</i> vermutlich Protein für Sekretionsweg
	<i>ygiL</i> vermutlich Fimbrien-Protein
	yi52_11 IS5 Protein 11, Transposonbezogen
	<i>viaR</i> L-Xylose-5-Phosphat-3-Epimerase
	<i>yjcW</i> vermutlich ATP-bindende Komponente eines Transportsystems
	<i>yjgU, yjgV</i> Gluconat-5-Reduktase; Idonat-5-Dehydrogenase
	<i>yjhK, yjhN</i> vermutlich Pentose-5-phosphat-3-Epimerase; vermutlich Phosphotransferase Enzym IIC

Tab. D-3.3.: Durch den *E. coli* K-12-Makroarray ermittelte in STEC O157:H7–Stamm EDL933 spezifisch fehlende Leserahmen, die in SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 vorhanden sind.

Genbezeichnung	Funktion
	<i>arp</i> Regulator der Acetyl-CoA-Synthetase
	<i>atoA, atoD</i> Acetoacetyl-CoA Transferase Beta und Alpha-Untereinheiten
	b0298 vermutlich DNA-Replikationsfaktor
	b0669 vermutlich RNA
	b1374 vermutlich Transposon-Resolvase
	b1392 vermutlich Oxidoreduktase
	b1433 vermutlich Membran-Transportprotein
	<i>barA</i> Sensor-Regulator, aktiviert <i>OmpR</i> durch Phosphorylierung
	<i>feaR</i> (b1384) Regulatorprotein für 2-Phenylethylamin- Katabolismus
	<i>hipB</i> Regulatorprotein der Mureinsynthese
	<i>lar</i> für Restriktion bedeutsames Protein
	<i>mrr</i> Restriktion von methyliertem Adenin
	<i>ogrK</i> Prophage P2 Ogr Protein
<i>phnG, phnH, phnM, phnP</i>	Phosphonat-Metabolismus
<i>phnK, phnL, phnN</i>	ATP-bindende Komponenten des Phosphonat-Transports
	<i>phnO</i> vermutlicher Regulator des <i>phn</i> -Operons
	<i>pnp</i> Polynukleotid-Phosphorylase
	<i>relB, relE</i> negative Regulatoren der Translation
	<i>rfaY</i> Lipopolysaccharidhüllen-Biosynthese
	<i>rfbC</i> dTDP-6-Deoxy-D-Glucose-3,5 Epimerase
	<i>sieB</i> Phagen-Ausschleusungs-Protein
	<i>xapA</i> Xanthosinphosphorylase
	<i>yadK, yadN</i> vermutlich Fimbrienproteine
	<i>yagH</i> (b0271) vermutlich Beta-Xylosidase
	<i>ybdG</i> vermutlich Transport
	<i>ycgE</i> (b1162) vermutlicher Transkriptionsfaktor
	<i>ycgW</i> (b1160) Isoprenoid-Biosynthese
	<i>ydaD</i> Zerstörung der Rac-Prophage während zygotischer Induktion
	<i>ydaR</i> (b1356) Prophage Rac-Repressor
<i>ydbS</i> (b1393), b1398, b1399	Phenyllessigsäure-Abbau
	<i>yefJ</i> vermutlich Kreatinase
	<i>yffH</i> (b2623) vermutlich Histon
	<i>yffY</i> (b2644) vermutliches DNA-Reparaturprotein
	<i>yhcA</i> vermutlich Chaperon
	<i>yheA</i> Regulatorkomponente, komplexierend mit Bacterioferritin
	<i>yheH</i> vermutlich allgemeine Sekretion
<i>yi21_6</i> (b4272), <i>yi21_2</i>	IS2-hypothetische Proteine
	<i>yi5A</i> IS150-hypothetisches Protein
	<i>yaM</i> Membranpermease (Dehydroascorbat)
	<i>yjcV</i> vermutlich Permeaseprotein eines Transportsystems
	<i>yjhG</i> vermutlich Dehydratase

3.3. Vergleich des Hybridisierungsmusters

Bei der bisher beschriebenen Auswertung wurden nur ORFs erfaßt, die kein sichtbares Signal lieferten. Wie in Abbildung D-3.1. ersichtlich, ist bei zahlreichen Spots ein nur schwaches Signal vorhanden. Dies kann einerseits durch einen geringeren Anteil von Adenin in der entsprechenden DNA-Probe und daraus folgend einem geringeren Anteil an radioaktiv markiertem Adenosinphosphat in der Genomprobe erklärt werden. Andererseits ist als

Ursache eine nur unvollständige Hybridisierung zu nennen. Ein Genomfragment, das nicht der Sequenz des Arrayspots entspricht, kann aufgrund eines gemeinsamen kurzen Sequenzmotivs trotzdem mit dem DNA-Spot hybridisieren und ein falsch negatives Ergebnis hervorrufen. Diese DNA-Proben können also nicht für die Einordnung in fehlende oder vorhandene Spots mit einbezogen werden. Für die Auswertung anwendbar sind jedoch Spots, welche eine deutlich erkennbare unterschiedlich starke Hybridisierung in beiden Stämmen aufweisen. Auch wenn bei beiden Stämmen eine nur schwache Hybridisierung mit einer *E. coli* K-12-Probe erfolgt ist, kann ein Unterschied in der Spotintensität auf Differenzen in der DNA-Sequenz der beiden getesteten Stämmen schließen lassen. Aus diesem Grunde wurde für jeden der beiden Stämme ein repräsentativer der vier durchgeführten Arrays verwendet und bezüglich der Hybridisierungsstärke der 4290 Spots miteinander verglichen. So konnten 124 ORFs gefunden werden, die bei *E. coli* 493/89 um das zweifache stärker hybridisierten als bei *E. coli* EDL933. Das *E. coli* 493/89-Genom weist somit bezüglich dieser ORFs zu *E. coli* K-12 eine höhere Homologie auf als *E. coli* EDL933. Die Anzahl der bei *E. coli* EDL933 derart entsprechend stärker hybridisierten Spots im Vergleich zu *E. coli* 493/89 ist mit 74 erkennbar geringer. Sowohl dieses Hybridisierungsmuster als auch die Anzahl der fehlenden ORFs deuten an, dass das Genom des SF STEC O157:H⁻-Stamms 493/89 größere Gemeinsamkeiten mit *E. coli* K-12 aufweist als das STEC O157:H7 EDL933-Genom.

4. Vergleich der Ausstattung an Virulenz-assoziierten Genen mittels Makroarray-Methode

Nachdem mit Hilfe des *E. coli*-K-12-Makroarrays die Gene eines apathogenen *E. coli*-Stammes für den Vergleich von zwei pathogenen *E. coli*-Stämmen eingesetzt wurden, konnten durch Verwendung eines weiteren Makroarrays mehrere bekannte Virulenzfaktoren auf An- oder Abwesenheit überprüft werden. Für mehrere *E. coli* Stämme ist bereits eine Überprüfung auf Virulenzfaktoren mittels Microarray beschrieben worden [Chizhikov *et al.*, 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit kam ein im Institut für Infektionsbiologie, Würzburg, neu entwickelter *E. coli*- „Pathoarray“ zum Einsatz. Mit Hilfe dieses Arrays wurden mehrere pathogene und apathogene *E. coli*-Isolate auf die Präsenz von derzeit 456 mit Virulenz assoziierten DNA-Sequenzen getestet [Dobrindt *et al.*, 2003]. Neben 212 Proben, die spezifisch für auf fünf PAIs lokalisierten ORFs des Uropathogenen *E. coli* (UPEC) Stammes 536 sind, kamen 100 Virulenzgen-Proben anderer extraintestinaler pathogener *E. coli* zur

Anwendung. Typische virulenz-assoziierte Gene von intestinalen pathogenen *E. coli* (darunter EPEC, EHEC, EAEC, ETEC und EIEC) und *Shigella flexneri* sind mit einer Gesamtanzahl von 95 DNA-Proben vertreten. Etwa 300-400 Bp große PCR-Produkte wurden aus den Sequenzen dieser Virulenzgene generiert und in einem bestimmten Muster in Form von Doppelspots auf eine Nylonmembran gebracht und fixiert. Eine genaue Aufstellung der verwendeten Primer und deren Herkunftssequenz ist auf der Internethomepage <http://www.uni-wuerzburg.de/infektionsbiologie> zur Verfügung gestellt worden.

4.1. Vergleich der Hybridisierung von *E. coli* 493/89 mit der von *E. coli* EDL933

In Abbildung D-4.1. ist jeweils ein repräsentativer Pathoarray für SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 und STEC O157:H7-Stamm EDL933 dargestellt.

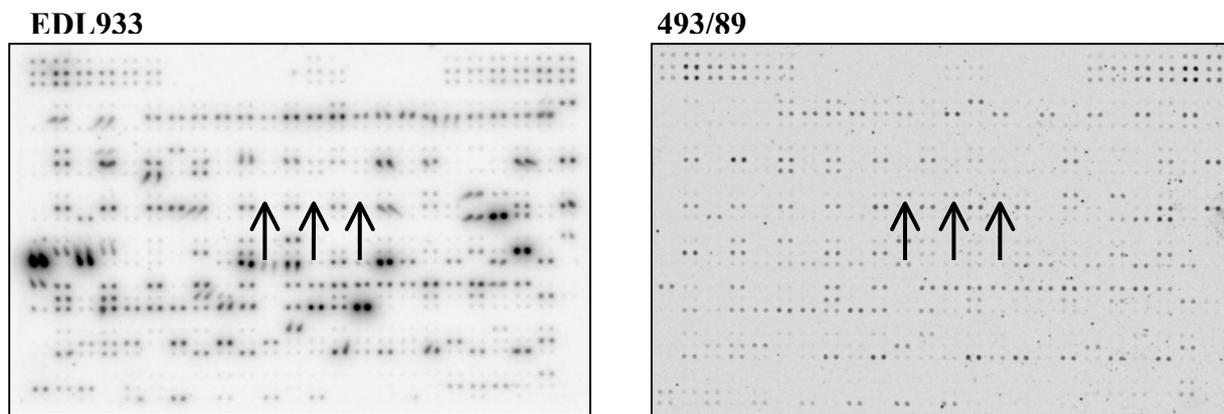


Abb. D-4.1.: Ergebnis jeweils einer Hybridisierung des Pathoarrays mit markierter genomischer DNA von STEC O157:H7-Stamm EDL933 und SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89. Mit Pfeilen herausgestellt sind die drei Doppelspots für die DNA-Proben von *cdtA*, *cdtB* und *cdtC*.

Als Beispiel für eine unterschiedliche Präsenz an Virulenzfaktoren sind die Arrayspots für das Cytolethale Distending Toxin (CDT), Gene A bis C (*cdtA*, *B*, *C*) herausgestellt. Die positiv hybridisierten Signale der Arrayspots für die Gene *stxI* und der für die Tellurit-Resistenz kodierenden Gene *tlr*, die in *E. coli* EDL933 positiv ausfielen, in *E. coli* 493/89 jedoch negativ, dienen als ein Beleg für eine korrekte Funktionsweise des Arrays, da die Abwesenheit dieser Gene in SF STEC O157:H⁻ bereits bekannt ist. Wie zuvor bei dem *E. coli*-K-12-Array wurden für Stamm 493/89 vier eigenständige Hybridisierungen vorgenommen. Aufgrund der bekannten Genomsequenz für STEC O157:H7-Stamm EDL933 wurden für den Vergleich nur zwei Arrays verwendet, die im Rahmen der Erprobung des Pathoarrays durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte aufgrund der niedrigen Spotanzahl und der guten Erkennbarkeit eines positiven Signals direkt visuell und ohne

Zuhilfenahme eines Softwareprogrammes. Auf diese Weise konnten für Stamm 493/89 89 positive DNA-Hybridisierungen festgestellt werden. Für den *E. coli* EDL933-Array lag die Anzahl mit 113 positiven Spots erkennbar höher. Während für *E. coli* EDL933 34 spezifische positive Arrayspots identifiziert werden konnten, die in *E. coli* 493/89 nicht vorhanden sind, fanden sich zehn Arrayspots, die nur für *E. coli* 493/89 positive Signale ergaben und nicht bei *E. coli* EDL933. In Tabelle D-4.1. sind die für den Stamm 493/89 und *E. coli* EDL933 jeweiligen spezifisch positiven Spots und deren Genfunktion im einzelnen aufgeführt. Die 79 für beide Stämme positiven Spots sind im Anhang, Tabelle G-III. aufgelistet. Auffallend sind die Unterschiede, die sich in den DNA-Sequenzen der Pathogenitätsinseln des UPEC-Stammes 536 zeigen. Während in *E. coli* 493/89 sechs spezifische uropathogene PAI-Sequenzen identifizierbar sind, findet man in *E. coli* EDL933 zwölf spezifische PAI-Sequenzen. Die Mehrzahl dieser Sequenzen kodiert für Transpositions-Proteine. Diese Proteine sind für die Mobilität von DNA-Elementen verantwortlich und sind daher für den horizontalen Gentransfer von großer Bedeutung. Daneben finden sich insbesondere in *E. coli* EDL933 zahlreiche einzelne Bestandteile von komplex zusammengesetzten Virulenzfaktoren, wie etwa Adhärenz- oder Adhäsions-Protein-kodierende Gene. Als ein potentieller Virulenzfaktor in *E. coli* 493/89, welcher den Makroarrayergebnissen zufolge nicht in *E. coli* EDL933 vorkommt, ist das Cytolethal Distending Toxin (CDT) zu nennen. Dieses Toxin setzt sich aus drei Proteinen zusammen, welche durch die drei Gene *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* kodiert werden.

Tab. D-4.1.: DNA-Sequenzen von Virulenz-assoziierten Genbereichen, die nur bei *E. coli* 493/89 bzw. EDL933 im Pathoarray positiv hybridisieren. Neben der Genbezeichnung ist die Pathogen-Kategorie, für die das Gen zuerst beschrieben wurde, die Accession-Nr. und die Funktion angegeben.

¹: ExPEC: mit extraintestinalen Erkrankungen assoziierte *E. coli*

²: APEC: Affenpathogene *E. coli* (Avian Pathogenic *E. coli*)

³: Sequenz noch nicht publiziert

Spezifisch für *E. coli* 493/89:

Genbezeichnung	Kategorie	Accession-Nr.	Funktion
<i>afa7</i>	ExPEC ¹	AF072901	nicht-fimbrielles Adhäsion 7
<i>cdt-III A</i>	ExPEC ¹	U89305	cytolethal distending toxin A
<i>cdt-III B</i>	ExPEC ¹	U89305	cytolethal distending toxin B
<i>cdt-III C</i>	ExPEC ¹	U89305	cytolethal distending toxin C
PAI I-ORF63	PAI1-UPEC 536	AJ488511	ORF A, IS100 Transposase
PAI I-ORF64	PAI1-UPEC 536	AJ488511	ORF B, IS100 Transposase
PAI III-ORF39	PAI3-UPEC 536	X16664	ORF A, IS100 Transposase
PAI III-ORF40	PAI3-UPEC 536	X16664	ORF B, IS100 Transposase
PAI III-ORF41	PAI3-UPEC 536	- ³	delta ORF51, IS679
PAI V-ORF 1	PAI5-UPEC 536	- ³	Kapsel536, Region2, K15

Spezifisch für EDL933:

Genbezeichnung	Kategorie	Accession-Nr.	Funktion
<i>afaB</i>	ExPEC ¹	X76688	nicht-fimbrielles Adhäsın
<i>afaD</i>	ExPEC ¹	X76688	nicht-fimbrielles Adhäsın
AIDA	<i>E. coli</i>	AE005276	Adhäsın, Autotransporter
<i>AstA</i>	EAEC	L11241	EAST1-Toxin
<i>bfpA</i>	EPEC	Z68186	Vorstufe einer Pilus-Untereinheit, Fimbrien-Typ V
<i>EspI</i>	EPEC	AJ278144	“EPEC secreted proteins”, Adhäsion
<i>espP</i>	EPEC	AF074613	“EPEC secreted proteins”, Adhäsion
<i>Iha</i>	EHEC	AF126104	Adhäsın
<i>ingA</i>	ETEC	AF004308	Typ IV-Pilus, Strukturgen
<i>katP</i>	EHEC	AF074613	Katalase/Peroxidase
PAI I ORF57	PAI1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I ORF68	PAI1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI II ORF68	PAI2-UPEC 536	AJ494981	vermutlich DNA-Transposition
PAI II ORF69	PAI2-UPEC 536	AJ494981	vermutlich DNA-Transposition
PAI II ORF72	PAI2-UPEC 536	AJ494981	ORF B, IS100 Transposase
PAI II ORF79	PAI2-UPEC 536	AJ494981	vermutlich DNA-Transkription
PAI II ORF88	PAI2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI III ORF6	PAI3-UPEC 536	X16664	unbekannt
PAI III ORF7	PAI3-UPEC 536	X16664	unbekannt
PAI III ORF43	PAI3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III ORF49	PAI3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III ORF52	PAI3-UPEC 536	- ³	ähnlich zu Sap (<i>Shigella flexneri 2a</i>)
<i>perA</i>	EPEC	Z48561	<i>eae</i> -Transkriptionsaktivator
<i>perB</i>	EPEC	Z48561	<i>eae</i> -Transkriptionsaktivator
<i>perC</i>	EPEC	Z48561	<i>eae</i> -Transkriptionsaktivator
Sap	<i>Shigella flexneri 2a</i>	AF200692	oberflächenlokalisiertes Autotransporterprotein
<i>shiD</i>	EIEC	AF141323	Colicin V Immunitätsprotein
<i>stx1a</i>	EHEC	AJ251325	Shiga Toxin 1a
<i>stx1b</i>	EHEC	AJ251325	Shiga Toxin 1b
<i>TlpD</i>	EHEC	AF126104	Tellurit-Resistenz-Protein D
<i>TlrA</i>	EHEC	AF126104	Tellurit-Resistenz-Protein A
<i>TlrB</i>	EHEC	AF126104	Tellurit-Resistenz-Protein B
<i>TlrC</i>	EHEC	AF126104	Tellurit-Resistenz-Protein C
<i>Tsh933</i>	APEC ²	AF218073	Temperatur-sensitives Hämagglutinin

Für jede DNA-Probe dieser drei Gene fiel das Hybridisierungssignal bei *E. coli* 493/89 positiv aus. Das Fehlen von *cdt* in der *E. coli* EDL933-Genomsequenz ist durch die negativen Signale der entsprechenden Spots bestätigt (Abbildung D-4.1.). Im Folgenden konnte dieser Befund weiter charakterisiert werden.

4.2. Identifizierung des Cytolethal Distending Toxins in *E. coli* 493/89

CDT wurde erstmals im Jahre 1987 in Diarrhöe-auslösenden *Escherichia coli* beschrieben [Johnson und Lior, 1987]. Seitdem konnte CDT auch in zahlreichen anderen Pathogenen, wie etwa *Campylobacter* spp. [Pickett *et al.*, 1996], *Shigella dysenteriae* [Okuda *et al.*, 1997],

Haemophilus ducreyi [Cope *et al.*, 1997], *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [Mayer *et al.*, 1999] und *Helicobacter hepaticus* [Young *et al.*, 2000] identifiziert werden. CDT bewirkt durch eine Blockade in der Phase der G2/M-Transition innerhalb des Zellzyklus eine Hemmung der Zellteilung eukaryotischer Zellen. Daraus resultiert eine charakteristisch veränderte Morphologie vergrößerter Zellen, die in ihrer Größe um ein vielfaches von der Normalgröße abweicht. Dieser Effekt konnte *in vitro* bei einigen Zelllinien, wie etwa HeLa, HEp-2, CHO, CaCo-2 oder T-Lymphozytenzellen beobachtet werden [Comayras *et al.*, 1997; Cortes-Bratti *et al.*, 1999; Aragon *et al.*, 1997; Whitehouse *et al.*, 1998; Shenker *et al.*, 1999]. Für *E. coli* sind bisher drei verwandte, aber nicht identische CDT-Sequenzen bekannt. Die entsprechenden Toxine wurden als CDT-I (*E. coli* O86:H34-Stamm 6468/62 [Scott und Kaper, 1994]), CDT-II (*E. coli* O128:H⁻-Stamm 9142-88 [Pickett *et al.*, 1994]) und CDT-III (*E. coli* O15:H21 Stamm S5 [Peres *et al.*, 1997]) deklariert. Die drei Polypeptide CDTA, CDTB und CDTC, die das CDT-Holotoxin ausbilden, besitzen Molekularmassen von ca. 30, 32 bzw. 20 kDa und werden von drei nebeneinander befindlichen, teilweise leicht überlappenden Genen kodiert [Lara-Tejero *et al.*, 2001]. Bisher ist noch nicht ausreichend geklärt, ob CDT in Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen steht. Statistische Untersuchungen, die dazu bisher vorliegen, ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Inzidenz von Durchfallerkrankungen durch CDT-produzierende *E. coli* [Bouzari und Varghese, 1990; Guth, *et al.*, 1994; Albert *et al.*, 1996]. Ein *in vivo*-Effekt durch CDT konnten in einem Tiermodell mit säugenden Mäusen beobachtet werden. Diese äußerten sich in Form von Nekrosen und einer reversiblen Vergrößerung des Gewebes im absteigenden Teil des Grimmdarms.

4.3. Überprüfung auf *cdt*-enthaltende Cosmide der *E. coli* 493/89-Genbank

Mit Hilfe der Cosmid-Genbank konnte das Vorkommen der gesamten *cdt*-Sequenz in SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 den Array-Befund bestätigen. Um ein *cdt*-tragendes Cosmid-Insert zu identifizieren, wurden zunächst alle vorhandenen Cosmid-DNA-Isolate mittels PCR auf das Vorhandensein von *cdt* überprüft. Dazu wurde ein Primerpaar generiert, welches ein 1086 Bp langes Fragment der CDT-III-Sequenz (Accession-Nr. U89305) amplifiziert. Das entsprechende PCR-Produkt enthält das Ende der *cdt-III A*- und den Anfang der *cdt-III B*-Sequenz und ergibt für *E. coli* 493/89 ebenfalls ein positives Amplifizierungsergebnis. Von den in Ergebnisteil D-1. erwähnten 188 isolierten Cosmiden konnte kein positives PCR-Produkt nachgewiesen werden. Daher wurde auf die Cosmide der Genbank, deren DNA bisher nicht isoliert wurde, zurückgegriffen. Zunächst wurde eine Abschwemmung der 48

Kulturen von allen 15 Platten der Cosmid-Genbank auf *cdt* untersucht. Drei dieser Platten waren bei der PCR positiv und wurden anschließend mittels Kolonieblott mit der *cdt-III*-Sonde, die aus *E. coli* 493/89 und den *cdt-III*-Primern erhalten wurde, hybridisiert. Auf diese Weise konnten fünf Cosmid-Klone identifiziert werden, die die entsprechende *cdt*-Sequenz auf ihrem Insert-Fragment besitzen. Die jeweilige Cosmid-DNA wurde isoliert und ansequenziert. Die Sequenzen weisen auf einen etwa 10 Kb großen *E. coli* EDL933-Bereich hin, der unter anderem für eine anaerobe Dimethyl Sulfoxid Reduktase, wahrscheinliche Transportproteine und eine Formiat-Acetyltransferase kodiert. Bei der wahren Insert-Fragmentgröße von etwa 40 Kb sind ungefähr 30 Kb zusätzliche DNA zu erwarten, die so nicht in der *E. coli* EDL933-Sequenz vorhanden ist. Aufgrund dieser Tatsache ergibt sich ein interessantes Cosmid-Fragment, das auch ohne Kenntnis der vorhandenen *cdt*-Sequenz einer weiteren Charakterisierung bedürft hätte.

4.4. Vergleich der *cdt*-Sequenz von *E. coli* 493/89 mit *cdt-I*, *cdt-II* und *cdt-III*

Mit Hilfe der *cdt-III*-Primer konnten *cdt*-Bereiche in dem *cdt*-enthaltenden Cosmid sequenziert werden und durch Primerwalking der so erhaltenen Sequenzen drei ORFs identifiziert werden, die in ihrer Größe und Homologie den drei ORFs von *cdt-IIIA*, *cdt-IIIB* und *cdt-IIIC* entsprachen. In Abbildung D-4.2. sind die Differenzen der Aminosäuresequenzen, die sich aus den entsprechenden Nukleotidsequenzen ergeben, von CDT aus Stamm 493/89, CDT-II von *E. coli*-O128:H⁻ Stamm 9142/88 (Accession-Nr. U04208) und CDT-III des *E. coli* O15:H21-Stammes S5 (Accession-Nr. U89305) dargestellt.

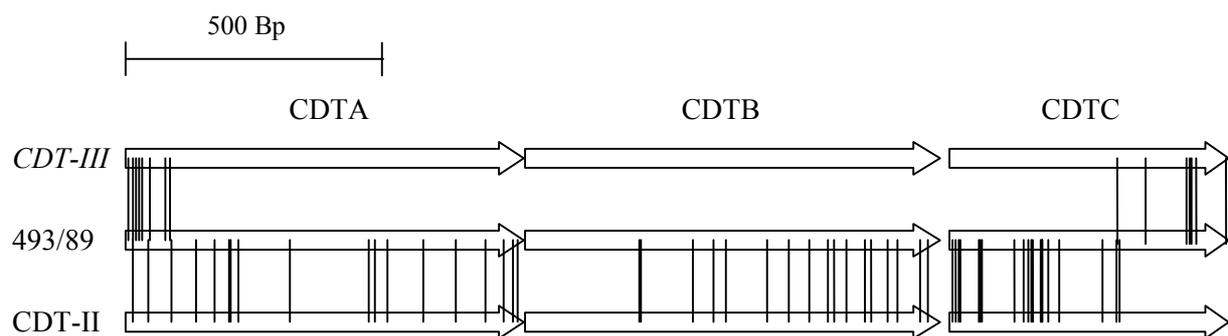


Abb. D-4.2.: Homologien der Aminosäuresequenz der drei CDT-Komponenten zwischen SF EHEC O157:H⁻-Stamm 493/89, *E. coli* O15:H21-Stamm S5 (CDT-III) und *E. coli* O128:H⁻-Stamm 9142/88 (CDT-II). Die Abweichungen der Aminosäuren sind als Linien zwischen den entsprechenden ORFs markiert.

Die 54 Differenzen zwischen CDT von *E. coli* 493/89 und CDT-II sind über alle drei Leserahmen verteilt und resultieren in einer 93%igen Identität der Aminosäuresequenz für

CDTA und CDTB und einer 89%igen Identität für CDTC. Im Gegensatz dazu befinden sich die 17 Unterschiede der Aminosäuresequenz zwischen CDT von *E. coli* 493/89 und CDT-III im 5'-Ende von CDTA und 3'-Ende von CDTC in einem jeweils begrenzten Bereich wieder. Die CDTB-Sequenz beider Stämme ist zu 100 % identisch. Die Identität der Aminosäuresequenz von CDT von Stamm 493/89 mit der von CDT-I des *E. coli* O86:H34-Stammes 6468/62 (Accession-Nr. U03293) beträgt nur 39% für CDTA, 54 % für CDTB und 31 % für CDTC (in der Abbildung nicht gezeigt). CDT-III, welches die größte Ähnlichkeit zu CDT von Stamm 493/89 besitzt, wurde als ein auf einem Plasmid kodiertes Gen beschrieben. Die beiden Sequenzen des *cdt*-tragenden Cosmid-Insertfragmentes weisen jedoch auf den bereits erwähnten chromosomalen *E. coli* EDL933-Bereich hin.

4.5. Identifizierung von Phagensequenzen als flankierende *cdt*-Regionen in *E. coli* 493/89

Die Sequenzierung in die angrenzenden Bereiche der *cdt*-ORFs ergab Homologien zur Sequenz des Bakteriophagen P2 auf beiden Seiten. Die P2-Sequenzen deuten darauf hin, dass die *cdt*-ORFs ein hypothetisches Protein innerhalb der Bakteriophagen P2-Sequenz (Accession-Nr. AF063097) ersetzt haben. Dieses hypothetische Protein befindet sich im Bereich der „späten Gene“ des Phagen und ist für den Phagen ohne essentielle Funktion. In Abbildung D-4.3. sind die Nukleotidhomologien innerhalb und außerhalb des *cdt*-Bereichs von SF STEC O157:H⁻ -Stamm 493/89 verdeutlicht. Berücksichtigt sind die Bakteriophagen P2-Sequenz und die beiden *E. coli*-Sequenzen von *cdt-I* und *cdt-III*. Für *cdt-III* und die Bakteriophagensequenz stromaufwärts von *cdtA* findet sich ein kurzes homologes DNA-Fragment. Ansonsten sind jedoch keine größeren Ähnlichkeiten der P2-Sequenz mit den *cdt-II* und *cdt-III*-Sequenzen zu verzeichnen. Die P2-Sequenz, die die *cdt*-Sequenz umrahmt, ist stromaufwärts von *cdtA* zyklisch an ihren kohäsiven Enden (cos-Enden) geschlossen. Die cos-Position ist in Abbildung D-4.3. gekennzeichnet.

4.6. Shotgun-Genbank des *cdt*-Cosmid-Insertfragmentes von *E. coli* 493/89

Zur weiteren Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich der genetischen Umgebung des *cdt*- und Bakteriophagen P2-Bereichs in *E. coli* 493/89 wurde wie in D-1.2. beschrieben eine Shotgun-Subklonierung des *cdt*-enthaltenden Cosmid-Insert-Fragmentes durchgeführt. Hierbei konnten 78 unterschiedliche Klone detektiert werden, die keine Homologie zu der Sequenz des Cosmid-Vektors aufwiesen, der zur Erstellung der Cosmid-Genbank verwendet wurde. Mit Berücksichtigung der bereits ermittelten 3,7 Kb großen *cdt*- und P2-Sequenz sind insgesamt so etwa 36 Kb des Cosmid-Insert-Fragmentes sequenziert worden, wenn auch nicht

zusammenhängend. Einundvierzig Klone besitzen Homologien zur Sequenz des Bakteriophagen Lambda (Accession-Nr. J02459), welche die erste Hälfte der kompletten 48,5 Kb großen Phagensequenz abdecken. Dieser entsprechende Bereich kodiert essentielle Phagenstrukturen, wie etwa Verpackungsenzyme oder Schwanz- und Kopfkomponten des Phagen. Vierzehn Klone haben Identität zu *E. coli* K-12 Stamm MG1655 im Bereich des Segmentes 105 (Accession-Nr. AE00215) der 400 MG1655-Segmente (Accession-Nr. AE00111 bis AE00510). Diese Identität entspricht der *E. coli* K-12-Homologie der in D-1. beschriebenen, in *E. coli* EDL933 nicht vorhandenen *E. coli* K-12-Sequenz. Daneben wurden zwei Klone detektiert, welche Homologien zu dem Genbereich „N“ bzw. „J“ des 33,6 Kb großen P2-Bakteriophagen-Genoms besitzen. Damit liegen diese Bereiche innerhalb der Bakteriophagen P2-Sequenz 3,5 bzw. 10,7 Kb von den direkt an den *cdt*-benachbarten P2-Sequenzen entfernt. „N“ kodiert für ein Kapsid-Regulatorgen und „J“ für das essentielle Schwanzfaserprotein, welches für die Anheftung des Phagen an die Zelloberfläche der Wirtszelle notwendig ist.

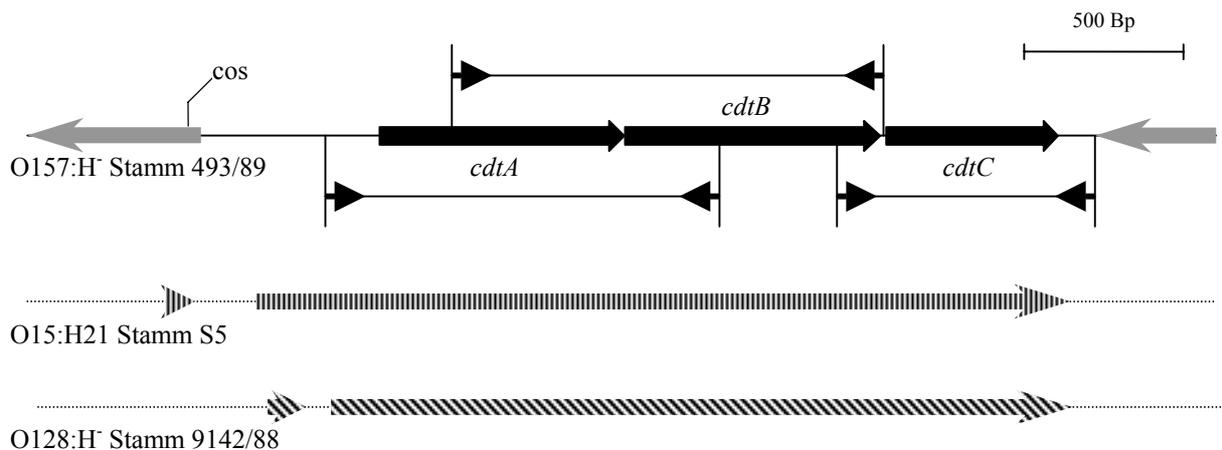


Abb. D-4.3.: Nukleotididentitäten von *cdt* des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89 mit *cdt-III* von *E. coli* O15:H21-Stamm S5 und *cdt-II* von *E. coli* O128:H⁻-Stamm 9142/88. Zusätzlich sind die Bakteriophage P2-Homologien, deren *cos*-Position und die drei PCR-Amplifikationsbereiche gekennzeichnet.

4.7. Häufigkeit von *cdt* in anderen SF STEC O157:H⁻-Stämmen

Wie bereits bei den beiden zuvor beschriebenen für *E. coli* 493/89 spezifisch ermittelten Sequenzen wurde auch für *cdt* eine Überprüfung mehrerer SF STEC O157:H⁻- und STEC O157:H7-Stämme auf dessen Präsenz vorgenommen. Die PCR-Strategie besteht aus drei unterschiedlichen Amplifikaten, die jeweils einen der drei *cdt*-ORFs vollständig erfassen. In

Abbildung D-4.3. sind die drei Positionen der für 38 STEC O157 und zwei *E. coli* O55:H⁻ – Stämme durchgeführten PCR-Analysen angegeben. Die Ergebnisse der drei PCR-Analysen untereinander waren jeweils identisch, entweder alle positiv oder negativ. Tabelle D-4.2. fasst die Ergebnisse der getesteten Stämme zusammen. Von 18 SF STEC O157:H⁻ -Stämmen waren 17 positiv, während für 20 STEC O157:H7-Stämme nur zwei positiv getestet wurden. Beide *E. coli* O55:H⁻ -Proben waren hingegen negativ. Die Ergebnisse des O157:H⁻ *cdt*-negativen Stammes, welcher aus einem Stuhl eines HUS-Patienten isoliert wurde, und die der beiden O157:H7 *cdt*-positiven Stämme, welche von Patienten mit einer Durchfallerkrankung stammen, wurden durch Southern Blot Hybridisierung mit einer *cdtB*-Sonde bestätigt.

Tab. D-4.2.: Verteilung von *cdt* in STEC O157- und *E. coli* O55-Stämmen aufgrund von PCR-Ergebnissen mit drei verschiedenen Primer-Paaren.

Serotyp	Anzahl der Isolate	Anzahl der Isolate positiv für				Isolate von Patienten mit	
		<i>cdtA,B,C</i>	<i>stx</i>	<i>eae</i>	SF	HUS	Diarrhöe
O157:H ⁻	18	17	18	18	18	17	1
O157:H7	20	2	20	20	0	11	9
O55:H7/H ⁻	2	0	0	2	2	0	2

E Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Cosmid-Bank-Sequenzierung, subtraktiver suppressiver Hybridisierung und zweier Makroarraytechniken eine Reihe chromosomaler SF STEC O157:H⁻-Sequenzen identifiziert, die in dieser Weise nicht im Chromosom von STEC O157:H7-Isolaten vorkommen. Allerdings bestätigten die Ergebnisse auch den hohen Homologiegrad der beiden O157-Serotypen. Im folgenden sollen zunächst die Befunde im allgemeinen und anschließend die im Detail charakterisierten *efa1/lifA*- und *cdt*-Sequenzen diskutiert werden.

1. Gemeinsame chromosomale Elemente der O157-Serotypen H7 und SF H⁻

Insbesondere die Sequenzierung eines Teils der Cosmid-Genbank des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89 belegt die große chromosomale Ähnlichkeit der beiden O157-Serotypen. Allein durch 93 Cosmide würde ausgehend von den Anfangs- und Endsequenzen etwa die Hälfte des *E. coli* EDL933-Chromosoms theoretisch abgedeckt werden. Die in Abbildung D-1.1. dargestellten homologen Bereiche zeigen zudem eine ausreichend gute statistische Verteilung der Cosmid-Insertfragmente auf dem *E. coli* EDL933-Chromosom an. Die Identitäten der homologen Sequenzen liegen im Durchschnitt bei 98 bis 99 Prozent. Die einzelnen Abweichungen der Nukleotide sind überwiegend punktuell über die DNA-Sequenz verteilt. Dies weist auf isolierte Punktmutationen und damit auf eine unterschiedliche evolutionäre Entwicklung des ehemaligen gemeinsamen chromosomalen Grundgerüsts hin. Es konnten aber auch einige *E. coli* 493/89-Sequenzen ermittelt werden, die zu 100 Prozent identisch mit *E. coli* EDL933 über größere Sequenzbereiche sind (Anhang, Tabelle G-1.1.). Diese Genbereiche sind vermutlich von beiden Serovaren erst vor kurzem in das Genom integriert worden. Zahlreiche Cosmid-Insertfragmente weisen an ihren Enden nicht auf dem *E. coli* EDL933-Chromosom zusammenhängende Bereiche auf. Möglicherweise sind diese auf den Herstellungsprozess der Cosmid-Genbank mittels Phageninduktion zurückzuführen (siehe Experimententeil C-5.). So könnte eine Zusammenfügung kleinerer unterschiedlicher *E. coli* 493/89-*Sau3a*-Fragmente zu größeren Fragmenten erfolgt sein. Fragmente, die dadurch eine Größe von 39 bis 43 Kb erreichen und somit in den Phagenköpfen verpackt werden können, würden so zu auf dem originären Chromosom nicht zusammenhängenden Fragmentenden führen. Eine andere Erklärung ist aber auch durch die Transduktion unterschiedlicher Phagen in beiden Serovaren gegeben, die in einer mosaikartigen Neustrukturierung der ursprünglichen Sequenz resultieren kann. Mehrere Arbeitsgruppen

stellten ein unterschiedliches Phagenmuster für die Serotypen O157:H7 und O157:H fest [Ammon *et al.*, 1999; Bielaszweska *et al.*, 1998, 2000; Liesegang *et al.*, 2000]. Der Befund unterschiedlicher in O157:H7 nicht präseneter Phagensequenzen bei der subtraktiven Hybridisierung und in einem Cosmid-Insertfragment dient als ein zusätzlicher Beleg für das abweichende Phagenprofil in beiden Serogruppen.

Die exakte Größe des Genoms von *E. coli* EDL933 ist bekannt (5,5 Mb) [Perna *et al.*, 2001], die von *E. coli* 493/89 wurde aufgrund von Pulsfeld-Gelelektrophorese-Fragmenten abgeschätzt (4,9 Mb) [Dobrindt *et al.*, 2003]. Der Größenunterschied von 0,6 Mb der beiden Genome ist durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Erwerbung verschiedener DNA-Elemente über horizontalen Gentransfer erklärbar. Das Vorkommen zusätzlicher DNA-Elemente in *E. coli* EDL933 im Vergleich zu *E. coli* 493/89 bestätigen drei Cosmide, die aufgrund ihrer Insertendsequenz-Homologien jeweils einen größeren Bereich auf dem *E. coli* EDL933 Chromosom abdecken, als er durch die bekannte Cosmid-Insertfragmentgröße tatsächlich vorgegeben ist. Andererseits wurden ebenfalls drei Cosmide detektiert, die dieser Auswertungsweise nach folgend jeweils einem wesentlich kürzeren *E. coli* EDL933-Bereich entsprechen. In diesen Fällen ist von zusätzlichen *E. coli* 493/89-DNA-Elementen, die nicht in *E. coli* EDL933 vorhanden sind, auszugehen. Im Einklang dazu können auch die Hybridisierungsergebnisse des Pathoarrays herangezogen werden. Die Anzahl der positiven Hybridisierungssignale bei *E. coli* EDL933 ist mit 113 größer als die von *E. coli* 493/89 mit 89 Signalen und impliziert eine größere Genvielfalt in *E. coli* EDL933. Eine zusätzliche Ausstattung an Virulenzgenen in *E. coli* EDL933 ist neben Shiga Toxin 1 und der Telluritresistenz auch bei unterschiedlichen Adhäsionsfaktoren (*afaB*, *afaD*, AIDA, *bfpA*) gegeben. Diese Faktoren wurden dem Pathoarray zufolge nicht von *E. coli* 493/89 in dessen Genom aufgenommen. Doch auch *E. coli* 493/89 weist einige spezifische nicht in *E. coli* EDL933 vorkommende virulenzassoziierte Gene auf (*cdt*, *afa7*) und bekräftigt die eigenständige phylogenetische Entwicklung beider Serotypen. Der Gesamtzahl von 44 Unterschieden steht eine fast doppelt so hohe Anzahl von 79 gemeinsamen Virulenzfaktoren gegenüber. Für beide Stämme ergaben sich positive Hybridisierungssignale bei den Gensequenzen für Fimbrien, Stx2 und der LEE-PAI. Diese Gene müssen bereits im Vorläufergenom vorhanden gewesen sein und beweisen neben dem gemeinsamen O157-Serotyp die erst später erfolgte Auftrennung in zwei phylogenetische Linien.

Der Pathoarray wurde in erster Linie für das Expressionsverhalten von UPEC erstellt. Er enthält daher in der Mehrzahl Sequenzen der fünf auf dem UPEC Stamm 536 befindlichen Pathogenitätsinseln [Dobrindt *et al.*, 2002]. Von den 123 DNA-Proben, die in mindestens einem der beiden O157-Stämme ein positives Hybridisierungssignal lieferten, waren 54 mit den UPEC-PAIs I bis V assoziiert. Deren Funktion ist zumeist unbekannt. Die in den Stämmen spezifisch vorliegenden Sequenzen kodieren in mehreren Fällen für Transposasen. Die Präsenz von unterschiedlichen PAI-assoziierten Transposasesequenzen in beiden O157-Stämmen unterstützt die Annahme des jeweils spezifisch erfolgten horizontalen Gentransfers.

2. Vergleich der O157-Serotypen mit *E. coli* K-12-Stamm MG1655

Durch die subtraktive Hybridisierung und Cosmid-Sequenzierung wurden in *E. coli* 493/89 insgesamt neun *E. coli* K-12-Sequenzen, die nicht in *E. coli* EDL933 vorhanden sind, ermittelt. Damit wird eine größere Ähnlichkeit des apathogenen *E. coli*-Laborstammes mit dem O157:H⁻ - als mit dem O157:H7-Stamm angedeutet. Für *E. coli* EDL933 und *E. coli* K-12 wurde ein gemeinsames Grundgerüst von 4,1 Megabasen erkannt [Perna *et al.*, 2001]. Die restlichen 0,53 Mb des *E. coli* K-12-Chromosoms, das entspricht 8,7 % des 4,63 Mb großen *E. coli* K-12-Genoms, weist keine Homologien zu *E. coli* EDL933 auf. Nach der Auswertung des *E. coli* K-12-Makroarrays lag der Anteil der nicht vorhandenen *E. coli* K-12-Leserahmen in *E. coli* EDL933 mit 195 von 4290 unter 5 % und liegt damit etwas unter dem direkten Sequenzvergleich. Diese Diskrepanz kann durch die Auswertungsart erklärt werden. So sind nicht gleich lange DNA-Fragmente auf dem Array zur Hybridisierung aufgebracht worden, sondern unterschiedlich große Leserahmen. Damit ist zahlenmäßig den kürzeren ORFs eine Bevorzugung gegenüber den längeren ORFs gegeben, obwohl letztere einen größeren Genombereich repräsentieren. Zudem kann durch Kreuzhybridisierungen, insbesondere bei den längeren ORFs, ein falsch positives Ergebnis vorgetäuscht werden. Trotzdem konnte eine höhere Ähnlichkeit von *E. coli* K-12 zu *E. coli* 493/89 als zu *E. coli* EDL933 verdeutlicht werden. Zum einen ist die Anzahl der negativen Signale für *E. coli* 493/89 mit 132 geringer als bei *E. coli* EDL933 mit 195 und zum anderen zeigen ausgewählte repräsentative DNA-Spots insgesamt eine stärkere Hybridisierung des *E. coli* K-12 Arrays mit *E. coli* 493/89 als mit *E. coli* EDL933. Die ausgeprägtere Aufnahme von DNA-Elementen in der evolutionären Entwicklung von *E. coli* EDL933 könnte für einen gleichzeitigen Verlust von ehemals vorhandenen *E. coli* K-12-Elementen verantwortlich sein. Ob die gefundenen *E. coli* K-12-Bereiche auf dem *E. coli* 493/89-Chromosom zuvor bei einem mit O157:H7 gemeinsamen Vorläufergenom vorhanden waren, läßt sich aber nur spekulativ ableiten. Die

Mehrzahl der in beiden Pathovaren fehlenden *E. coli* K-12-ORFs sind mit dem Stoffwechsel, dem Transport oder Sekretion und mit der Fimbriensynthese assoziiert. Deren Funktion könnte durch andere über horizontalen Gentransfer erworbene Gene übernommen worden sein. In beiden O157-Serotypen tritt ein eigenständiges Fehlen von *E. coli* K-12-ORFs auf. Bei *E. coli* EDL933 fehlen beispielsweise Gene des Phosphonat-Metabolismus und Transports, während bei *E. coli* 493/89 Insertionsproteine fehlen. Erneut läßt sich auf unterschiedliche evolutionäre Ereignisse beider Serotypen verweisen.

3. Vergleich mit *Shigella flexneri 2a*

Drei der Neun in *E. coli* 493/89 gefundenen spezifischen *E. coli* K-12-Bereiche sind auch im Genom von *Shigella flexneri 2a* vorhanden. Dessen Sequenz wurde kürzlich veröffentlicht und legt bei dem Vergleich mit *E. coli* K-12 die Vermutung nahe, dass *Shigella* eher zur Gattung *E. coli* zu rechnen ist und keine eigene Gattung ausprägt [Jin *et al.*, 2002]. Einen weiteren Bezug von SF O157:H⁻ zu dem *Shigella*-Genom stellt die in einem Cosmid-Insertfragment ermittelte *E. coli* 493/89-Sequenz dar, welche Homologien zu einer in *Shigella flexneri 2a* Stamm YSH6000 beschriebenen SRL-PAI besitzt. Das Fragment ist eines der drei detektierten *E. coli* 493/89-Cosmid-Insertfragmente, die im Vergleich zu *E. coli* EDL933 zusätzliche *E. coli* 493/89-spezifische DNA erkennen lassen. Die erwähnte SRL-PAI-Sequenz besitzt lediglich an ihren Randbereichen Homologie zu *E. coli* EDL933, dessen Genom nur zwei der sieben identifizierten ORFs enthält. Die auf *E. coli* 493/89 gefundenen sieben ORFs sind ähnlich wie in der SRL-PAI angeordnet und geben damit einen Hinweis darauf, dass die gefundene *E. coli* 493/89-Sequenz die ursprünglichere ist. Nach dem Verlust des *E. coli* 493/89-spezifischen Bereichs und Neuordnung der verbliebenen Sequenzen resultierte die publizierte *E. coli* EDL933-Sequenz. Dass die in *E. coli* 493/89-spezifische Sequenz auch in anderen SF O157:H⁻ -Stämmen vorhanden ist, wurde mit Hilfe einer PCR mit drei unterschiedlichen Amplifikationsprodukten belegt. Gleichzeitig wiesen ebenso getestete O157:H7-Stämme keine Präsenz dieser SRL-PAI-Teilsequenzen auf. Daher kann dieser Befund allgemein ausgeweitet werden und beschreibt evolutionäre Ereignisse, die bei einem O157:H7-Vorläufer aufgetreten sind. Ob die auf der SRL-PAI kodierte Antibiotikaresistenz oder das Eisenaufnahmesystem ehemals auf dem Genom dieses Vorläufers vorhanden war, kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. Der *E. coli* K-12 Makroarray zeigte für die ORFs des *fec*-Clusters des Eisenaufnahmesystems in beiden O157-Stämmen nur negative Hybridisierungssignale (Anhang, Tabelle G-II.1.). Dies spricht dafür, dass nur Teile der SRL-PAI ohne Bedeutung für die Virulenz in das O157-Genom aufgenommen wurden.

Die gefundenen ORFs sind in 5'-Richtung im letzten Drittel der 59 ORFs umfassenden SRL-PAI lokalisiert. In diesem Bereich befinden sich 18 der 22 mit den Prophagen CP4- und 933L-assoziierten ORFs der SRL-PAI. In dem PAI-Bereich liegt eine ähnliche Organisation und Orientierung wie in der Prophage CP4 vor, was auf eine gemeinsame Ursprungssequenz zumindest für Teile von CP4 und der SRL-PAI schließen läßt. Diese Sequenz könnte auch die Herkunft für die SRL-PAI-Sequenzen in dem O157-Chromosom erklären. Als eine den STEC und *Shigella*-Pathogenen gemeinsame Prophage ist CP4 möglicherweise für die partiell ähnlichen Strukturen beider Pathovaren mitverantwortlich.

4. Identifizierung des kompletten *efal/lifA*-ORFs in *E. coli* 493/89

Durch die subtraktive suppressive Hybridisierung wurden in *E. coli* 493/89 Sequenzen des *efal/lifA*-ORFs gefunden, welcher mit Hilfe eines Cosmid-Insertfragmentes vollständig charakterisiert werden konnte. Im *E. coli* EDL933-Genom ist dieser ORF nur rudimentär vorhanden. Ein 7,6 Kb großer Bereich in dem mittleren Areal von *efal/lifA* fehlt in *E. coli* EDL933. Wahrscheinlich wurde im Zuge einer genetischen Rekombination oder während des Erwerbs zusätzlicher DNA dieses Areal durch ein 3,4 Kb großes Fragment ersetzt, welches für Insertionssequenzen bzw. Transposasen kodiert. Aufgrund des Sequenzvergleichs scheint *efal* und *lifA* das gleiche Gen zu repräsentieren, für welches hingegen verschiedene Funktionen zugeschrieben wurden [Nicholls *et al.*, 2000; Klapproth *et al.*, 2000]. Das Vorhandensein dieses Gens in 18 weiteren SF STEC O157:H⁻-Stämmen konnte durch PCR-Analyse mit Primern, die komplementär zu drei unterschiedlichen Regionen des *efal/lifA* Gens sind, nachgewiesen werden. In 20 STEC O157:H7-Stämmen wurde jedoch nur das in *E. coli* EDL933 identifizierte *efal/lifA*-Teilfragment vorgefunden. Nichols *et al.* testeten die *efal*-Präsenz mit Primern, die zu diesem *E. coli* EDL933-Bereich komplementär sind. Daher wurde vor der Veröffentlichung der *E. coli* EDL933-Sequenz davon ausgegangen, dass der komplette *efal*-ORF auch in diesem O157:H7-Stamm vorhanden ist. Das *efal/lifA*-Restfragment befindet sich innerhalb der *E. coli* EDL933-Sequenz auf der sogenannten „enterotoxin and cytotoxin-island“. Dort wird es als ein vermutliches Cytotoxin eingestuft. Daneben sind auf jener *E. coli* EDL933-Region Insertionssequenzen, Leserahmen mit unbekannter Funktion und ein anderer vermutlicher Virulenzfaktor kodiert, der Homologien zu dem Enterotoxin ShET2 von *Shigella flexneri* besitzt. Die Endsequenzen des *efal/lifA*-enthaltenden *E. coli* 493/89-Cosmid-Insertfragmentes weisen auf ein 36,8 Kb großen *E. coli* EDL933-Bereich aus eben dieser Region hin. Zusammen mit dem in *E. coli* EDL933

fehlenden 4,2 Kb großen *efa1/lifA*-Fragment ergibt sich eine für das Cosmid-Insertfragment realistische Größe von 41 Kb. Somit kann angenommen werden, dass die *E. coli* EDL933-Sequenz in diesem Bereich mit dem *E. coli* 493/89-Genom, die Unterschiede in *efa1/lifA* ausgenommen, identisch ist. Im Kaninchen-spezifischen EPEC O15:H⁻-Stamm 83/39 konnte *efa1/lifA* innerhalb einer 59,5 Kb großen LEE-PAI gefunden werden [Tauschek *et al.*, 2002]. Ein in der Mitte dieser PAI gelegenes 34 Kb großes Areal zeigt die gleiche Genanordnung wie die LEE-PAI in *E. coli* EDL933. Die Region des *efa1/lifA*-Restfragments in *E. coli* EDL933 ist jedoch 720 Kb von der LEE-PAI entfernt. Damit kommt für die beiden O157-Serovare H7 und SF H⁻ eine andere Herkunftsquelle des *efa1/lifA*-ORFs in Frage. Auch für andere A/E-Läsionen verursachende positive *E. coli*-Stämme, bei denen ebenfalls *efa1* positiv getestet wurde, konnte kein lokaler Bezug zur LEE-PAI gefunden werden [Nichols *et al.*, 2000]. *Efa1* wurde zuerst in einem STEC O111:H⁻-Stamm identifiziert und als essentiell für die Adhärenz an kultivierten Epithelzellen befunden [Nichols *et al.*, 2000]. Für STEC O5-Stämme konnte eine positive Beeinflussung des Kolonisationsverhaltens bei 4- und 11 Tage alten Rindern durch *efa1* gezeigt werden [Stevens *et al.*, 2002]. Lymphostatin ist in EPEC O127:H6-Stamm 2348/69 als ein Lymphozyten-Proliferations hemmendes Toxin beschrieben worden, welches zudem die Produktion einiger Interleukine blockiert [Klapproth *et al.*, 2000]. Lymphostatin gehört zur Klasse der sogenannten „großen Toxine“. Diese schließt die Cytotoxine A und B von *Clostridium difficile* mit ein, zu denen LifA mit seinen 470 Aminosäuren am N-terminalen Ende eine 40 %ige Homologie besitzt. Gegenwärtig kann die Rolle dieses multifunktionellen Virulenzfaktors in der Pathogenese von SF STEC O157:H⁻-Stämmen noch nicht eingeschätzt werden. Die gut zu beobachtende Adhärenz von SF O157:H⁻-Stämmen an Hep-2-Zellen [Karch *et al.*, 1993] kann neben Intimin, Fimbrien oder anderen Oberflächenstrukturen auch durch *efa1/lifA* mitverursacht sein. Experimente mit Deletionsmutanten von *efa1/lifA* könnten neben der Auswirkung auf die Adhärenz auch die lymphostatische Aktivität dieses Gens klären.

5. Vorkommen von *cdt* in STEC O157

Einen weiteren auf dem *E. coli* EDL933-Genom nicht vorhandenen potentiellen Virulenzfaktor in *E. coli* 493/89 stellen neben *efa1/lifA* die vollständig vorhandenen Gene für CDT dar. Zum ersten Mal wird damit von CDT in einem STEC-Stamm berichtet. Für *E. coli* wurde CDT bisher nur in EPEC und nekrotoxischen *E. coli* beschrieben [Clark *et al.*, 2002]. Ein Sequenzvergleich mit den drei bisher publizierten *E. coli-cdt*-Sequenzen erbrachte den höchsten Homologiegrad mit *cdt-III*, welches sich bei dem entsprechenden Stamm auf einem

Plasmid befindet [Peres *et al.*, 1997]. Das *E. coli* 493/89-Cosmid-Insertfragment, welches die durch den Pathoarray detektierte *cdt*-Sequenz trägt, ergab jedoch für die *cdt*-flankierenden Regionen Sequenzen der beiden Bakteriophagen λ - und P2. Das läßt auf eine Aufnahme der *cdt*-Sequenz in *E. coli* 493/89 durch einen Phagen schließen. Die unmittelbar neben *cdt* befindlichen Bakteriophagen P2-Sequenzen sprechen dafür, dass *cdt* ein für den Phagen nicht essentielles Protein ersetzt hat und so in das Phagengenom integriert werden konnte. Über eine Infektion eines *E. coli* 493/89-Vorläuferstammes mit diesem rekombinierten Phagen könnte daraufhin *cdt* in das bakterielle Genom eingeführt worden sein. Neben der P2-Sequenz ist auch ein großer λ -Bereich vorhanden. Dies deutet auf eine Rekombination der beiden Phagen hin. Eine Rekombination sowohl von P2-Phagen untereinander als auch mit anderen lambdoiden Phagen ist durchaus beobachtet worden [Nilsson und Haggard-Ljungquist, 2001]. Zudem sind mosaikartige Rekombinationen auch für Shiga Toxin konvertierende Phagen gut dokumentiert [Schmidt, 2001]. Die Ähnlichkeit der *E. coli* 493/89-*cdt*-Sequenz zu *cdt-III* ist insbesondere im mittleren Bereich deutlich. Basendifferenzen finden sich nur an den Randsequenzen von *cdtA* und *cdtC*, also in der Nähe des Bereiches, an dem das Gen scheinbar aus der ursprünglichen Herkunftssequenz ausgeschnitten worden ist. Ob dies aus dem erwähnten Plasmid erfolgt ist oder ob das Plasmid selber durch horizontalen Gentransfer *cdt-III* erhalten hat, kann nur gemutmaßt werden. Da die für die Toxinausbildung notwendigen drei kompletten *cdt*-Gene in das Phagengenom und letztendlich in das Chromosom des O157-Pathogens gelangt sind, und nicht etwa Teilfragmente davon, kann von einem selektiven Vorteil für das *cdt*-enthaltende O157-Genom ausgegangen werden. Nur diejenigen Stämme, die die vollständigen *cdt*-Gene aufnahmen, könnten das Toxin exprimiert und damit eine erweiterte Pathogenität erhalten haben. Im Gegensatz zu *efal/lifA* zeigt sich ein uneinheitliches Verteilungsbild von *cdt* in SF O157:H⁻- und O157:H7-Stämmen. Die überwiegende Mehrheit der getesteten H⁻-Stämme war zwar positiv und die der H7-Stämme negativ, doch in beiden Fällen konnten auch Ausnahmen registriert werden. Die PCR-Studie war in der Weise angelegt, dass auch flankierende Bereiche von *cdt* erfasst wurden. Das einheitliche Ergebnis in allen getesteten Stämmen spricht für einen hohen Konservierungsgrad dieses Genabschnitts und belegt den Transfer durch dieselbe rekombinierte Phage. Der negativ getestete SF O157:H⁻-Stamm könnte das Gen durch eine Lyse des temperenten Phagen verloren haben. Eine spontane Induktion von temperenten P2-Bakteriophagen wird tatsächlich in der üblichen geringen Frequenz beobachtet. Im Gegensatz zu lambdoiden Phagen können P2-Phagen nicht künstlich induziert werden, so dass unter Laborbedingungen eine Möglichkeit dieser Induktion nicht nachvollzogen werden kann

[Birge, 1994]. Für eine *cdt*-Induktion spricht auch das Vorkommen von *cdt* in zwei der 20 getesteten O157:H7-Stämme. In diesen Stämmen könnte das Vorkommen der *cdt*-Sequenz im Gegensatz zu den SF O157:H⁻ erst kürzlich durch eine Infektion der rekombinanten *cdt*-Phage erfolgt sein.

6. Evolutionäre Aspekte des O157-Komplexes

Das evolutionäre Modell für die Entwicklung der STEC O157-Pathovare geht davon aus, dass vor der Abzweigung zu der SF STEC O157:H⁻ -Linie ein mit dem STEC O157:H7-Serotyp gemeinsamer EPEC O55-ähnlicher Vorläufer existierte [Feng *et al.*, 1998]. Aufgrund dessen wurden die PCR-Analysen der detektierten spezifischen *E. coli* 493/89-Sequenzen auch auf EPEC O55:H7-Stämme ausgeweitet. Es wurden zwei EPEC O55:H7-Stämme eingesetzt, die für die Entwicklung des O157-Modells verwendet wurden. Für *efa1/lifA* konnte eine Präsenz in beiden getesteten O55:H7-Stämmen nachgewiesen werden, für *cdt* und die SRL-PAI-Sequenz in keinem der überprüften Stämme. Bezüglich *efa1/lifA* wird hiermit die nähere Verwandtschaft von EPEC O55:H7 mit SF O157:H⁻ belegt. Zum anderen wird aber auch die eigenständige Entwicklung durch die erst später erworbenen *cdt*- und SRL-Sequenzen verdeutlicht. Während der Entwicklung zu O157:H7, wurde die vormals präsenzte komplette *efa1/lifA*-Sequenz teilweise durch Transposase-Sequenzen ersetzt. Das *cdt*-Gen wurde wahrscheinlich erst nach der Abzweigung zu dem nichtbegeißelten SF O157:H⁻ -Pathovar erhalten. Da die SRL-PAI-Sequenz ebenfalls nicht in O55:H7 und nur unvollständig in O157:H7 vorhanden ist, wurde diese Sequenz vermutlich vor der Abzweigung in das Genom aufgenommen.

Für *E. coli* K-12 und O157 wird ein gemeinsames Vorfahr-Genom vor etwa 4,5 Millionen Jahren angenommen [Reid *et al.*, 2000]. Die scheinbar höhere Ähnlichkeit des nicht-pathogenen *E. coli* K-12-Genoms mit SF STEC O157:H⁻ -Stamm 493/89 als zu STEC O157:H7-Stamm EDL933 stützt die Annahme, dass das STEC O157:H7-Pathogen sich phylogenetisch stärker weiterentwickelt hat als SF STEC O157:H⁻. Im Einklang dazu steht das phylogenetische O157-Modell, in dem der Serotyp SF O157:H⁻ sich zeitlich früher von der H7-Linie abgezweigt hat [Feng *et al.*, 1998]. Erst in jüngerer Zeit nach dieser Auftrennung traten die chromosomalen Veränderungen zu O157:H7 auf. Auch *Shigella* entwickelte sich erst vor 35.000 bis 200.000 Jahren aus unterschiedlichen *E. coli*-Formen heraus [Pupo *et al.*, 2000]. Damit liegt dessen Entwicklung wesentlich später als der angenommene *E. coli* K-12- und O157-Vorläufer. Dementsprechend sind auch die *Shigella flexneri*-Sequenzen in *E. coli* 493/89, welche nicht in *E. coli* EDL933 vorhanden sind, leichter

zu erklären. In künftigen Studien bezüglich des O157-Komplexes sollte neben den vermutlichen EPEC-Vorfahren auch *Shigella* miteinbezogen werden.

7. Abschlussbetrachtung

Die Anzahl von Unterschieden bei der Präsenz potentieller Virulenzfaktoren in STEC O157:H7 und SF STEC O157:H⁻ konnte durch die vorliegende Arbeit um zwei Faktoren erweitert werden. Bislang wurde nur das Plasmidkodierte *sfp*-Fimbriencluster als ein für SF O157:H⁻-spezifisches Virulenzgen charakterisiert. Mit *cdt* und *efa1/lifA* liegen nun zwei weitere SF O157 H⁻-spezifische Faktoren vor, auch wenn *cdt* in einigen H7-Stämmen detektiert werden konnte. Die angewendeten molekularbiologischen Methoden erbrachten jede für sich neue Erkenntnisse. Mit der SSH-Methodik ist *efa1/lifA* und mit Hilfe des Pathoarrays ist *cdt* ermittelt worden. Während bei dem Pathoarray *efa1/lifA* bei der Auswahl der verschiedenen Virulenzgene nicht berücksichtigt wurde, konnte bei der SSH-Methodik nur ein P2-Fragment registriert werden, das bei dem damaligen Kenntnisstand nicht im Zusammenhang mit einem Virulenzfaktor gebracht werden konnte. Beide Methoden erwiesen sich als ein geeignetes Hilfsmittel zur Ermittlung genomischer Differenzen. Die Cosmid-Genbank stellte sich dabei als eine wertvolle Unterstützung für die weitere Charakterisierung der ermittelten Unterschiede heraus. Der Pathoarray läßt noch weitere O157:H⁻-spezifische potentielle Virulenzfaktoren erahnen. Interessant dürfte aber auch für künftige Untersuchungen sein, diejenigen H7-Gene weiter zu verifizieren, die nicht den Weg in das SF O157:H⁻-Genom gefunden haben. Dies könnte weitere Erkenntnisse bezüglich der Eigenständigkeit der SF STEC O157:H⁻-Linie innerhalb des O157-Komplexes liefern.

F Literaturverzeichnis

Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A. G., Trabulsi, L. R., Douce, G., Knutton, S., Dougan, G. (1998) Detection of intimins alpha, beta, gamma and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens, *J. Clin. Microbiol.* **36**, 662-668.

Albert, M. J., Faruque, S. M., Faruque, A. S., Bettelheim, K. A., Neogi, P. K., Bhuiyan, N. A., Kaper, J. B. (1996) Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children, *J. Clin. Microbiol.* **34**, 717-719.

Allerberger, F., Dierich, M. P., Gruber-Moesenbacher, U., Liesegang, A., Prager, R., Hartmann, G., Rabsch, W., Tschäpe, H., Karch, H. (2000) Nontoxigenic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻ associated with a family outbreak of diarrhea, *Wien. Klin. Wochenschr.* **112**, 846-850.

Ammon, A., Petersen, L. R., Karch, H. (1999) A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H⁻, *J. Infect. Dis.* **179**, 1274-1277.

Aragon, V., Chao, K., Dreyfus, L. A. (1997) Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells, *Infect. Immun.* **65**, 3774-3780.

Bettelheim, K. A., Whipp, M., Djordjevic, S. P., Ramachandran, V. (2002) First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157, *J. Med. Microbiol.* **51**, 713-714.

Bielaszewska, M., Prager, R., Zhang, W. L., Janka, A., Liesegang, A., Tschäpe, H., Karch, H. (2002) A new clone of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains associated with human diseases. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Bielaszewska, M., Schmidt, H., Karmali, M. A., Khakhria, R., Janda, J., Blahova, K., Karch, H. (1998) Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains in the Czech Republic, *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2135-2137.

Bielaszewska, M., Schmidt, H., Liesegang, A., Prager, R., Rabsch, W., Tschäpe, H., Cizek, A., Janda, J., Blahova, K., Karch, H. (2000) Cattle can be a reservoir of sorbitol fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains and a source of human diseases, *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3470-3473.

Bilge, S. S., Vary, J., Dowell, S. F., Tarr, P. I. (1996) Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus, *Infet. Immun.* **64**, 4795-4801.

Birge, E. A. (1994) Genetics of Temperate Bacteriophages, in: Bacterial and Bacteriophage Genetics, Birge, E. A. (Editor), 3th ed., Springer-Verlag, New York, 206-239.

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**, 1453-1474.

Bockemühl, J., Karch, H. (1996) Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995), *Bundesgesundheitsblatt* **8**, 290-296.

Bockemühl, J., Karch, H., Tschäpe, H. (1997) Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996, *Bundesgesundheitsblatt* **6**, 194-197.

Bockemühl, J., Karch, H., Tschäpe, H. (1998) Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1997, *Bundesgesundheitsblatt Suppl.* (Oktober, 1998), 2-5.

Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P., Gyles, C. L. (1999) Association between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans, *J. Clin. Microbiol.* **37**, 497-503.

Bouzari, S., Varghese, A. (1990) Cytolethal distending toxin (CLDT) production by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), *FEMS Microbiol. Lett.* **59**, 193-198.

Brunder, W., Salam Khan, A., Hacker, J., Karch, H. (2001) Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H₇, *Infect. Immun.* **69**, 4447-4457.

Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., Karch, H. (1999) The large plasmid of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements, *Microbiology* **145**, 1005-1014.

Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H₇, *Microbiology* **142**, 3305-3315.

Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H₇ cleaves human coagulation factor V, *Mol. Microbiol.* **24**, 767-778.

Burland, V., Shao, Y., Perna, N. T., Plunkett, G., Sofia, H. J., Blattner, F. R. (1998) The complete DNA sequence analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H₇, *Nucleic. Acids Res.* **26**, 4196-4204.

Caprioli, A., Tozzi, A. E. (1998) Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe, in: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 38-48.

Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., Levy, D. D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3258-3263.

Clark, C. G., Johnson, S. T., Easy, R. H., Campbell, J. L., Rodgers, F. G. (2002) PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle, *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2671-2674.

Clarke, S. C. (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem ?, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **41**, 93-98.

Comayras, C., Tasca, C., Peres, S. Y., Ducommun, B., Oswald, E., De Rycke, J. (1997) *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation, *Infect. Immun.* **65**, 5088-5095.

Cope, L. D., Lumbley, S., Latimer, J. L., Klesney-Tait, J., Stevens, M. K., Johnson, L. S., Purven, M., Munson, R. S. Jr, Lagergard, T., Radolf, J. D., Hansen, E. J. (1997) A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4056-4061.

Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergard, T., Thelestam, M. (1999) The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase, *J. Clin. Invest.* **103**, 107-115.

DeVinney, R., Stein, M., Reinsheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S., Finlay, B. B. (1999) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated, *Infect. Immun.* **67**, 2389-2398.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 6025-6030.

Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., Hacker, J. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* using DNA arrays, *J. Bacteriol.* (im Druck befindlich)

Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., Hacker, J. (2002) Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536, *Infect. Immun.* **70**, 6365-6372.

Elliott, S. J., Yu, J., Kaper, J. B. (1999) The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12, *Infect. Immun.* **67**, 4260-4263.

Emmerth, M., Goebel, W., Miller, S. I., Hueck, C. J. (1999) Genomic subtraction identifies *Salmonella typhimurium* prophages, F-related plasmid sequences, and a novel fimbrial operon, *stf*, which are absent in *Salmonella typhi*, *J. Bacteriol.* **181**, 5652-5661.

Feng, P., Lampel, K. A., Karch, H., Whittam, T. S. (1998) Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7, *J. Infect. Dis.* **177**, 1750-1753.

Fitzgerald, J. R., Musser, J. M. (2001) Evolutionary genomics of pathogenic bacteria, *Trends Microbiol.* **9**, 547-553.

Griffin, P. M. (1998) Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States, in: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 15-22.

Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome, *Epidemiol. Rev.* **13**, 60-98.

Guth, B. E., Giraldi, R., Gomes, T. A., Marques, L. R. (1994) Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC adherence factor (EAF) sequences, *Can. J. Microbiol.* **40**, 341-344.

- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12, *DNA Res.* **28**, 11-22.
- Janke, B., Dobrindt, U., Hacker, J., Blum-Oehler, G. A. (2001) Subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655, *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 61-66.
- Jin, Q., Yuan, Z. H., Xu, J. G., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W. C., Wang, J. H., Liu, H., Yang, J., Yang, F., Qu, D., Zhang, X. B., Zhang, J. Y., Yang, G. W., Wu, H. T., Dong, J., Sun, L. L., Xue, Y., Zhao, A. L., Gao, Y. S., Zhu, J. P., Kan, B., Chen, S. X., Yao, Z. J., He, B. K., Chen, R. S., Ma, D. L., Qiang, B. Q., Wen, Y. M., Hou, Y. D., Yu, J. (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a, insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157, *Nucleic Acids Res.* **30**, 4432-4441.
- Johnson, W. M., Lior, H. (1987) Response of Chinese ovary hamster cells to cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heatlabile (LT) enterotoxin, *FEMS Microbiol. Lett.* **26**, 127-129.
- Kaplan, B. S. (1998) The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome, *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1126-1133.
- Karch, H., Bielaszewska, M. (2001) Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis, *J. Clin. Microbiol.* **6**, 2043-2049.
- Karch, H., Böhm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, Heesemann, J. (1993) Clonal structure and pathogenicity of Shiga toxin-producing sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻, *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1200-1205.

- Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R. O'Brien, A. D., Tacket, C. O., Levine, M. M. (1987) A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells, *Inf. Immun.* **55**, 455-461.
- Karch, H., Huppertz, H.-I., Bockemühl, J., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Lissner, R. (1997) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany, *J. Food. Prot.* **11**, 1454-1457.
- Karch, H., Schmidt, H., Brunder, W. (1998) Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7, in: *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 183-194.
- Karch, H., Wiss, R., Glonning, H., Emmrich, P., Aleksic, S., Bockemühl, J. (1990) Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **115**, 485-495.
- Keskimäki, M., Saari, M., Heiskanen, T., Siitonen, A. (1998) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates, *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3641-3646.
- Klapproth, J.-M. A., Scaletsky, I. C. A., McNamara, B. P., Lai, L.-C., Malstrom, C., James, S. P., Donnenberg, M. S. (2000) A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect. Immun.* **68**, 2148-2155.
- Kleanthous, H., Smith, H. R., Scotland, S. M., Gross, R. J., Rowe, B., Taylor, C. M., Milford, D. V. (1990) Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles. 1985-8: association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. 2. Microbiological aspects, *Arch. Dis. Child* **65**, 722-727.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. I., Stavric, S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* **18**, 775-779.
- Lara-Tejero, M., Galan, J. E. (2001) CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity, *Infect. Immun.* **69**, 4358-4365.

- Liesegang, A., Sachse, U., Prager, R., Claus, H., Steinrück, H., Aleksic, S., Rabsch, W., Voigt, W., Fruth, A., Karch, H., Bockemühl, J., Tschäpe, H. (2000) Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ in Germany – a ten-year study, *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 269-278.
- Luck, S.N., Turner, S. A., Rajakumar, K., Sakellaris, H., Adler, B. (2001) Ferric dicitrate transport system (Fec) of *Shigella flexneri 2a* YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes, *Infect. Immun.* **69**, 6012-6021.
- Maneval, D. R., Nataro, J. P., Levine, M. M. (1997) Identification of a novel fimbrial antigen in EHEC, in: *3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia coli Infections*. Abstract V230/III. Melville, NY: Lois Joy Galler Foundation for Hemolytic uremic Syndrome.
- Mayer, M. P., Bueno, L. C., Hansen, E. J., DiRienzo, J. M. (1999) Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect. Immun.* **67**, 1227-1237.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1664-1668.
- McDaniel, T. K., Kaper, J. B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12, *Mol. Microbiol.* **23**, 399-407.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999) Food-related illness and death in the United States, *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 607-625.
- Meng, J., Doyle, M. P. (1998) Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods, in: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 92-108.

Michino, H., Araki, H., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., Michino, H., Araki, K., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., Tanaka, H., Fujita, N., Usami, S., Yonekawa, M., Sadamoto, K., Takaya, S., Nobumichi, S. (1998) Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan, in: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 73-81.

Morrow, B. J., Graham, J. E., Curtiss, R. 3rd (1999) Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel *Salmonella typhimurium* fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the *Salmonella typhi* genome, *Infect. Immun.* **67**, 5106-5116.

Mühldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G. T., Acheson, D. W., Tschape, H., Kane, A. V., Ritter, A., Oelschläger, T., Donohue-Rolfe, A. (1996) Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* **64**, 495-502.

Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 164-177.

Nicholls, L., Grant, T. H., Robins-Browne, R. M. (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells, *Mol. Microbiol.* **35**, 275-288.

Nilsson, A. S., Haggard-Ljungquist, E. (2001) Detection of homologous recombination among bacteriophage P2 relatives, *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**, 259-269.

O'Brien, A. D., Lively, T. A., Chen, M., 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* **i**, 702.

Okuda, J., Fukumoto, M., Takeda, Y., Nishibuchi, M. (1997) Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*, *Infect. Immun.* **65**, 428-433.

- O'Loughlin, E. V., Robins-Browne, R. M. (2001) Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells, *Microbes Infect.* **3**, 493-507.
- Peres, S. Y., Marches, O., Daigle, F., Nougayrede, J. P., Herault, F., Tasca, C., De Rycke, J., Oswald, E. (1997) A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase, *Mol. Microbiol.* **24**, 1095-1107.
- Perna, N. T., Mayhew, G. F., Pósfai, G., Elliott, S., Sonnenberg, M. S., Kaper, J. B., Blattner, F. B. (1998) Molecular evolution of a Pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infect Immun.* **66**, 3810-3817.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 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., Potamouisis, 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.
- Pickett, C. L., Cottle, D. L., Pesci, E. C., Bikah, G. (1994) Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes, *Infect. Immun.* **62**, 1046-1051.
- Pickett, C. L., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Russell, G., Erdem, A. N., Zeytin, H. (1996) Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene, *Infect. Immun.* **64**, 2070-2078.
- Polo, S., Sturniolo, T., Deho, G., Ghiotti, D. (1996) Identification of a phage-coded DNA-binding protein that regulates transcription from late promoters in bacteriophage P4, *J. Mol. Biol.* **257**, 745-55.
- Pupo, G. M., Lan, R., Reeves, P. R. (2000) Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10567-72.

- Radnedge, L., Gamez-Chin, S., McCready, P. M., Worsham, P. L., Andersen, G. L. (2001) Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3759-3762.
- Reckseidler, S. L., DeShazer, D., Sokol, P. A., Woods, D. E. (2001) Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant, *Infect. Immun.* **69**, 34-44.
- Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., Whittam, T. S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*, *Nature* **406**, 64-67.
- 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.
- Robert Koch Institut (2000) Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland - zur Situation im Jahr 1999, Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden) - 2. Folge, Enterohämorrhagische *Escherichia coli*-infektionen (EHEC), *Epidemiologisches Bulletin* **2000 Nr. 34**.
- Russel, M. (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: Type II protein secretion systems (Review), *J. Mol. Biol.* **279**, 485-499.
- Sandvig, K., Deurs, B. (1996) Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin, *Physiol. Rev.* **76**, 949-966.
- Sanger, F. (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA, *Science* **214**, 1205-1210.
- Savarino, S. J., Fasano, A., Robertson, D. C., Levine, M. M. (1991) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an 'in vitro' rabbit intestinal model, *Journal of Infectious Diseases* **173**, 1019-1022.

Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M. K., Levine, M. M., Fasano, A. (1996) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*, *Journal of Infectious Diseases* **173**, 1019-1022.

Schmidt, H. (2001) Shiga-toxin-converting bacteriophages, *Res. Microbiol.* **152**, 687-695.

Schmidt, H., Karch, H., Beutin, L. (1994) The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family, *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 189-196.

Schmidt, H., Kernbach, C., Karch, H. (1996) Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Microbiology* **142**, 907-914.

Scott, D. A., Kaper, J. B. (1994) Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin, *Infect. Immun.* **62**, 244-251.

Shenker, B. J., McKay, T., Datar, S., Miller, M., Chowhan, R., Demuth, D. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells, *J. Immunol.* **162**, 4773-4780.

Smith, H. R., Rowe, B., Adak, G. K., Reilly, W. J. (1998) Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom, in: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 49-58.

Spika, J. S. (1998) Shiga toxin-producing *E. coli* infections in Canada, in: *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 23-29.

- Stevens, M. P., van Diemen, P. M., Frankel, G., Phillips, A. D., Wallis, T. S. (2002) Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111, *Infect. Immun.* **70**, 5158-5166.
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary Jr., J. C., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R., Besser, T. E. (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal Island of conserved structure, *Infect. Immun.* **68**, 1400-1407.
- Tauschek, M., Strugnell, R. A., Robins-Browne, R. M. (2002) Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* **44**, 1533-1550.
- Tesh, V. L., Burris, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolkowski, E. A., O'Brien, A. D. *et al.* (1993) Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxin type I and type II for mice, *Infect. Immun.* **61**, 3392-3402.
- Torres, A. G., Payne, S. M. (1997) Haem iron-transport system in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Mol. Microbiol.* **23**, 825-833.
- Turner, S. A., Luck, S. N., Sakellaris, H., Rajakumar, K., Adler, B. (2001) Nested deletions of the SRL pathogenicity island of *Shigella flexneri 2a*, *J. Bacteriol.* **183**, 5535-5543.
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M. P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R. V., Griffin, P. M. (1999) Lessons from a large state outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and widespread contamination of hamburger patties, *Epidemiol. Infect.* **122**, 185-192.
- Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M. S., de Montigny, L., Kaper, J. B., Donohue-Rolfe, A. (1995) The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterhemorrhagic *Escherichia coli* infection, *Infect. Immun.* **63**, 3621-3627.
- Weber, A., Jung, K. (2002) Profiling early osmotic stress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA microarrays, *J. Bacteriol.* **184**, 5502-5507.

Weinstein, D. L., Holmes, R. K., O'Brien, A. D. (1988) Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin 1 production by *Escherichia coli*, *Infect. Immun.* **56**, 106-111.

Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokolow, R., Morris, G. K. (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *J. clin. Microbiol.* **18**, 512-520.

Whitehouse, C. A., Balbo, P. B., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Mirabito, P. M., Pickett, C. L. (1998) *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block, *Infect. Immun.* **66**, 1934-40.

WHO: Removing obstacles to healthy development (1999) *World Health Organization Report on Infectious diseases*, Chapter 2.

Willshaw, G., Thirwell, J., Jones, A., Parry, S., Salmon, R., Hickey, M. (1994) Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain, *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 304-307.

Young, V. B., Knox, K. A., Schauer, D. B. (2000) Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*, *Infect. Immun.* **68**, 184-191.

G Anhang

Tab. G-1.1.: Sequenzen der Cosmid-Insertfragmente der Cosmid-Genbank des SF STEC O157:H⁻-Stammes 493/89, welche an beiden Fragmentenden Homologien zur Chromosomsequenz des STEC O157:H7-Stammes EDL933 besitzen. Anhand der Klontnamen ist ersichtlich, welcher Sequenzierprimer verwendet wurde (f: scos1fwd, r: scos1rwd, siehe Tab. C-1.)

Klon-Name	Accession-Nr.	Position	Identität (%)	Klon-Name	Accession-Nr.	Position	Identität (%)
1-3f	AE005567	10273-9705	99	2-7f	AE005549	565-1209	99
1-3r	AE005564	3793-3892	98	2-7r	AE005552	11249-10692	97
1-4f	AE005210	1466-2259	94	2-9f	AE005375	4358-5010	99
1-4r	AE005214	1349-572	96	2-9r	AE005378	4538-3877	99
1-6f	AE005615	4278-3511	94	2-11f	AE005508	13629-14259	99
1-6r	AE005611	6298-7043	95	2-11r	AE005512	9742-9149	98
1-8f	AE005632	8865-9438	98	2-17f	AE005539	1541-2197	99
1-8r	AE005636	10265-9739	94	2-17r	AE005541	10516-10335	98
1-12f	AE005427	2630-2057	97		AE005542	543-1	99
1-12r	AE005424	9320-10025	99	2-18f	AE005288	6614-6947	97
1-17f	AE005375	4358-4330	99	2-18r	AE005292	1943-1218	99
1-17r	AE005378	4528-4330	93	3-34f	AE005567	906-380	89
1-18f	AE005468	3748-3064	98	3-34r	AE005563	1132-1643	85
1-18r	AE005464	3647-4241	98	3-37f	AE005593	6073-5420	98
1-19f	AE005213	3265-2621	98	3-37r	AE005589	3134-3763	99
1-19r	AE005209	6942-7624	98	3-39f	AE005201	4411-3763	99
1-27f	AE005233	7136-7810	99	3-39r	AE005197	4263-4888	99
1-27r	AE005237	6864-6190	99	4-1f	AE005643	754-1392	98
1-31f	AE005615	11786-11127	98	4-1r	AE005647	397-1	100
1-31r	AE005612	6789-7459	99		AE005646	11352-11003	98
1-33f	AE005458	5780-5124	98	4-2f	AE005363	5452-6118	99
1-33r	AE005454	9431-10080	99	4-2r	AE005367	1163-563	99
1-34f	AE005629	1028-1699	98	4-9f	AE005582	10861-10256	99
1-34r	AE005636	10265-9604	99	4-9r	AE005578	9959-10665	99
1-35f	AE005621	5576-4918	99	4-10f	AE005529	9063-9616	98
1-35r	AE005617	8573-9226	99	4-10r	AE005533	7162-6665	94
1-36f	AE005622	9694-8950	98	4-13f	AE005238	11952-11317	99
1-36r	AE005619	1726-2363	98	4-13r	AE005235	4549-5246	99
1-38f	AE005463	1-465	97	4-17f	AE005375	4358-5029	98
	AE005462	10967-11311	100	4-17r	AE005378	4538-3811	99
1-38r	AE005466	4587-3914	98	4-18f	AE005567	4106-4720	99
1-43f	AE005539	1541-5526	96	4-18r	AE005571	3666-3106	98
1-43r	AE005542	549-1	100	4-19f	AE005497	9114-8403	98
	AE005541	10456-10154	86	4-19r	AE005494	1232-1930	99
1-45f	AE005590	952-1543	99	4-21f	AE005593	6056-5504	98
1-45r	AE005593	9794-9322	99	4-21r	AE005589	3135-3789	98
1-47r	AE005638	8433-7814	97	4-33f	AE005576	8801-9473	99
1-47r	AE005638	8433-7814	97	4-33r	AE005580	4664-4048	98
1-48f	AE005562	8022-8676	99	4-36f	AE005633	6437-7160	99
1-48r	AE005566	3330-2701	99	4-36r	AE005637	5827-5084	99

Fortsetzung Tab. G-I.1.

Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)	Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)
4-42f	AE005194	5090-5735	99	6-5f	AE005201	11242-11552	99
4-42r	AE005198	5465-4901	99	6-5r	AE005206	8327-7671	96
4-45f	AE005611	4068-3383	98	6-11f	AE005585	8227-7572	99
4-45r	AE005607	7188-7844	94	6-11r	AE005581	7174-7932	98
4-46f	AE005229	7940-8606	99	6-21f	AE005567	6824-7521	96
4-46r	AE005332	2817-2184	99	6-21r	AE005571	1302-625	98
5-2f	AE005267	8402-7681	98	6-35f	AE005231	7254-6595	98
5-2r	AE005264	3099-3808	98	6-35r	AE005228	6828-7519	98
5-5f	AE005642	9647-10424	98	6-38f	AE005584	5850-5160	99
5-5r	AE005646	4509-3797	99	6-38r	AE005580	5435-6198	97
5-6f	AE005641	7054-7793	99	6-39f	AE005639	458-1176	98
5-6r	AE005645	2451-1720	99	6-39r	AE005643	3425-2663	97
5-7f	AE005561	7673-8354	99	6-45f	AE005181	1981-2636	98
5-7r	AE005565	3580-2911	99	6-45r	AE005183	11231-10526	93
5-8f	AE005641	7055-7743	99	10-1f	AE005497	2816-2103	99
5-8r	AE005645	2451-1828	99	10-1r	AE005493	3309-4006	98
5-14f	AE005377	9758-9015	98	10-6f	AE005517	5432-6186	98
5-14r	AE005373	8060-8744	99	10-6r	AE005521	2977-2336	99
5-16f	AE005246	5448-5972	98	10-7f	AE005302	7697-6973	99
5-16r	AE005250	5859-5297	97	10-7r	AE005293	4423-5100	99
5-19f	AE005427	4673-3917	98	10-10f	AE005477	6239-5540	99
5-19r	AE005425	6458-7190	99	10-10r	AE005474	3311-3978	99
5-20f	AE005351	7412-6642	99	10-11f	AE005198	11321-10709	99
5-20r	AE005345	1003-1126	90	10-11r	AE005195	1140-1360	99
5-22f	AE005386	1120-1851	99			702-1144	100
5-22r	AE005389	7303-6631	99	10-14f	AE005519	8637-7916	98
5-23f	AE005479	2643-3358	99	10-14r	AE005515	10174-10837	99
5-23r	AE005482	5369-4670	99	10-20f	AE005664	8152-7674	96
5-25f	AE005324	5528-4796	94	10-20r	AE005661	9683-10488	98
5-25r	AE005320	6608-7264	98	10-22f	AE005328	9119-8415	97
5-29f	AE005362	1933-1195	99	10-22r	AE005325	3952-4630	99
5-29r	AE005358	1-526	98	10-27f	AE005479	5710-6352	97
5-31f	AE005391	10991-11674	98	10-27r	AE005482	9849-9288	93
5-31r	AE005395	7625-6955	99	10-32f	AE005227	537-1255	99
5-32f	AE005571	7043-7742	98	10-32r	AE005230	2528-1811	99
5-32r	AE005575	3368-2678	99	10-33f	AE005421	6455-5933	98
5-36f	AE005540	4848-5515	99	10-33r	AE005418	1089-1796	98
5-36r	AE005544	2296-1692	100	10-34f	AE005358	7772-7002	98
5-40f	AE005466	6662-7307	100	10-34r	AE005355	1944-2687	96
5-40r	AE005469	12963-12418	97	10-43f	AE005525	5414-6030	98
5-41f	AE005514	7722-8312	96	10-43r	AE005528	10297-9880	99
5-41r	AE005518	9063-8464	97	10-44f	AE005586	10689-9919	99
5-42f	AE005514	7722-8470	98	10-44r	AE005582	8211-8720	77
5-42r	AE005518	9079-8464	99	13-2f	AE005217	5104-4327	99
5-45f	AE005418	5368-6033	99	13-2r	AE005213	8523-9160	96
5-45r	AE005422	552-4	91	13-44f	AE005573	1764-1010	99
5-46f	AE005571	15869-15181	99	13-44r	AE005569	9685-10374	99
5-46r	AE005568	6125-6734	99				

Fortsetzung Tab. G-I.1.

Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)
13-45f	AE005257	7186-7902	98
13-45r	AE005260	7428-6765	97
13-48f	AE005232	8853-8319	99
13-48r	AE005229	12848-13112	85
15-7f	AE005260	4554-5373	98
15-7r	AE005264	2123-1369	99
15-10f	AE005665	3662-2981	97
15-10r	AE005661	14864-15612	98
15-22f	AE005453	7839-7221	98
15-22r	AE005450	2919-3542	99
15-24f	AE005665	3650-2972	98
15-24r	AE005661	14859-15455	97
15-25f	AE005516	381-1089	98
15-25r	AE005519	6101-5385	98
15-30f	AE005516	381-1092	98
15-30r	AE005519	6112-5452	98

Tab. G-I.2.: Sequenzen der Cosmid-Insertfragmente der Cosmid-Genbank des Stammes 493/89, welche an beiden Fragmentenden Homologien zu Stamm EDL933 besitzen, diese sich jedoch auf unterschiedlichen nicht zusammenhängenden Bereichen des EDL933-Genoms befinden.

Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)	Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)
2-20f	AE005584	9504-8847	99	9-46r	AE005332	4402-4797	99
2-20r	AE005345	6452-6530	98	9-46r	AE005330	6207-5947	95
		8979-9555	98	10-19f	AE005466	10524-11179	98
3-47f	AE005638	7947-7240	99	10-19r	AE005487	768-1504	95
3-47r	AE005323	2134-2164	96	10-26f	AE005467	1-101	96
4-7f	AE005177	3765-3160	99		AE005466	10518-11179	95
4-7r	AE005668	5054-5757	99	10-26r	AE005487	768-1437	95
4-22f	AE005388	8102-7648	91	13-1f	AE005264	6346-5651	96
4-22r	AE005388	8115-7627	82	13-1r	AE005593	1003-324	99
4-32f	AE005619	6047-5390	96	15-5f	AE005258	6334-6405	90
4-32r	AE005474	5-753	99	15-5r	AE005343	7410-8093	95
4-41f	AE005607	7188-7844	94	15-21f	AE005186	3680-2989	99
4-41r	AE005380	2410-3094	98	15-21r	AE005384	6580-7251	99
5-17f	AE005186	3680-2933	99				
5-17r	AE005384	6583-7300	98				
5-24f	AE005418	5650-6342	99				
5-24r	AE005288	4077-4757	98				
5-46f	AE005363	5363-6084	99				
5-46r	AE005288	5022-5656	98				
6-31f	AE005638	12462-11744	99				
6-31r	AE005324	2726-3424	90				
6-47f	AE005636	8921-9610	98				
6-47r	AE005289	10671-9914	94				

Tab. G-I.3.: Sequenzen der Cosmid-Insertfragmente der Cosmid-Genbank des Stammes 493/89, welche an nur einem Fragmentende sequenziert werden konnten und bis auf zwei Ausnahmen Homologien zu Stamm EDL933 besitzen.

*: Homologie zur Sequenz des Bakteriophagen P27

#: Homologie zu *E. coli* K-12, Sektion 105 von 400

Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)	Klon- Name	Accession- Nr.	Position	Identität (%)
1-24r	AE005566	1395-2068	99	10-40r	AE005198	9333-8594	98
1-42r	AE005633	345-925	98	10-42r	AE005206	5239-4579	95
2-2f	AE005408	3624-4147	96	13-3f	AE005540	13876-13265	90
2-13f	AE005541	10516-10394	97	13-41r	AE005260	7407-6737	98
	AE005542	549-1	99	13-43f	AE005605	715-157	95
2-36f	AE005495	7801-7108	99	13-46f	AE005380	14022-14358	89
4-20f	AE005366	3191-3606	99	15-1r	AE005634	274-962	95
4-24f	AE005330	32-618	95	15-4r	AE005357	8800-9572	97
4-25r	AE005494	1255-1905	98	15-11r	AE005661	14861-15524	97
4-28f	AE005638	7957-7305	98	15-14f	AE005344	8571-8064	98
4-29r	AE005638	3537-2833	99	15-23r	AE005638	3537-2857	98
4-31f	AE005475	4052-3574	99	15-27f	AE005495	7757-7014	99
4-42f	AE005637	1314-658	99	15-28r	AE005256	6864-7320	93
4-43r	AE005219	3729-3080	98	15-29r	AE005556	12980-12607	91
4-48r	AE005571	3667-3110	95	15-32r	AE005302	7697-7024	98
5-11r	AE005256	4807-4913	88	15-33f	AE005358	6311-7129	99
5-12f	AE005619	6064-5287	94	15-35f	AE005342	3267-2516	99
5-21f	AE005351	7412-6720	99	15-41f	AE005206	12091-11693	92
5-26f	AJ298298*	8577-8074	97	15-44f	AE005403	6579-7239	93
5-26r	AE005411	10975-10256	98				
5-47f	AE000215 [#]	10875-10401	99				
5-47r	AE005330	6247-6757	92				
5-4r	AE005433	6862-6209	96				
5-8f	AE005553	4577-5075	98				
5-9f	AE005503	3352-3979	98				
6-13f	AE005572	2461-1808	98				
6-27f	AE005386	8037-8641	91				
6-28f	AE005579	4749-4427	88				
6-43r	AE005642	8727-8004	98				
6-46f	AE005579	4749-4275	89				
9-30r	AE005581	7553-8198	99				
10-5r	AE005638	2136-1448	98				
10-12f	AE005337	6593-5966	97				
10-13r	AE005580	11413-11659	95				
	AE005581	1-362	92				
10-24f	AE005396	5550-6010	95				
10-30f	AE005386	576-1113	93				
10-36r	AE005582	8211-8951	97				
10-38r	AE005213	8528-9190	92				

Tab. G-I.4.: Sequenzen der Cosmid-Insertfragmente der Cosmid-Genbank des Stammes 493/89, welche Homologien zu Plasmid-Sequenzen besitzen. Aufgeführt sind sowohl Fragmente, die an einem Ende und an beiden Enden ansequenziert werden konnten. Die Sequenz mit der Accession.-Nr. AF074613 ist die Sequenz des Plasmids pO157 des STEC O157:H7-Stammes EDL933.

Klon-Name	Accession-Nr.	Position	Identität (%)
1-1f	AB011549	89044-89654	100
1-1r	AF112468	4068-4673	84
1-2f, 1-9f, 1-10f	AP000342	60120-60764	98
1-2r, 1-9r, 1-10r	AF074613	48240-48104	99
1-22f	AF074613	67238-66727	100
1-22r	AB011549	755-1257	100
1-23f	AF074613	67214-66617	98
1-23r	AF074613	23947-24614	99
1-28f	AF074613	20157-19469	98
1-28r	AF112468	4119-4720	84
1-32f	STY18434	1388-1443	83
1-32r	AF074613	49319-49944	98
1-40f	STY18434	1359-1443	83
1-40r	AF074613	49319-49944	98
2-5f, 2-11f	AF074613	73456-72776	97
2-14f	AF074613	20153-19461	98
2-14r	AP000342	71921-72546	84
2-22f	AF074613	20153-19433	98
2-22r	FPLTRAH	2688-3244	84
2-40f	AF074613	49105-48495	97
2-40r	AF005044	6064-6615	97
3-28f	AP000342	71492-71038	95
3-28r	AF074613	52366-52988	99
3-31f	AP000342	71877-71155	90
3-31r	AF074613	54579-54849	97
3-43f	AP000342	71877-71263	89
3-43r	AF074613	56276-56881	95
4-8f	AP000342	65077-64453	97
4-12f	AP000342	76944-76449	96
4-16f	U01159	13080-12492	98
4-37f	AP000342	71877-71198	90
4-40f	FPLREPFIB	1950-1692	96

Tab. G-II.1.: Durch den *E. coli* K-12-Makroarray ermittelte offene Leserahmen, die sowohl in SF STEC O157:H7 -Stamm 493/89 als auch in STEC O157:H7–Stamm EDL933 fehlen. Die Genbezeichnung in Klammern weist auf die ursprüngliche *E. coli* K-12-Bezeichnung nach Blattner *et al.* [1997] hin.

Genbezeichnung	Funktion
b0165, b1030, b1364, b1367, b1965, b2191, b2641, b4286, <i>yabQ</i> , <i>yafU</i> (b0218), <i>yagJ</i> , <i>yagK</i> , <i>yagM</i> (b0279), <i>ybfB</i> , <i>ybiA</i> , <i>yefZ</i> (b1121), <i>yecD</i> , <i>ydaG</i> (b1355), <i>ydbA_1</i> , <i>ydbL</i> (b1383), <i>yedN</i> (b1934), <i>yffN</i> (b2445), <i>yjfM</i> (b2629), <i>yjfO</i> (b2631), <i>yjfV</i> (b2640), <i>yghO</i> (b2981), <i>yhcE</i> , <i>yjbL</i> , <i>yjgX</i> , <i>yjhD</i> , <i>yjhU</i> , <i>ykfl</i> (b0245), <i>ymfA</i> (b1122), <i>ymfE</i> (b1138), <i>ymfG</i> (b1141), <i>ymfI</i> (b1143), <i>ymfJ</i> (b1144), <i>ymfO</i> (b1151), <i>ymfP</i> (b1152), <i>ymfQ</i> (b1153), <i>ymfR</i> (b1150), <i>ymfS</i> (b1155), <i>ynaK</i> (b1365), <i>ynbE</i> (b1382), <i>ypjF</i> (b2646), <i>yrhA</i> (b3443), <i>yrhB</i>	unbekannt
	b0359 vermutlich Transferase
	b3694 vermutlich Transkriptionsregulator
b2333, b2335, <i>yadC</i> , <i>yadL</i> , <i>yadM</i> , <i>ybgD</i>	vermutlich Fimbrienproteine
<i>dsdC</i>	D-Serin-Dehydratase (Deaminase)- Transkriptionsaktivator
<i>ecpD</i>	Wahrscheinlich Pilin-Chaperon (ähnlich zu PapD)
<i>fecB</i>	Zitratabhängiger Eisen(III)-Transport, periplasmatisches Protein
<i>fecC</i>	Zitratabhängiges Eisen(III)-Transportprotein, cytosolisch
<i>fecI</i>	Zitratabhängiger Eisentransport, membrangebundenes Protein
<i>fecR</i>	Fec-Operon-Regulator, periplasmatisch
<i>gntV</i>	Thermosensitive Gluconokinase
<i>hofG</i> , <i>hofH</i>	vermutlich allgemeine Sekretionsproteine
<i>lit</i>	Element der späten Genexpression der Phage T4
<i>paaY</i> (b1400), <i>ydbP</i> (b1390), <i>ynbF</i> (b1389)	Phenylelessigsäureabbau
<i>pheL</i>	Chorismat-Mutase-P-Prephenat-Dehydratase
<i>pinO</i>	Calciumbindendes Protein, benötigt für Initiierung der chromosomalen Replikation
<i>rfaI</i>	(Glucosyl)-Lipopolysaccharid-alpha-1,3-D- Galactosyltransferase
<i>rfaP</i> , <i>rfaS</i> , <i>rfaZ</i>	Lipopolysaccharid-Hüllenbiosynthese
<i>rfbB</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase
<i>rpiR</i>	Transkriptionsrepressor der <i>rpiB</i> -Expression
<i>tnaL</i>	Tryptophanase
<i>yagF</i>	vermutlich Dehydratase
<i>yaiP</i> (b0363)	Polysaccharid-Metabolismus
<i>ybcM</i> (b0546)	vermutlich ARAC-Typ-Regulationsprotein
<i>yehA</i> , <i>yehD</i>	vermutlich Typ-1-Fimbrienproteine
<i>ygbI</i> (b2735)	vermutlich DEOR-Regulator der Transkription
<i>yhcF</i> (b3219)	vermutlich Regulator der Transkription
<i>yi5B</i>	IS150 Transposase
<i>yi8I_1</i>	IS186 -Protein
<i>yi82_1</i>	IS186- und IS421-Protein

Fortsetzung Tab. G-II.1.:

Genbezeichnung	Funktion
<i>yidW</i>	Regulatorprotein für Dgo Operon
<i>yjhL</i>	vermutlich Phosphotransferase Enzym IIA
<i>yjhQ</i>	vermutlich Acetyltransferase
<i>ymfD</i> (b1137)	vermutlich SAM-abhängige Methyltransferase
<i>yqiH</i> (b3047)	vermutlich Membranprotein

Tab. G-II.2.: Durch den *E. coli* K-12-Makroarray ermittelte für SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 und STEC O157:H7-Stamm EDL933 spezifisch fehlenden Leserahmen, für die bisher keine Funktion ermittelt werden konnte.

Spezifisch für 493/89	b1228, b1933, b2334, b2363, <i>yffJ</i> (b2626), b2635, <i>yffX</i> (b2643), <i>yafX</i> , <i>ycfK</i> , <i>yhhH</i> , <i>yjgZ</i>
Spezifisch für EDL933	b0302, b0362, b1146, b1171, b1172, b1354, b1551, b1555, b1565, b1567, b2083, b2971, b2973, b3021, b3022, b3027, <i>cspI</i> (b1552), <i>rem</i> , <i>yaiS</i> , <i>ybaM</i> , <i>ybbD</i> , <i>ybfG</i> , <i>ycgX</i> (b1161), <i>ycgY</i> (b1196), <i>ycgZ</i> (b1164), <i>ydaC</i> , <i>ydaQ</i> (b1346), <i>ydaS</i> (b1357), <i>ydaT</i> (b1358), <i>ydfK</i> (b1544), <i>ydfO</i> (b1549), <i>ydyY</i> (b1366), <i>yedM</i> (b1935), <i>yffR</i> (b2634), <i>ygcB</i> , <i>yghT</i> (b2986), <i>yhfU</i> , <i>yhfX</i> , <i>yhfY</i> , <i>yhfZ</i> , <i>ymfH</i> (b1142), <i>yigF</i> , <i>yigG</i> , <i>yjhE</i> , <i>yjgW</i> , <i>ykgF</i> , <i>ymlL</i> (b1147), <i>ymgA</i> (b1165), <i>ymgB</i> (b1166), <i>ymgC</i> (b1167), <i>ynaE</i> (b1375)

Tab. G-III.: Im Pathoarray sowohl in STEC O157:H7-Stamm EDL933 und in SF STEC O157:H⁻-Stamm 493/89 positiv hybridisierende spezifische DNA-Sequenzen von Virulenz-assoziierten Genbereichen.

¹: APEC: Affenpathogene *E. coli* (Avian Pathogenic *E. coli*)

²: ExPEC: mit extraintestinalen Erkrankungen assoziierte *E. coli*

³: Sequenz noch nicht publiziert

Genbezeichnung	Kategorie	Accession-No.	Funktion
<i>chuA</i>	UPEC	AF280396	Häminrezeptor
CS3	ETEC	M35657	Pilus, Hauptuntereinheit
<i>dafaD</i>	EPEC	AF325672	Fibrilläres Adhärenz-Adhäsion
<i>eae</i>	EPEC/EHEC	AF071034	Intimin (Adhäsionsprotein)
EHEC _{hlyA}	EHEC	AF074613	Hämolyisin
<i>escC</i>	EPEC/EHEC	AF071034	Typ III Sekretions-System
<i>escN</i>	EPEC/EHEC	AF071034	Typ III Sekretions-System
<i>escS</i>	EPEC/EHEC	AF071034	Typ III Sekretions-System
<i>espA</i>	EPEC/EHEC	AF071034	EPEC secreted proteins, Adhäsion
<i>espB</i>	EPEC/EHEC	AF071034	EPEC secreted proteins, Adhäsion
<i>espD</i>	EPEC/EHEC	AF071034	EPEC secreted proteins, Adhäsion
<i>faeG</i>	ETEC	V00292	K88-Fimbrie, Hauptuntereinheit
<i>fanC</i>	ETEC	M35282	K99-Fimbrie, Hauptuntereinheit
<i>fepC</i>	UPEC/EHEC	AF081283	Eisen-Enterobactin-Transport, ATP-bindendes Protein FepC
<i>fimA</i>	APEC ¹	Z37500	Typ 1 Fimbrie
<i>fimB</i>	APEC ¹	Z37500	Typ 1 Fimbrie
<i>fimC</i>	APEC ¹	Z37500	Typ 1 Fimbrie
<i>fimD</i>	<i>E. coli</i> K-12	X51655	Typ 1 Fimbrie
<i>fimE</i>	APEC ¹	Z37500	Typ 1 Fimbrie
<i>fimF</i>	ExPEC ²	X05672	Typ 1 Fimbrie
<i>fimG</i>	ExPEC ²	X05672	Typ 1 Fimbrie
<i>fimH</i>	ExPEC ²	X05672	Typ 1 Fimbrie
<i>fimI</i>	APEC ¹	Z37500	Typ 1 Fimbrie
<i>kpsC</i>	ExPEC ²	AF127177	Kapsel-Exportprotein KpsC
<i>kpsS</i>	ExPEC ²	AF127177	Kapsel-Exportprotein KpsS
<i>kpsX</i>	ExPEC ²	U35467	Kapsel-Exportprotein KpsX
<i>lt</i>	ETEC	X83966	Hitzelabiles Enterotoxin
<i>ModD</i>	ExPEC ² , EHEC	AF081283	Molybdän-Transportprotein
PAI I- <i>inta</i>	Pai1-UPEC 536	AJ488511	ähnlich zu einer Bakteriophage P4-Integrase
PAI I- <i>intb</i>	Pai1-UPEC 536	AJ488511	ähnlich zu einer Bakteriophage P4-Integrase
PAI I-ORF2	Pai1-UPEC CFT073	AF081283	Homolog zu <i>Haemophilus influenzae</i> yc73-Protein
PAI I ORF15	PAI1-UPEC 536	AJ488511	vermutlich Untereinheit eines fimbriellen Adhäsins
PAI I-ORF11	Pai1-UPEC 526	AJ488511	vermutlich Insertionssequenz
PAI I-ORF33	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF34	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF53	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF54	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF67	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF75	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF76	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF77	Pai1-UPEC 536	AJ488511	vermutlich DNA-Reparatur

Fortsetzung Tab. G-III.:

Genbezeichnung	Kategorie	Accession-No.	Funktion
PAI I-ORF78	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI I-ORF82	Pai1-UPEC 536	AJ488511	unbekannt
PAI II-ORF48	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI II-ORF74	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI II-ORF81	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI II-ORF82	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI II-ORF83	Pai2-UPEC 536	AJ494981	vermutlich DNA-Reparatur
PAI II-ORF85	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI II-ORF86	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI II-ORF87	Pai2-UPEC 536	AJ494981	unbekannt
PAI III-ORF8	PAI3-UPEC 536	X16664	unbekannt
PAI III-ORF5	Pai3-UPEC 536	X16664	unbekannt
PAI III-ORF34	Pai3-UPEC 536	- ³	vermutlich Transposase
PAI III-ORF35	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF50	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF51	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF53	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF54	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF55	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF56	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF58	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF61	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
PAI III-ORF62	Pai3-UPEC 536	- ³	unbekannt
<i>perD</i>	EPEC	Z48561	Teil eines Regulators der <i>eae</i> -Transkription
<i>prnA</i>	ExPEC ² /EHEC	U85771	TonB abhängiger Außenmembranrezeptor
Z0615	EHEC	AE005229	vermutlich Exoprotein der RTX (repeat toxin)-Familie
<i>pssA</i>	EHEC	Y13614	(Serin-)Protease
<i>stx2a</i>	EHEC	AF291819	Shiga Toxin 2a
<i>stx2b</i>	EHEC	AF291819	Shiga Toxin 2b
<i>tag</i>	EPEC	AF081283	Transglycosylase-ähnlich, benötigt für Bfp (bundle forming pili)-Produktion
<i>tir</i>	EHEC	AF071034	Intiminrezeptor
Z0250	EHEC	AE005197	vermutlich Makrophagen-Toxin
Z1142	EHEC	AE005271	vermutlich Urease-Hilfsprotein
Z1542	EHEC	AE005304	vermutlich Exoprotein, homolog zu ShlA/HecA/FhaA
Z4196	EHEC	AE005515	vermutlich sezerniertes Protein
Z4321	EHEC	AE005527	vermutlich PagC-ähnliches Membranprotein
Z4326	EHEC	AE005527	vermutlich Enterotoxin
Z4852	EHEC	AE005571	vermutlich Acyltransferase für Phospholipid-Biosynthese

Tab. G-IV.: STEC O157-Stämme der Stammsammlung von Prof. Karch, Institut für Hygiene, Münster, die für die PCR-Untersuchung der Präsenz von *efa1/lifa*, *cdt* und der 8,8 Kb großen spezifischen SRL-homologen Sequenz von Stamm 493/89 verwendet wurden. Neben den PCR-Ergebnissen ist der Hämolyse- und Sorbitfermentations-Phänotyp sowie der *stx*-Genotyp angegeben. Zuerst sind die O157:H⁻ - und zuletzt die O157:H7-Stämme aufgelistet. *: nicht getestet

Stamm	Serotyp	Art der Erkrankung	stx-Genotyp	Sorbit-Fermentation	Hämolyse	PCR 1-3 SRL	PCR <i>efa1/lifa</i>			PCR1-3 <i>cdt</i>
							PCR1	PCR2	PCR3	
493/89	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
296/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
1533/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
1995/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	*	+	+	+	+
2471/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
3072/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
3816/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	*	+	+	+	+
5869/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	+	*	+	+	+	+
15998/96	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
16110/96	O157:H ⁻	Diarrhoe	2	+	-	+	+	+	+	+
340/97	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	*	+	+	+	+
4180/97	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	*	+	+	+	+
3573/98	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
4368/98	O157:H ⁻	HUS	2	+	+	+	+	+	+	+
2584/99	O157:H ⁻	HUS	2	+	+	*	+	+	+	+
2696/99	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	*	+	+	+	+
4100/99	O157:H ⁻	HUS	2	+	+	*	+	+	+	-
5376/99	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
301/00	O157:H ⁻	HUS	2	+	-	+	+	+	+	+
EDL933	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	+	+	+	+	-
4011/93	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	+	+	+	+	-

Fortsetzung Tab. G-IV.

Stamm	Serotyp	Art der Erkrankung	stx-Genotyp	Sorbit-Fermentation	Hämolyse	PCR 1-3 SRL	PCR <i>efal/tif4</i>			PCR1-3 <i>cht</i>
							PCR 1	PCR 2	PCR 3	
3010/96	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	*	+	-	-	+
3232/96	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	-	+	-	-	-
4366/96	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	-	+	-	-	-
4391/96	O157:H7	HUS	1,2	-	+	-	+	-	-	-
4597/96	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	-	+	-	-	+
5900/96	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	*	+	-	-	-
6334/96	O157:H7	HUS	2	-	+	-	+	-	-	-
6831/96	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	-	+	-	-	-
7898/96	O157:H7	HUS	2	-	+	*	+	-	-	-
2575/97	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	*	+	-	-	-
3602/97	O157:H7	Diarrhoe	2	-	+	*	+	-	-	-
4589/97	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	*	+	-	-	-
6468/97	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	*	+	-	-	-
2857/98	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	-	+	-	-	-
3205/98	O157:H7	HUS	2	-	+	*	+	-	-	-
865/99	O157:H7	Diarrhoe	2,2c	-	+	-	+	-	-	-
1867/99	O157:H7	HUS	2,2c	-	+	-	+	-	-	-
4544/99	O157:H7	Diarrhoe	1,2c	-	+	*	+	-	-	-
2483/00	O157:H7	HUS	2	-	+	*	+	-	-	-

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Genomische Unterschiede zwischen Shiga Toxin-Produzierenden *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 und Sorbitol Fermentierenden (SF) STEC O157:H⁻ -Stämmen“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Andreas Janka

Lebenslauf

Name: Andreas Janka
Anschrift: Theresienstraße 15, 97070 Würzburg
Geboren: 15. 05. 1971 in Marburg/Lahn
Religion: evangelisch
Eltern: Rudolf Janka, Schlosser
Elisabeth Janka, geb. Wenzel, Schneiderin

Schulausbildung: September 1977 bis Juni 1981
Grundschule I Stadtallendorf
August 1981 bis Juni 1987
Gesamtschule Stadtallendorf
August 1987 bis Juni 1990
Oberstufe der Gesamtschule Kirchhain
Juni 1990: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: September 1990 bis November 1991
Hausmeister und Gärtner im Alten- und Pflegeheim
am Rotenberg in Marburg/Lahn

Studium März 1992 bis Juni 1996
Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Juni 1996: Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 1997: Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
August 1997: Erhalt der Approbation als Apotheker
Oktober 1997 bis Dezember 1999
Studium der Lebensmittelchemie an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Dezember 1999: Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Praktikum Juni 1996 bis Juni 1997
Praktische Ausbildung als Pharmaziepraktikant in der
Renner'schen Apotheke in München und in der Firma
LILLY Deutschland GmbH in Gießen in der Qualitätskontrolle

Promotion Februar 2000 bis Dezember 2002
Anfertigung der Dissertation am Institut für Hygiene und
Mikrobiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-
Universität Würzburg und am Institut für Hygiene am
Universitätsklinikum Münster im Rahmen des Europäischen
Graduiertenkollegs „Gene regulation in and by microbial
pathogens“