

**Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie**

**der Universität Würzburg**

**Professor Dr. rer. nat. Jörg Vogel**

**Untersuchungen zur Verbreitung von Pathogenitätsinseln unter  
pathogenen *Escherichia coli***

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Astrid C. Frank**

**aus Lisse**

**Würzburg, Mai 2010**

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. mult. Jörg Hacker

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. T. Hünig

**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung :**  
28. Oktober 2010

**Die Promovendin ist Ärztin**

Meinen Eltern in Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1.	<i>Escherichia coli</i> und die Familie der <i>Enterobacteriaceae</i> .....	1
1.1.1.	Taxonomie und physiologische Eigenschaften .....	1
1.1.2.	Klassifikation und Typisierung .....	3
1.1.3.	‘Multilocus Sequence Typing’ (MLST) .....	4
1.1.4.	Genetische Diversität und Populationsgenetik .....	5
1.1.5.	Eisenaufnahmesysteme und die Evolution pathogener Bakterienvarianten .....	6
1.2.	Das Kerngenom, Pathogenitätsinseln (PAI) und mobile genetische Elemente .....	7
1.2.1.	Definitionen .....	7
1.2.2.	Die ‘High Pathogenicity Island’(HPI) .....	8
1.2.3.	Die Pathogenitätsinsel III des UPEC-Stammes 536 (PAI III <sub>536</sub> ) .....	10
1.3.	Insertionssequenzen (IS-Elemente) .....	12
1.3.1.	Allgemeine Struktur .....	12
1.3.2.	Typisierung aufgrund variabler chromosomaler Lokalisationen repetitiver und mobiler genetischer Elemente .....	12
1.3.3.	Das IS100 - ein Element der IS21-Familie .....	13
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	17
2.1.	Material .....	17
2.1.1.	Bakterienstämme .....	17
2.1.2.	Chemikalien und Lösungen .....	19
2.1.3.	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.4.	Nährlösungen und Nährmedien .....	20
2.1.5.	DNA-Größenmarker .....	21
2.1.6.	PCR-Primer .....	21
2.1.7.	Nukleinsäuresonden .....	22
2.1.8.	Enzyme .....	23
2.1.9.	Arbeits-Kits.....	23

2.2.	Methoden .....	23
2.2.1.	Bakterienanzucht und Kultivierung .....	23
2.2.2.	Isolierung chromosomaler DNA .....	24
2.2.3.	Isolierung von Plasmid-DNA .....	25
2.2.4.	Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA .....	26
2.2.5.	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR)) .....	26
2.2.6.	DNA-Sequenzierung .....	28
2.2.7.	‘Multilocus Sequence Typing’ (MLST) von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	28
2.2.8.	Aufreinigung von DNA .....	29
2.2.9.	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	30
2.2.10.	Horizontale Gelelektrophorese .....	31
2.2.11.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	31
2.2.12.	‘Southern-Blotting’ und Hybridisierungsexperimente .....	32
2.2.12.1.	DNA-Transfer auf Nylonmembranen (‘Southern-Blotting’) .....	32
2.2.12.2.	Markieren der IS100-Sonde .....	32
2.2.12.3.	‘Southern Blot’-Hybridisierung mit der markierten IS100-Sonde .....	33
2.2.12.4.	Markieren der 17 bp-Oligonukleotidsonde .....	33
2.2.12.5.	‘Southern Blot’-Hybridisierung mit der markierten Oligonukleotidsonde .....	34
2.2.13.	DNA-Klonierung .....	35
2.2.13.1.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	35
2.2.13.2.	Auffüllen 5'- überhängender DNA-Einzelstrangenden .....	35
2.2.13.3.	DNA-Ligation .....	36
2.2.13.4.	Herstellung kompetenter Bakterienzellen (für Calciumchlorid/Hitzeschock-Transformation) .....	36
2.2.13.5.	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen .....	36
2.2.13.6.	Blau-Weiß Screening (X-Gal-Test) .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1.	‘Multilocus Sequence Typing’(MLST) von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	38
3.1.1.	Typisierung und Zuordnung zu bekannten Sequenztypen (ST) .....	38
3.1.2.	Identifizierung neuer Sequenztypen (ST).....	40
3.1.3.	Phylogenetische Analyse .....	40

3.2.	Untersuchungen zur Verbreitung <i>des irp / fyuA</i> - Genclusters und der PAI III <sub>536</sub> .....	43
3.2.1.	PCR-Nachweis der Gene <i>irp2</i> und <i>fyuA</i> .....	43
3.2.2.	‘Southern Blot’-Hybridisierung zum Nachweis einer 17 bp-DR-Sequenz .....	44
3.2.3.	PCR-Nachweis zweier Fragmente des äußersten 5`-Bereiches der PAI III <sub>536</sub> .....	46
3.3.	Untersuchungen zur Verbreitung des <i>IS100</i> .....	46
3.3.1.	Nachweis des <i>IS100</i> im Chromosom des UPEC-Stammes 536 .....	47
3.3.2.	PCR-Nachweis des <i>IS100</i> .....	48
3.3.3.	Korrelationsanalyse <i>IS100</i> – HPI .....	49
3.3.4.	‘Southern Blot’-Hybridisierungen zum Nachweis des <i>IS100</i> .....	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>52</b>
4.1.	MLST und phylogenetische Analyse .....	53
4.2.	Verbreitung der HPI und der PAI III <sub>536</sub> .....	54
4.3.	Verbreitung des <i>IS100</i> .....	58
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>74</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. *Escherichia coli* und die Familie der *Enterobacteriaceae*

### 1.1.1. Taxonomie und physiologische Eigenschaften

Die Familie der *Enterobacteriaceae* zählt zur Klasse der  $\gamma$ -Proteobakterien und umfaßt zur Zeit 47 Genera (s. Tab. 1-1). Mehr als 95 % der klinisch bedeutsamen Stämme lassen sich 10 Genera und weniger als 25 Spezies zuordnen. *Enterobacteriaceae* zeigen eine weltweite Verbreitung als saprophytäre, pflanzen-, tier- und menschenkommensale bzw. -parasitäre Mikroorganismen. Viele Spezies sind aufgrund ihrer Pathogenität von großer klinischer und bisweilen auch ökonomischer Bedeutung.

*Enterobacteriaceae* sind Gram-negative, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige, nicht-sporulierende Bakterien. Zur Gattung *Escherichia* zählen neben der erstmals von dem Kinderarzt Theodor Escherich unter dem Namen *Bacterium coli commune* isolierten Spezies *Escherichia coli* die Arten *E. adecarboxylata*, *E. albertii* (Huys *et al.*, 2003), *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* und *E. vulneris*. *E. coli* und die 4 Arten des Genus *Shigella* bilden aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft eine Spezies. Biochemisch sind sie häufig schwer zu unterscheiden, und bestimmte *E. coli*-Stämme verursachen ebenfalls ein dysenterisches Krankheitsbild. Dennoch werden die verschiedenen Gattungen aus praktischen Gründen beibehalten. Die Spezies *E. coli* umfaßt neben apathogenen kommensalen Stämmen des Intestinaltraktes von Menschen und Tieren zahlreiche pathogene Varianten, die sowohl intestinale (Intestinal Pathogene *E. coli*, IPEC), als auch extraintestinale Krankheitsbilder, wie Harnwegsinfekte, Neugeborenenmeningitis oder eine *E. coli*-bedingte Sepsis hervorrufen können (Extraintestinal Pathogene *E. coli*, ExPEC). Vogelpathogene *E. coli* (engl. Avian Pathogenic *E. coli*, APEC) weisen zahlreiche Ähnlichkeiten zu bislang untersuchten ExPEC auf und sind für Ausbrüche einer *E. coli*-bedingten Septikämie beispielsweise in der Geflügelzucht verantwortlich.

**Tab. 1-1: Familie der *Enterobacteriaceae***

Nach Euzéby: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN), Stand 2009.

<b>Genera</b>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Morganella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Arsenophonus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Samsonia</i>
<i>Biostraticola</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Serratia</i>
<i>Brenneria</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Shigella</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Photorhabdus</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pragia</i>	<i>Thorsellia</i>
<i>Calymmatobacterium</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Proteus</i>	<i>Trabulsiella</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Leclercia</i>	<i>Providencia</i>	<i>Wigglesworthia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Leminorella</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Levinea</i>	<i>Raoultella</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Dickeya</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Saccharobacter</i>	<i>Yokenella</i>

Die meisten *E. coli*-Stämme können zahlreiche Zucker durch Ameisensäuregärung bzw. gemischte Säuregärung fermentieren. Die meisten Bakterienstämme dieser Art zeigen daher eine negative Voges-Proskauer-Reaktion, können Glukose unter Gasbildung verwerten, Nitrat zu Nitrit reduzieren, sind Oxidase-, Citrat-, Urease- und Wasserstoffsulfid-negativ sowie Indol-positiv. In ihren grundlegenden metabolischen Eigenschaften unterscheiden sich pathogene *E. coli*-Stämme in der Regel selten von apathogenen Stämmen.

**Tab. 1-2: Grundlage für die Einteilung der Spezies *E. coli* in humanpathogene Bakterienvarianten**

<b>Abkürzung</b>	<b>Pathotyp</b>	<b>Grundlage für die Eingruppierung</b>
<b>EIEC</b>	Enteroinvasive <i>E. coli</i>	pINV
<b>ETEC</b>	Enterotoxische <i>E. coli</i>	ST, LT
<b>EPEC</b>	Enteropathogene <i>E. coli</i>	<i>eae</i> , <i>bfp</i>
<b>EAEC</b>	Enteroaggregative <i>E. coli</i>	Adhärenz an epitheliale Hep2-Zellen
<b>EHEC</b>	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>	<i>stx</i> , <i>eae</i> , Virulenzplasmid
<b>DAEC</b>	Diffus Adhärierende <i>E. coli</i>	Diffuse Adhärenz an epitheliale Hep2-Zellen
<b>UPEC</b>	Uropathogene <i>E. coli</i>	Isoliert bei Zystitis und Nephritis
<b>MENEC</b>	Meningitis- <i>E. coli</i>	Isoliert bei Neugeborenen-Meningitis
<b>SEPEC</b>	Septikämische <i>E. coli</i>	Isoliert bei Septikämie

pINV: Invasivität bedingendes Virulenzplasmid; ST/LT: Hitzestabiles/Hitzelabiles Toxin; *eae*: Vorhandensein der Gene für Intimin; *bfp*: Bundle-Forming Pilus-Gencluster; *stx*: Shiga-Toxin-Gene



### 1.1.2. Klassifikation und Typisierung

In der Bakterienklassifikation erfolgt die systematische Einteilung in Ordnungen, Familien und Gattungen bis hin zu einer Intraspezies-Einteilung in Varianten. Für die Spezies *E. coli*, deren natürliches Reservoir der Intestinaltrakt von Säugetieren und Vögeln ist, erlaubt die Feststellung des Vorkommens bzw. Fehlens von Pathogenitäts- bzw. Virulenzdeterminanten die Abgrenzung zahlreicher pathogener Varianten zu kommensalen apathogenen Stämmen. Die Zuteilung klinischer Isolate zu Pathotypen kann, ebenso wie klassische Einteilungen beispielsweise nach Antibiotikaresistenzen, von klinischer Bedeutung sein und korreliert häufig mit charakteristischen Krankheitsbildern.

Die Typisierung von Bakterien unterscheidet zwischen einzelnen Isolaten. Genetische Typisierungsverfahren sind unter Nachweis geeigneter Sequenzen in der Lage, klonale Gruppierungen zu identifizieren und zu benennen, und somit enge evolutionäre Verwandtschaften widerzuspiegeln. Für die Spezies *E. coli* wurden seit längerer Zeit unter anderem die Multilocus-Enzymelektrophorese (MLEE) oder eine 16SrRNA-Sequenzanalyse verwendet, um Stämme ihrer genetischen Verwandtschaft entsprechend zu gruppieren. MLEE-Daten für die 72 Isolate der ECOR-Stammsammlung, die eine zur Zeit ihrer Zusammenstellung bekannte Diversität der Spezies *E. coli* repräsentieren (H. Ochman and R.K. Selander, 1984), erlaubten bereits in der Vergangenheit eine Zuteilung von *E. coli*-Isolaten zu phylogenetischen Gruppen, im wesentlichen A, B1, B2, und D. Die Einteilung in die phylogenetischen Gruppen erfolgt aufgrund elektrophoretischer Typen, die Allozymprofilen der 72 ECOR-Stämme entsprechen. Es wurden Daten für insgesamt 35 Enzyme erhoben (Selander *et al.*, 1986; Selander *et al.*, 1987), ergänzt durch die Daten für die Allozyme für 3 Esterase-Loci (Goulet und Picard, 1989). Die 38-Locus Multilocus-Genotypen dienten der Erstellung eines Dendrogramms nach der 'neighbour-joining'-Methode (Herzer *et al.*, 1990). Aufgrund methodischer Vorteile gegenüber anderen Verfahren, ist seit einigen Jahren das 'Multilocus Sequence Typing' (MLST) zum Goldstandard in der Typisierung zahlreicher Bakterienarten und *E. coli* geworden (Urwin and Maiden, 2003).

### 1.1.3. 'Multilocus Sequence Typing' (MLST)

Das 'Multilocus Sequence Typing' (MLST) (Maiden *et al.*, 1998) ist eine Methode, die sich auch für die genetische Typisierung von *E. coli*-Stämmen durchgesetzt hat. Das MLST zeichnet sich durch eine gute Auflösung, Interpretierbarkeit, Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen aus (Foxman *et al.*, 2005; Tartof *et al.*, 2005; Aguiar-Alves *et al.*, 2006) und ist im allgemeinen besonders für eine Unterscheidung eng verwandter Bakterien oder Typisierungen innerhalb einer Spezies geeignet. Nach einem Protokoll, das in dieser Arbeit verwendet wurde und das auf dem Sequenzieren interner Fragmente der sieben 'housekeeping'-Gene *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA* (s. Tab. 1-3) beruht, sind *E. coli*-Isolate inzwischen in großer Zahl typisiert worden (Wirth *et al.*, 2006).

**Tab. 1-3: *E. coli*-MLST nach Wirth *et al.* 2006**  
Sequenzierte und typisierte 'housekeeping'-Gene

<b>Gen</b>	<b>Genprodukt bzw. Funktion</b>
<i>adk</i>	Adenylatkinase
<i>fumC</i>	Fumarathydratase
<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase
<i>icd</i>	Isocitrat / Isopropylmalatdehydrogenase
<i>mdh</i>	Malatdehydrogenase
<i>purA</i>	Adenylosuccinatdehydrogenase
<i>recA</i>	RecA-Protein

'Housekeeping'-Gene kodieren essentielle Funktionen eines Bakteriums und sind Teil des Kerngenomes (vgl. 1.2.1.). Sie zeichnen sich durch eine relativ langsame Evolutionsrate aus. Für das MLST werden die in einem Bakteriengenom für die sequenzierten Genfragmente vorliegenden Allele nummeriert und Kombinationen von Allelnummerierungen zu einem, wiederum mit einer Zahl versehenen Sequenztyp (ST) zusammengefaßt. Das in dieser Studie angewandte Schema zur MLST-Typisierung von *E. coli*-Stämmen umfaßt derzeit über 600 verschiedene Sequenztypen, die 54 verschiedenen ST-Komplexen zugeordnet werden (<http://mlst.ucc.ic/mlst/dbs/Ecoli>). ST des gleichen ST-Komplexes unterscheiden sich in maximal zwei Allelen. ST-Komplexe sind häufig mit bestimmten Virulenzphänotypen assoziiert (Wirth *et al.*, 2006).

#### 1.1.4. Genetische Diversität und Populationsgenetik

Mutationen, besonders jedoch genetische Rekombinationen und die Mechanismen des horizontalen Gentransfers sind Triebkräfte prokaryoter Evolution (W. Arber, 1993; Hacker and Kaper, 2000; Brussow *et al.*, 2004). Der Verlust und die Acquisition genetischen Materials durch die Mechanismen des horizontalen Gentransfers können eine große genetische und phänotypische Varianz auch unter phylogenetisch eng verwandten Stämmen verursachen (Ochman *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2002).

*E. coli* ist als eine prototypisch klonale Bakterienart beschrieben worden, da der Beitrag genetischer Rekombinationen zur Populationsstruktur vergleichsweise gering zu sein schien (Reid *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, daß Rekombinationsraten besonders in Hybridstämmen, die auf Vorläuferbakterien verschiedener phylogenetischer Linien zurückgehen, erhöht sind und ein Drittel aller *E. coli*-Isolate eines repräsentativen Kollektives, sowie ein höherer Anteil aller pathogenen *E. coli*-Stämme den Hybridgruppen AxB1 und ABD zuzurechnen sind (Wirth *et al.*, 2006). Die Spezies *E. coli* weist eine geno- und phänotypische Diversität auf, die sich in der Existenz einer Vielzahl von Ökotypen und intestinalen, sowie extraintestinalen Pathotypen zeigt (Dobrindt *et al.*, 2003). Virulenzdeterminanten scheinen sich in bestimmten phylogenetischen Linien dieser Spezies zu häufen und hyper-mutierende, hyper-rekombinante *E. coli*-Subpopulationen sind sowohl in Laborexperimenten, als auch unter natürlich vorkommenden Isolaten beschrieben worden (Cooper and Lenski, 2000; Denamur *et al.*, 2000). Wenn nur kleine Fragmente relativ selten übertragen werden, können klonale Populationsstrukturen trotz vorkommender Rekombinationen bestehen bleiben (Milkman and Bridges, 1990; Maynard Smith *et al.*, 1993; Maiden, 1993). Versuche, die klonale Populationsstruktur der Spezies *E. coli* durch phylogenetische Rekonstruktionen der verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den Hauptgruppen weltweit isolierter moderner *E. coli*-Isolate nachzuweisen, gelangen in neueren Studien nicht. Während innerhalb der ECOR-phylogenetischen Gruppe A Mutationen die hauptsächlich treibende evolutionäre Kraft darstellen, spielen Rekombinationen in den übrigen Gruppen die Hauptrolle (Wirth *et al.*, 2006). Insgesamt ist die Populationsgenetik pathogener Bakterienarten sehr

verschieden; die Populationsstrukturen wurden in ihren Extremen als klonal, panmiktisch und epidemisch beschrieben, repräsentiert durch die Spezies *Salmonella enterica*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* (Maynard Smith *et al.*, 1993; M. Achtman, 2001, Falush *et al.*, 2001).

### **1.1.5. Eisenaufnahmesysteme und die Evolution pathogener Bakterienvarianten**

Unter einer bakteriellen Pathovariante oder einem Pathovar werden Stämme einer Art verstanden, die aufgrund identischer oder nahezu identischer Virulenzfaktoren ähnliche Krankheitssymptome verursachen können (Kaper *et al.*, 2004). Es gibt eine Vielzahl bakterieller Pathogenitäts- und Virulenzstrategien, und häufig ist die Kombination mehrerer Faktoren charakteristisch für eine bestimmte Variante einer Spezies. Eine universelle bakterielle Strategie zur Verbesserung der Fitness, die zahlreiche pathogene *E. coli*-Stämme von apathogenen kommensalen Stämmen unterscheidet, ist die Fähigkeit, Eisen über multiple Eisenaufnahmesysteme aufzunehmen. Das Vorliegen einer Vielzahl von Chelatoren ermöglicht die Adaptation an Umgebungsbedingungen, die mit einem Mangel an freiem Eisen einhergehen (Torres *et al.*, 2001). Der *E. coli*-Eisenstoffwechsel ist gut untersucht (Braun and Braun, 2002); als Eisen liefernde Chelatoren dienen beispielsweise Citrat, Enterobactin, Aerobactin, Yersiniabactin oder Häm. Diese Chelatoren können über die äußere Membran der Bakterien aufgenommen werden und passieren die Zytoplasmamembran über ATP-abhängige Transportsysteme.

Die für Eisenaufnahmesysteme kodierenden Sequenzen sind, wie andere bakterielle Fitnessfaktoren, häufig Bestandteile horizontal transferierter Sequenzbereiche. In vielen Fällen sind mobile genetische Elemente oder deren Fragmente an Mechanismen beteiligt, die zu einem Verlust, einer Neuordnung oder, wie im Falle des Erwerbs von Eisenaufnahmesystemen, dem Zugewinn genetischen Materials führen. Mobile genetische Elemente wie integrierte Bakteriophagen, Plasmide, Integrons, Transposons, sowie Genomische- oder Pathogenitätsinseln sind häufige Träger bakterieller Pathogenitäts-, Virulenz- oder Fitnessdeterminanten (Hacker *et al.*, 1983; Hacker and Kaper, 2000; Carniel and Hacker, 2001). Bedingt durch ihre Mobilität tragen mobile Elemente, indem sie eine Evolution in 'Quantensprüngen' ermöglichen (Groisman and Ochman, 1996; H. Ochman, 2001), in entscheidendem Maße zur genetischen Plastizität,

und somit auch zur Evolution pathogener Bakterienvarianten bei (Cheetham and Katz, 1995; Datz *et al.*, 1996; Boyd and Hartl, 1997; Hacker *et al.*, 1997; Achtman *et al.*, 1999, Mahillon *et al.*, 1999; Klee *et al.*, 2000).

## **1.2. Das Kerngenom, Pathogenitätsinseln (PAI) und mobile genetische Elemente**

### **1.2.1. Definitionen**

Unter dem Kerngenom versteht man das 'genomische Rückgrad' eines bakteriellen Genomes, dessen Sequenzen sich strukturell durch einen überwiegend einheitlichen G+C-Gehalt und Codongebrauch auszeichnen. Es umfaßt für Kern- bzw. 'housekeeping'-Funktionen kodierende Gene. Horizontal übertragene Sequenzbereiche zeigen je nach ihrem Ursprung nicht selten einen vom Kerngenom abweichenden, uneinheitlichen G+C-Gehalt und Codongebrauch. Genomische Inseln sind größere, häufig mosaikartig zusammengesetzte, horizontal erworbene DNA-Bereiche, die Gene umfassen, die Zusatzfunktionen kodieren. Handelt es sich bei den kodierten Zusatzfunktionen um Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren, spricht man von Pathogenitätsinseln (PAI). Pathogenitätsinseln wurden erstmals beschrieben, nachdem man erkannt hatte, dass Hämolysindeterminanten des UPEC 536-Chromosomes Bestandteile größerer instabiler DNA-Bereiche sind (Hacker *et al.*, 1983; Knapp *et al.*, 1984; Hacker *et al.*, 1990; Blum *et al.*, 1994; Hacker *et al.*, 1997). Strukturelle Charakteristika einer typischen PAI umfassen (i) eine Größe von > 10 kb, (ii) die Assoziation mit einem tRNA-Gen, (iii) ein sich vom Wirtsgenom unterscheidender G+C-Gehalt, (iv) flankierende repetitive Sequenzen, (v) eine Mosaikstruktur, die eine Vielzahl funktioneller, unvollständiger oder afunktioneller putativer offener Leseraster (ORF) bekannter oder unbekannter Funktion umfaßt, sowie (vi) die Präsenz zahlreicher mobiler Elemente oder deren Fragmente (Dobrindt *et al.*, 2002). Neben Bakteriophagen können Plasmide, Integrons, diverse Subtypen von Transposons, sowie deren kleinste Vertreter, IS-Elemente, an der Entstehung, fortbestehenden Plastizität oder horizontalen Mobilität Genomischer Inseln beteiligt sein (Carniel and Hacker, 2001; Hacker *et al.*, 2003; Dobrindt *et al.*, 2004). 'Hotspots' für die Integration mobiler genetischer Elemente in eine Wirts-DNA sind beispielsweise tRNA-Gene, die für die meisten

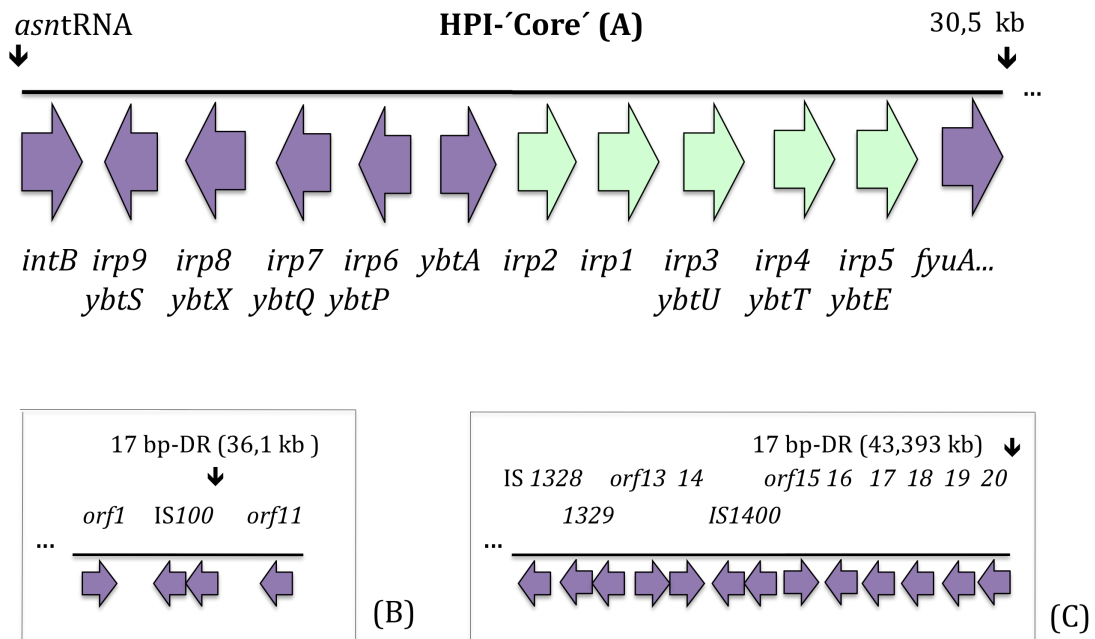
Genomischen Inseln ebenfalls den Integrationsort in ein Wirtsgenom darstellen (Reiter *et al.*, 1989; Campbell, 1992; Hacker and Kaper, 2000; Williams, 2002).

### 1.2.2. Die 'High Pathogenicity Island' (HPI)

Die 36 - 43 kb umfassende 'High Pathogenicity Island' (HPI) hochvirulenter *Yersinia*-Stämme umfaßt die elf Gene *irp 1-9*, *ybtA* und *fyuA* für die Biosynthese, den Transport und die Regulation des Siderophores Yersiniabactin, sowie eine AT-reiche variable Region (Carniel *et al.*, 1992; Fetherston *et al.*, 1992; De Almeida *et al.*, 1993; Bearden *et al.*, 1997; Buchrieser *et al.*, 1998; Pelludat *et al.*, 1998; E. Carniel, 2001). Die Gene sind im Genom aller *Y. pestis*-, sowie zahlreicher *Y. pseudotuberculosis*- und bestimmter *Y. enterocolitica*-Stämme vorhanden. Auch für eine Vielzahl weiterer Genera und Spezies der Familie der *Enterobacteriaceae*, wie *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* oder *Serratia* (Schubert *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 1999; Bach *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Olsson *et al.*, 2003; B. Lesic and E. Carniel, 2005), darunter apathogene *E. coli*-Stämme des Darmes (Rakin *et al.*, 1999), wurde ein Vorliegen des *irp / fyuA*-Genclusters gezeigt. HPI-positive *E. coli*-Stämme wurden auch von Geflügel isoliert (Gophna *et al.*, 2001). Im Genom von Bakterien anderer Familienzugehörigkeiten, beispielsweise des Genus *Pseudomonas* oder des Gram-positiven Diphtherieerregers *Corynebacterium diphtheriae*, wurden ebenfalls HPI-ähnliche Elemente nachgewiesen (C. Kunkle and M. Schmitt, 2003).

Man unterscheidet die HPI der evolutionären *Y. pseudotuberculosis / Y. pestis (Yps)*-Linie von der HPI der *Y. enterocolitica (Yen)*-Linie (Rakin *et al.*, 1995). Das *irp / fyuA*-Gencluster im Genom der Spezies *E. coli* ähnelt in seiner Organisation der Kernregion der *Yps*-HPI (Bach *et al.*, 1999). Das unter verschiedenen Genera hochkonservierte *irp / fyuA*-Gencluster (98–100 % Identität der *Y.* - und *E. coli*-Gene auf Nukleotidebene), sowie die zum Teil erhaltene Mobilität der HPI sprechen dafür, daß es sich bei der Acquisition der Insel aller Wahrscheinlichkeit nach um ein evolutionsbiologisch junges Ereignis handelt (B. Lesic and E. Carniel, 2005; Schubert *et al.*, 2009). Die *Y. pseudotuberculosis*-HPI ist lateral transferierbar, kann in jedes der drei *asntRNA*-Gene integriert sein, sowie durch ortsspezifische Rekombination zwischen zwei die Insel flankierenden 17 bp-'direct repeats' (DR) spontan exzidieren und an einem

anderen Ort des Bakterienchromosomes integrieren (Buchrieser *et al.*, 1998; Lesic *et al.*, 2004). Die einer Sequenz aus dem 3'-Bereich von *asntRNA*-Genen entsprechenden DR, sowie die Assoziation der Gene des *irp / fyuA*-Genclusters mit einem P4-homologen Integrase-Gen ließen in der Vergangenheit die Vermutung zu, daß die Insel über einen Bakteriophagen der P4-Familie in ein Vorläufergenom integriert wurde (Buchrieser *et al.*, 1998). Auch ein in jüngerer Vergangenheit beschriebenes integratives und konjugatives Element (ICE) wurde als ein putativer Progenitor der HPI beschrieben (Schubert *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 2009). Das *irp / fyuA*-Gencluster im Genom der *E. coli*-Stämme 536 (PAI IV<sub>536</sub>), 17-2, sowie DSM 6601 hat eine Länge von 30,2 kb und ist mit dem *asnTtRNA*-Gen assoziiert. Im Unterschied zur HPI des *Yersinia*-Genomes ist im Chromosom bislang untersuchter *E. coli*-Stämme das P4-homologe Integrasegen nicht intakt und das 17 bp-DR nicht konserviert. Auch die im *Y. pestis*- und *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O1-Genom vorliegende Assoziation der HPI der evolutionären *Y. pseudotuberculosis / Y. pestis* (*Yps*)-Linie mit der Sequenz eines IS100 wurde nicht nachgewiesen (Fetherston *et al.*, 1994; Schubert *et al.*, 1999). Das Yersiniabactin-System ist in der Mehrzahl untersuchter ExPEC-Stämme funktionell, welches auf eine positive Selektion des *irp / fyuA*-Genclusters hinweisen könnte (Schubert *et al.*, 2000). Die PAI IV<sub>536</sub> umfaßt im Unterschied zu den PAIs I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub> und III<sub>536</sub> ausschließlich funktionelle Offene Leseraster (engl. Open Reading Frames (ORF)). Fragmente von IS-Elementen wurden nicht nachgewiesen (Dobrindt *et al.*, 2002).



### Abb. 1-1: Genetische Struktur der High Pathogenicity Island (HPI)

Der hoch-konservierte Kern, das 'Core' der HPI (A) und der jeweilige 3'-Bereich downstream des *fyuA*-Genes der HPI der evolutionären *Yps*- (B) und *Yen*- (C) Linie sind dargestellt. Horizontale Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen für die einzelnen ORF an; vertikale Pfeile markieren das *asntRNA*-Gen, das 17 bp-DR bzw. die Größe der Inseln.

### 1.2.3. Die Pathogenitätsinsel III des UPEC-Stammes 536 (PAI III<sub>536</sub>)

Die Pathogenitätsinsel PAI III<sub>536</sub> (s. Abb. 1-2) ist eine der sechs beschriebenen Pathogenitätsinseln des UPEC-Stammes 536, der zu einem Modellstamm für die Untersuchung extraintestinaler Virulenz von *E. coli*-Stämmen geworden ist. Die PAI III<sub>536</sub> zeigt typische Charakteristika einer PAI. Die Insel hat eine Größe von 68,1 kb, wird von Sequenzen des *thrW*tRNA-Genes begrenzt und weist an ihren Enden 48 bp-DRs auf. Die Integrase-Gene *intA* und *intB* zeigen Homologien zu den jeweiligen Genen des *Shigella flexneri*-Bakteriophagen Sfx bzw. dem P4-Bakteriophagen (Dobrindt *et al.*, 2002; Hochhut *et al.*, 2006). Die PAI III<sub>536</sub> umfaßt die für S-Fimbrien und das Siderophor Salmochelin kodierenden Gencluster *sfaC-X* bzw. *iroN-B* (Dobrindt *et al.*, 2002; Wilde *et al.*, 2008).



Die PAI III<sub>536</sub> hat mit etwa  $5 \times 10^{-5}$  die höchste Grunddeletionsrate aller Pathogenitätsinseln des Stammes 536 und deletiert über einen von zwei verschiedenen Mechanismen aus dem *E. coli* 536-Chromosom; entweder über ortsspezifische Rekombination zwischen zwei 48 bp langen 'Direct Repeats' (DR), die im wesentlichen Sequenzen des *thrW*- bzw. verkürzten *thr'W*-Gendervates entsprechen, oder über homologe Rekombination zwischen zwei identischen, 1418 bp langen IS100-Fragmenten. Durch Deletion der PAI III<sub>536</sub> über homologe Rekombination zwischen der intakten IS100-Kopie des 5'-Bereiches der Insel und einer kryptischen Kopie downstream des *iro*-Genclusters, geht eine zentrale, 42,2 kb große Region der Insel verloren und eine intakte Kopie des IS100 verbleibt im Bakterienchromosom. Unter normalen Wachstumsbedingungen scheinen etwa 40 % der PAI III<sub>536</sub>-Deletionen durch ortsspezifische Rekombinationen zustande zu kommen, die übrigen 60 % durch RecA-abhängige homologe Rekombinationen. Streßbedingungen, wie Temperaturschwankungen, osmotischer Streß oder Nährstoffmangel können den Anteil ortsspezifischer Rekombinationen an der Gesamtdeletionsrate auf über 70 % erhöhen (Middendorf *et al.*, 2004).

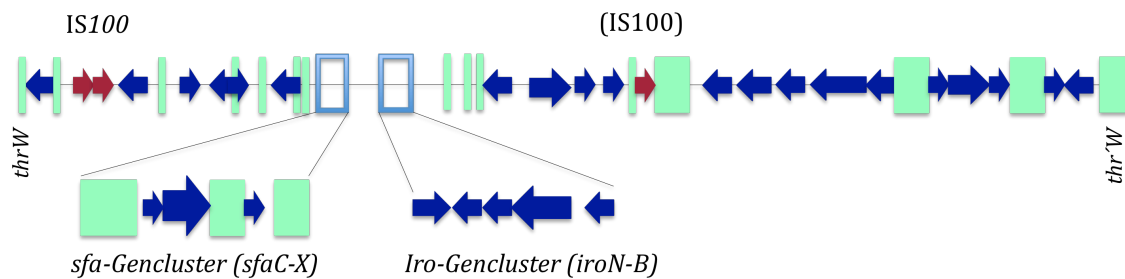


Abb. 1-2: Genetische Struktur der Pathogenitätsinsel III des UPEC-Stammes 536 (PAI III<sub>536</sub>)

### **1.3. Insertionssequenzen (IS-Elemente)**

#### **1.3.1. Allgemeine Struktur**

IS-Elemente zeichnen sich durch ihre geringe Größe ( $\leq 2$  kb) und genetische Kompaktheit aus (Mahillon and Chandler, 1998) und können innerhalb, sowie zwischen verschiedenen Genomen transponieren (Berg *et al.*, 1989). Sie umfassen im allgemeinen lediglich der eigenen Mobilität dienende Sequenzen. Beispiele sind die rekombinationsaktiven Sequenzen, die die Enden eines IS-Elementes definieren, sowie die Sequenzen, die die Transposase kodieren. In der Mehrzahl der Fälle sind 'Inverted Repeats' (IR) vorhanden, die zwei funktionelle Domänen aufweisen: die 2 - 3 bp umfassende Domäne A an den Elementenden, die an den Strangbrüchen und Strangtransferreaktionen beteiligt ist, sowie die Domäne B innerhalb des IR, die für die Bindung der Transposase, sowie u. U. wirtseigener Proteine von Bedeutung ist. Auch IS-Promotoren sind häufig teilweise innerhalb des IR upstream des Transposase-Genes (IRL) lokalisiert; die Transpositionsaktivität eines IS-Elementes unterliegt im allgemeinen der Kontrolle zahlreicher element- und wirtseigener Faktoren.

Die bislang gruppierbaren IS-Elemente lassen sich 20 IS-Familien zuordnen, deren Vertreter häufig über eine Vielzahl eubakterieller, als auch archaebakterieller Genera verbreitet sind (Mahillon and Chandler, 1998; Filée *et al.*, 2007). Ausnahmen stellen das IS1 und das IS66 dar, deren Vorkommen sich auf Enterobakterien bzw. Bakterien der Rhizosphäre zu beschränken scheint.

#### **1.3.2. Typisierung aufgrund variabler chromosomaler Lokalisationen repetitiver und mobiler genetischer Elemente**

Einige bedeutende bakterielle Krankheitserreger mit klonaler Populationsstruktur, wie *Y. pestis*, *M. tuberculosis* oder *B. anthracis*, sind in evolutionsbiologischen Zeitmaßstäben zu jung, um sie aufgrund von Sequenzunterschieden ihrer 'housekeeping'-Gene zu typisieren. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) aufgrund variabler chromosomaler Lokalisationen repetitiver und mobiler Elemente (Van Embden *et al.*, 1993; Kremer *et al.*, 1999; Achtman *et al.*, 1999) oder in

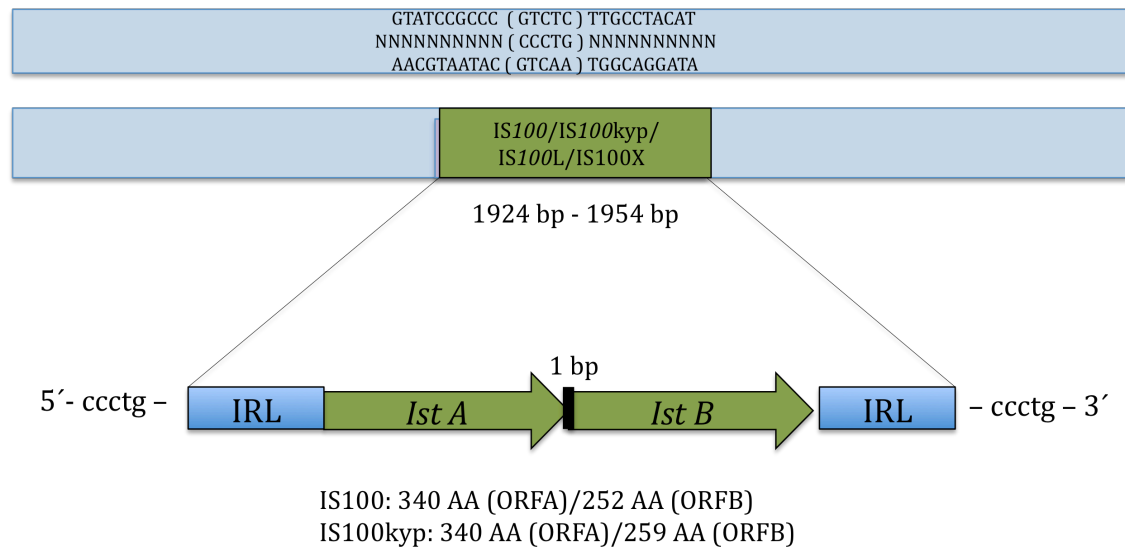
Antibiotikaresistenzen involvierter Gene (Bifani *et al.*, 1997) haben sich in diesen Fällen als nützlich erwiesen. Für die Spezies *Y. pestis* können RFLPs aufgrund genomischer Positionen der drei IS-Elemente IS100, IS285 und IS1541 verwendet werden, um Biovar Orientalis-Stämme nach ihrem geographischen Fokus zu gruppieren (Leclercq *et al.*, 2007).

### 1.3.3. Das IS100 – ein Element der IS21-Familie

Elemente der IS21-Familie zählen mit einer Länge von etwa 2 bis 2,5 kb zu den größten bislang beschriebenen bakteriellen IS-Elementen. Sie weisen multiple repetitive Sequenzen an ihren Enden auf, die ebenfalls Transposase-Bindungsstellen darstellen könnten (Mahillon and Chandler, 1998). Die konsekutiven ORF *istA* und *istB* der Elemente der IS21-Familie sind in manchen Fällen durch einige Basenpaare getrennt oder überlappen mit einem bzw. mehreren Basenpaaren.

**Tab. 1-4: Mitglieder-Elemente der IS21-Familie**

<b>Elementbezeichnung</b>	<b>Referenzspezies</b>
IS21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
IS53	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>
IS53K	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
IS100	<i>Yersinia pestis</i>
IS100kyp	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
IS100L	<i>Yersinia pestis</i>
IS100X	<i>Yersinia pestis</i>
IS232A	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>
IS232B	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
IS232C	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i>
IS408	<i>Burkholderia cepacia</i>
IS640	<i>Shigella sonnei</i>
IS1162	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
IS1326	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
IS1415	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
IS5376	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
ISBf1	<i>Bacteroides fragilis</i>
ISBf2	<i>Bacteroides fragilis</i>
ISMt2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ISMt3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ISRsp2	<i>Rhizobium</i> sp.



**Abb. 1-3: Genetische Struktur und Isoformen des IS100**

Das IS100 hat eine Größe von 1,953 kb, wird an seinen Enden durch zwei unvollständige, über 43 bp identische IR von 52 bzw. 61 bp Länge begrenzt sowie von 5 bp-DR flankiert. Die ORF *istA* (1,022 kb) und *istB* (779 bp) überlappen mit einem Basenpaar und kodieren die Untereinheiten A und B der Transposase mit Längen von 340 bzw. 252 Aminosäuren (Podladchikova *et al.*, 1994). Ursprünglich wurde das Vorkommen des IS100 für die Spezies *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* als Bestandteil von Plasmiden und Bakterienchromosomen beschrieben (Portnoy and Falkow, 1981; McDonough and Hare, 1997; Buchrieser *et al.*, 1998). Auffallend zahlreich liegen IS-Elemente und das IS100 im *Y. pestis*-Genom vor (Parkhill *et al.*, 2001). Zwei Kopien des IS100 schließen den *pgm*-Locus ein, der neben der HPI (Buchrieser *et al.*, 1998) den *hms*-Locus (Lillard *et al.*, 1997) umfaßt. Der *pgm*-Locus kann über homologe Rekombination der ihn flankierenden IS100-Sequenzen hochfrequent deletieren (Fetherston *et al.*, 1992). HPI-positive Stämme der Spezies *Y. pseudotuberculosis* weisen innerhalb der 5,6 kb-AT-reichen variablen Region der Pathogenitätsinsel eine Kopie eines IS100 auf (Schubert *et al.*, 1999), während die HPI im *Y. enterocolitica*-Genom in diesem Bereich Kopien der IS-Elemente IS1328, IS1329, IS1400 und IS1222 umfaßt (Rakin *et al.*, 1999).

Die Verbreitung des IS100 innerhalb der Spezies *E. coli* wurde bislang nicht systematisch untersucht. Man weiß jedoch, daß im Genom des UPEC-Stammes 536 die

Pathogenitätsinseln I<sub>536</sub>, II<sub>536</sub> und III<sub>536</sub> Fragmente einer Reihe verschiedener IS-Elemente und Transposons aufweisen; häufig korreliert das Vorkommen von PAI in *E. coli* mit dem Vorhandensein von IS100-Sequenzen (vgl. 3.3.; Dobrindt *et al.*, 2002).

## 1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden 30 *Escherichia coli*-Stämme mittels MLST typisiert. Aufgrund der Typisierungen konnte eine Abschätzung genetischer Verwandtschaften der kernchromosomalen Bereiche für die einzelnen Stämme erfolgen (3.1. und 4.1.).

In weiteren Experimenten wurde in dem heterogenen Kollektiv aus pathogenen und kommensalen *E. coli*-Isolaten sowie 14 *Salmonella enterica*-Stämmen zum einen die Verbreitung spezifischer Pathogenitätsinselsequenzen am Beispiel der HPI und PAI III<sub>536</sub> (3.2. und 4.2.), zum anderen die Verbreitung und intrachromosomale Verteilung des IS100 untersucht (3.3. und 4.3.) Dieses IS-Element ist in Verbindung mit der HPI humanpathogener *Yersinia pseudotuberculosis*- und *Yersinia pestis*-Stämme, sowie Pathogenitätsinseln des *E. coli* 536-Genomes, darunter der PAI III<sub>536</sub>, beschrieben worden.

Zur Ermittlung des Vorkommens der Gene *irp2*, *fyuA*, sowie PAI III<sub>536</sub>-spezifischer Sequenzbereiche und des IS100 wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. 'Southern Blot'-Hybridisierungen ermöglichten eine Überprüfung der Resultate der IS100-PCR und die Abschätzung chromosomaler IS100-Kopienzahlen sowie einen Vergleich der Hybridisierungsmuster für die einzelnen Stämme.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Bakterienstämme

In Tab. 2-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme unter Angabe ihrer Pathotypen, geno- oder phänotypischen Eigenschaften und ihrer Bezugsquelle bzw. Referenz aufgeführt. Alle Stämme stammten aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg (IHM), der Abteilung für Innere Medizin des Universitätsklinikums Jena (AIM), dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg (IMIB), dem Max von Pettenkofer-Institut München (MVP) und dem Robert Koch-Institut, Außenstelle Wernigerode (RKI).

Tab. 2-1: In dieser Studie verwendete *E. coli*-Stämme

Stammbezeichnung	Serotypisierung	Pathotyp	Bezugsquelle
0512E015	OR:H-	EHEC	IHM
11205019	OR:H-	EHEC	IHM
5726/96	O3:H10	EHEC	IHM
4941/97	Ont:H-	EHEC	IHM
4828/97	O40:H-	EHEC	IHM
3357/98	O60:H-	EHEC	IHM
4595/97	O62:H-	EHEC	IHM
1505M052	O128:H-	EHEC	IHM
11055110	O128:H-	EHEC	IHM
3172/97	O128:H2	EHEC	IHM
3600/97	O128:H2	EHEC	IHM
3115/97	O128:H2	EHEC	IHM
3171/97	O128:H2	EHEC	IHM
EH250	Ont:H12	EHEC	IHM
8081/97	Ont:H8	EHEC	IHM
4794/97	O111:H-	EHEC	IHM
3117/97	O128:H-	EHEC	IHM

5480/95	O3:H2	EAEC	IHM
17-2	O3:H2	EAEC	IMIB
4140/86	O44:Hnt	EAEC	IHM
7482/95	O73:H1	EAEC	IHM
7484/94	O86:H18	EAEC	IHM
RD2	O111:H2	EAEC	IHM
RD7	O111:H2	EAEC	IHM
DPA065	O119:Hnt	EAEC	IHM
DEF047	O86:Hnt	EAEC	IHM
DPT041	O86:Hnt	EAEC	IHM
536	O6:K15:H31	UPEC	IMIB
536-21	O6:K15:H31	UPEC	IMIB
J96	O4:K:H5	UPEC	IMIB
E-B35	O4:K12:H5	UPEC	IMIB
2980	O18ac:K5:H5/11	UPEC	IMIB
764	O18:K5:H5/11	UPEC	IMIB
1E3	nt	Stuhlisolat, Mensch	AIM
F18	OR:K1:H5	Stuhlisolat, Mensch	AIM
AC/1	O78	vogelpathogen	IMIB
MG1655	OR: H48	K-12, apathogen	IMIB
DSM6601	O6:K5:H1	apathogen	IMIB

**Tab. 2-2: In dieser Studie verwendete *S. enterica*-Stämme**

<b>Stammbezeichnung</b>	<b>Serotypisierung</b>	<b>Pathotyp</b>	<b>Bezugsquelle</b>
315	6,8:a:z52	Subsp. salamae	RKI
1752	16:z:-	Subsp. salamae	RKI
1649	38:z54:-	Subsp. arizonae	RKI
1474	50:l,v:z35	Subsp. diarizonae	RKI
1757	53:r:z68	Subsp. diarizonae	RKI
50/95	61:k:1,5	Subsp. diarizonae	RKI
461/95	61:k:1,5	Subsp. diarizonae	RKI
658/95	61:k:1,5	Subsp. diarizonae	RKI
1376/95	61:i:z	Subsp. diarizonae	RKI
1380	61:l,v:1,5,7	Subsp. diarizonae	RKI



1474	50:l,v:z35	Subsp. diarizonae	RKI
845/96	47:r:z53	Subsp. diarizonae	RKI
1701	41:b:1,7	Subsp. indica	RKI
1443	45:a:e,n,x	Subsp. indica	RKI

### 2.1.2. Chemikalien und Lösungen

Verwendete Chemikalien und Lösungen wurden von den Herstellern Gibco BRL (Eggenstein), Merck Chemicals (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Enzyme und Inkubationspuffer stammten von den Firmen GE Healthcare (Freiburg), Gibco BRL (Eggenstein), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Heidelberg), Roche Diagnostics (Mannheim) und Qiagen (Hilden).

### 2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2-3: Geräte**

Analysenwaage	Chyo Balance C.
Autoklaven	Webeco
Brutschrank	Memmert TV 40b
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	BioRad
Geldokumentationsanlage	BioRad
Magnetrührer	Heidolph
Mikrowellengerät	Siemens
Mikroliterpipetten	Eppendorf
Netzgeräte	Consort E455; BioRad Power Pac 300
Nylonmembran	Pall Biotyne B, 0,45 µm
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Pharmacia Ultrospec 3000
Röntgenfilme	Hyperfilm ECL, Amersham; Fuji RX New
Röntgenfilmentwickler	Agfa (Curix 60)
Röntgenfilmkassetten	Dr. Goos Suprema
Rotationsofen	Hybaid Mini 10
Schüttelinkubatoren	Bühler W55 swip; Innova TM 4300
SpeedVac-Konzentrator	UNIVAPO 150H Uniequipe; SpeedVac SC 110 Savant
Sterilarbeitsbank	Nuaire A/B3
Tischinkubatoren	Eppendorf Thermostat 5320; Liebisch
Thermocycler	Biometra Thermocycler T3
UV-Crosslinker	GS Gene Linker® UV Chamber BioRad
Vakuumblotapparatur	Pharmacia Biotech

Vortexgerät	Heidolph
Waagen	Sartorius
Wasserbad	GFL 1083
Zentrifugen	Eppendorf 5415 C, Hettich Mikroliter-Zentrifuge; Beckmann J2-21 und J-21B mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren; Heraeus Sepatech Minifuge RF

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürtingen), Sarstedt (Nürnbrecht) und Schleicher & Schuell (Dassel) bezogen.

#### 2.1.4. Nährlösungen und Nährmedien

Die Zutaten für verwendete Medien stammten von den Firmen BD Biosciences (Heidelberg) und Carl Roth (Karlsruhe). Durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120 °C wurden die Nährlösungen sterilisiert. Für die Herstellung fester Nährmedien wurden den Nährlösungen 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

**Tab. 2-4: Zusammensetzung von LB-(Lysogeny Broth) Medium**

<b>Luria-Bertani (LB)-Medium</b>	
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l (pH 7,5)

**Tab. 2-5: X-Gal-Medium**

<b>X-Gal-Medium</b>	
IPTG 0,1 M	0,5 ml/l
X-Gal 2% (w/v) in N, N'-Dimethylformamid	3 ml/l

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C.

**Tab. 2-6: LB-Medium mit Antibiotikazusätzen**

<b>Antibiotikum</b>	
Ampicillin	100 µg/ml (Lösungsmittel H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> )
Chloramphenicol	30 µg/ml (Lösungsmittel EtOH)

### 2.1.5. DNA-Größenmarker

Die 1kb-DNA-Leiter von Gibco BRL (Eggenstein) dient der DNA-Fragmentgrößenbestimmung doppelsträngiger DNA in einem Bereich von 500 bp bis 12 kb und wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 0,5 µg/Spur des Markers bei der horizontalen Gelelektrophorese auf das Gel aufgetragen.

Tab. 2-7: 1 kb-DNA-Leiter von Gibco BRL (Eggenstein)

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Größe [kb]	12,2	11,2	10,2	9,2	8,1	7,1	6,1	5,1	4,1	3,1	2	1,6	1	0,5

### 2.1.6. PCR-Primer

PCR-Primer wurden von der Firma MWG Biotech GmbH (Ebersberg) bezogen. Für die PCR-Amplifikationen dieser Arbeit wurden bereits veröffentlichte Sequenzen von Primerpaaren eingesetzt (Buchrieser *et al.*, 1998; Karch *et al.*, 1999; Dobrindt *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2006). In Tab. 2-8 sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer, die jeweils durch ein Primerpaar amplifizierten DNA-Bereiche sowie die Anlagerungs-(engl. Annealing)Temperaturen für die einzelnen Primerpaare angegeben.

Tab. 2-8: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck	Ann.-temp.
<i>adkF</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	Amplifikation eines internen 583 bp-Fragmentes des <i>adk</i> -Genes	54 °C
<i>adkR</i>	CCGTCAACTTTCGCGTATTT	s. <i>adkF</i>	
<i>fumCF</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	Amplifikation eines internen 806 bp-Fragmentes des <i>fumC</i> -Genes	54 °C
<i>fumCR</i>	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	s. <i>fumCF</i>	
<i>gyrBF</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC	Amplifikation eines internen 911 bp-Fragmentes des <i>gyrB</i> -Genes	60 °C
<i>gyrBR</i>	GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	s. <i>gyrBF</i>	
<i>icdF</i>	ATGGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCG GCACA	Amplifikation eines internen 878 bp-Fragmentes des <i>icd</i> -Genes	54 °C
<i>icdR</i>	GGACGCAGCAGGATCTGTT	s. <i>icdF</i>	
<i>mdhF</i>	ATGAAAAGTCGCAGTCCTCGGGCGCT GCTGGCGG	Amplifikation eines internen 932 bp-Fragmentes des <i>mdh</i> -Genes	60 °C
<i>mdhR</i>	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCG ATATCTTTCTT	s. <i>mdhF</i>	

<i>purAF</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	Amplifikation eines internen 816 bp-Fragmentes des <i>purA</i> -Genes	54 °C
<i>purAR</i>	CATACGGTAAGCCACGCAGA	s. <i>purAF</i>	
<i>recAF</i>	CGCATTTCGCTTTACCCTGACC	Amplifikation eines internen 780 bp-Fragmentes des <i>recA</i> -Genes	58 °C
<i>recAR</i>	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	s. <i>recAF</i>	
<i>50A</i>	ATTGATCCACCGTTTTACTC	Amplifizierung eines 986 bp IS100-Fragmentes, das ORFA und B der Transposase-Untereinheiten umfaßt.	52 °C
<i>50B</i>	CGAACGAAAGCATGAAACAA	s. <i>50A</i>	
<i>thr W</i>	CCACCGTGATTCACGTTTCG	Amplifizierung des äußersten 5'-Endes der PAI III <sub>536</sub> [ <i>thrW</i> , <i>xis/int</i> (Sfx)]	56 °C
<i>III.1</i>	AGGCACTATCACGCAGTGG	s. <i>thrW</i>	
<i>III.2</i>	CCACTGCGTGATAGTGCCT	Amplifizierung einer Sequenz des 5'-Bereiches der PAI III <sub>536</sub>	56 °C
<i>III.3</i>	AGCCCATCGCTATTGCCAG	s. <i>III.2</i>	
<i>int1</i>	CATTGTGCGACGCGTGATGTGGCG	Amplifizierung des Integrases der PAI IV <sub>536</sub>	70 °C
<i>int2</i>	GTGGAGCTCGTGGTAATTTGCCAG	s. <i>int1</i>	
<i>int3</i>	GATGTCGACCCCGTTCACACG	s. <i>int1</i>	64 °C
<i>int4</i>	TGCGGAGCTCCTAGGTGCTCTG	s. <i>int1</i>	
<i>fyuAup</i>	GCGACGGGAAGCGATGATTTA	Nachweis des Genes <i>fyuA</i> , 780 bp-Sequenz	60 °C
<i>fyuAlp</i>	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	s. <i>fyuA up</i>	
<i>irp2up</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	Nachweis des Genes <i>irp2</i> , 280 bp-Sequenz	60 °C
<i>irp2lp</i>	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	s. <i>irp2 up</i>	

### 2.1.7. Nukleinsäuresonden

Nukleinsäuresonden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Hybridisierung von 'Southern Blots' und Nachweis (i) des IS100 und (ii) einer 17 bp-Sequenz aus dem 3'-Bereich von *asntRNA*-Genen verwendet. Als IS100-Sonde diente das PCR-Produkt des UPEC-Stammes 536; das 17 bp-Oligonukleotid wurde von der Firma MWG Biotech GmbH (Ebersberg) bezogen.

Tab. 2-9: In dieser Arbeit verwendete Nukleinsäuresonden

Sonde	Markierung	Verwendungszweck
986 bp-Produkt der IS100-PCR des E. coli-Stammes 536	ECL-Kit s. u.	Nachweis des Insertionselementes IS100
Oligonukleotidsonde (17 bp), 5'-CCAGTCAGAGGAGCCAA-3'	DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit s. u.	Nachweis einer Sequenz aus dem 3'-Bereich von <i>asntRNA</i> -Genen

## 2.1.8. Enzyme

Tab. 2-10: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Restriktionsenzyme	Erkennungssequenz / Anmerkungen
<i>Hind</i> III	A / AGCTT
<i>Pst</i> I	CTGCA/G
<i>Sal</i> I	G / TCGAC
<i>Sac</i> I	GAGCT / C
<i>Xba</i> I	T / CTAGA
Taq-DNA-Polymerase	
Dap-Goldstar-Polymerase	
Proteinase K	
Lysozym	
DNA-Ligase	
SAP	
Exonuklease I	

## 2.1.9. Arbeits-Kits

Tab. 2-11: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Kit	Hersteller
PCR-Supermix	Gibco BRL (Eggenhofen)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
GeneClean Kit	Dianova
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
ECL Direct Nucleic Acid Labeling And Detection System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
AlkPhos Direct Nucleic Acid Labeling And Detection System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Bakterienanzucht und Kultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *S. enterica*-Stämme wurden nach dem Ausstreichen auf LB-Platten bei 4 °C bis zu 4 Wochen auf den gleichen Platten kultiviert; die langfristige Lagerung erfolgte in einem 7:3-Gemisch einer Übernachtkultur mit sterilem Glycerin bei – 70 °C. Für die Herstellung von

Übernachtskulturen wurden Einzelkolonien in je 100 ml Flüssigmedium suspendiert und die Bakterienkulturen unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## 2.2.2. Isolierung chromosomaler DNA

### Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* (Grimberg *et al.*, 1989)

**Lösung 1 (TNE):** 10 mM Tris, pH 8  
10 mM NaCl  
10 mM EDTA, pH 8

**Lösung 2 (TNEX):** TNE  
1% (v/v) Triton X100

1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurde bei 8000 Upm 4 min abzentrifugiert. Nach Waschen mit 1ml TNE-Lösung wurde das Pellet in 270 µl TNEX-Lösung resuspendiert. Es wurden 30 µl einer frischer Lysozymlösung (5 mg/ml) zugegeben, die Probe 20-30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend nach Zugabe von 15 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) und weiterer Inkubation bei 65 °C für etwa 2 h bis zum Aufklaren der Lösung, wurde die DNA durch Zugabe von 15 µl 5 M NaCl-Lösung und 500 µl 96 %igem Ethanol (gekühlt) gefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C wurde das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen, die Probe erneut 2 min abzentrifugiert, die DNA an der Luft getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli*-Stamm AC/1

**Lösung 1:** 10 mM Tris/HCl  
25 % Saccharose  
pH-Wert 7,5

**Lösung 3 (TE-Puffer):** 10 mM Tris/HCl  
5 mM EDTA  
pH-Wert 7,5

**Lösung 2:** 0,25 M EDTA-Lösung  
pH-Wert 8,0

**Lösung 4:** 5 M NaClO<sub>4</sub>

3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden bei 8000 Upm 2 min lang abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und die Probe nach Zugabe von 30 µl Lösung 2 bei 37 °C 10 min lang inkubiert. Nach Überführung der Probe in ein Greiner-

Röhrchen mit 375 µl TE-Pufferlösung, 25 µl 10 %iger SDS-Lösung und 8 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) wurde die Suspension bis zum Aufklaren bei 37 °C 10- bis 30 min inkubiert, anschließend 150 µl Lösung 3 und 0,5 Volumenteile Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 zugegeben und das Probengemisch bei Raumtemperatur 90 min lang durch Schütteln homogenisiert. Nach Zentrifugieren der Probe bei 13000 Upm bei 4 °C für 15 min. wurde die DNA mit vorgekühltem Ethanol gefällt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4 °C und Lufttrocknung wurde das Pellet in 70 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA

<b>Lösung 1:</b>	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 8	<b>Lösung 4:</b>	100 ml 0,1M Tris-HCl,pH6,4 8,8 ml 0,5 M EDTA, pH 8 13,2 ml H <sub>2</sub> O 2,6 ml TritonX-100 120 g Guanidinthiocyanat
<b>Lösung 2:</b>	0,2 NaOH 1 % SDS	<b>Lösung 5:</b>	10 ml 5 M NaCl 5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 2,5 ml 0,5 M EDTA, pH8 ad 250 ml H <sub>2</sub> O+250ml EtOH
<b>Lösung 3:</b>	3 M Natriumacetat, pH 4,8	<b>Lösung 6:</b>	10 g Diatomeenerde 50 ml H <sub>2</sub> O 500 µl HCl konz.

2 ml einer Übernachtskultur wurden 2 min zentrifugiert und das Pellet in 150 µl Lösung 1 gelöst. Die Probe wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 150 µl Lösung 2 zugegeben und genau 5 min auf Eis gestellt. Die Probe wurde bis zum Aufklaren der Lösung geschüttelt und 150 µl eisgekühlte Lösung 3 hinzupipettiert. Nach mehrmaligem Umdrehen wurde die Probe 6 min auf Eis inkubiert und 5 min zentrifugiert, der Überstand zu 900 µl Lösung 4, sowie 50 µl Diatomeenerde-Suspension gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch sowie

anschließend 2 ml Lösung 5 wurden in eine 5 ml-Spritze gegeben und unter Anlegen eines Unterdrucks durch einen Filter gezogen. Der Filtereinsatz wurde auf ein neues Eppendorf-Cap gesetzt und zur Entfernung etwaiger Flüssigkeitsreste 20 s zentrifugiert. Nach Austausch des Eppendorf-Caps wurden 50 µl destilliertes Wasser auf den Filter pipettiert und die Probe abschließend zentrifugiert.

#### **2.2.4. Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA**

Lichtphotometrisch wurde die Absorption durch in H<sub>2</sub>O gelöste doppelsträngige DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Unter Verwendung einer Quarzküvette (Schichtdicke  $d = 1$  cm) diente als Eichwert eine Absorption von 1 bei einer Konzentration von 50 µg/ml. Die dsDNA-Konzentration errechnete sich nach

$$\text{DNA-Konz. (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

Als Indikator für den Reinheitsgrad der DNA diente ein Quotient  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  von 1,5 bis 2.

#### **2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR))**

Für jeden auf Eis pipettierten PCR-Ansatz dienten 500 ng chromosomale DNA oder 1 µl eines Bakterienzellysates von Bakterienzellmaterial in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st. als Ausgangsmaterial ('Template'). Die für ein bestimmtes Primerpaar spezifische, von der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide abhängende Primer-Anlagerungstemperatur ('Annealing'-Temperatur  $T_a$ ) liegt ca. 3-5 Grad unter der Schmelztemperatur  $T_m$ , die nach der Wallace-Regel zu

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

bestimmt wird. Die Elongationszeit ist abhängig von der Art der verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase und Produktlänge (1 min Elongationszeit pro 1 kbp bei Verwendung rekombinanter Polymerasen bzw. 2 min pro 1 kbp bei Verwendung von Polymerasen mit 'proof-reading'-Aktivität). Die erfolgreiche Amplifikation erwünschter PCR-Produkte wurde durch Auftragen von 5-10 µl des Produktgemisches auf ein Agarosegel überprüft.



Tab. 2-12: PCR-Bedingungen

Reaktionsschritt	Effekt	Dauer / Temp. 1	Dauer / Temp. 2 MLST-PCRs	Dauer / Temp. 3 <i>irp2</i> -PCR	Dauer / Temp. 4 <i>fyuA</i> -PCR	Dauer / Temp. 5 IS100-PCR	Dauer / Temp. 6 <i>int</i> -PCR	Dauer / Temp. 7 Sequenzier-PCR
1	Hitzenat.	3 min., 94 °C	3 min., 94 °C	3 min., 94 °C	3 min., 94 °C	3 min., 94 °C	3 min., 94 °C	2 min., 94 °C
2 / Zyklus 1 Schritt 1	Hitzenat.	1 min., 94 °C	1 min, 94 °C	1 min, 94 °C	1 min, 94 °C	1 min, 94 °C	1 min, 94 °C	5 s, 94 °C
2 / Zyklus 1 Schritt 2	Annealing	45 s bei ca 2 °C unterhalbSc hmelz-temp d. Oligont.	1 min, 54 °C 58 °C oder 60 °C	1 min, 60 °C	1 min, 57 °C	1 min, 50 °C	1 min, 70 °C bzw. 64 °C	15 s, 54 °C 58 °C oder 60 °C
2 / Zyklus 1 Schritt 3	Extension	1 min pro kb zu amplfz. DNA 72 °C	2 min, 72 °C	1 min, 72 °C	1 min, 72 °C	1 min, 72 °C	1 min, 72 °C	4 min, 60 °C
Zyklen 2–30 (Wdh. der Schritte 1–3)		ca. 30	30	30	30	30	30	25
3	Extension	3 min., 72 °C	5 min., 72 °C	3 min., 72 °C	3 min., 72 °C	3 min., 72 °C	3 min., 72 °C	

Standardansätze enthielten 5 µl 10 × Reaktionspuffer, 0,5 µl 20 mM dNTPs, 0,5 µl eines jeden Oligonukleotides (je 100 pmol/µl), 1 µl Template-DNA und 0,5 µl *Taq*-Polymerase (1 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Eine MgCl<sub>2</sub>-Zugabe erfolgte bis zu einer Konzentration von 1,5-3 mM in Abhängigkeit von der eingesetzten Polymerase und dem dazugehörigen PCR-Puffer.

Beispiel eines Standard-PCR-Ansatzes:

2,5 µl 10 x Reaktionspuffer

Abgestimmte Menge MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM)

0,25 µl 20 mM dNTP-Mix  
je 0,25 µl Primer 1 und 2 (je 100 pmol/µl)  
0,5 µl Template  
0,5 U Taq-DNA-Polymerase  
ad 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### **2.2.6. DNA-Sequenzierung**

Interne Sequenzen von sieben 'housekeeping'-Genen des *E. coli*-Chromosomes wurden mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend enzymatisch aufgereinigt, Sequenzier-PCRs (s. unten) durchgeführt, die Produkte im Institut für Virologie der Universität Würzburg aufgereinigt und mit der Methode nach Sanger sequenziert. Für einen 5 µl-Gesamtansatz einer Sequenzier-PCR wurden ca. 50 ng DNA eingesetzt, des weiteren 0,5 µl eines forward- oder reverse-Primers (20 pmol/µl). Die in geringer Konzentration zugegebenen Didesoxynukleotide (ddNTPs) unterscheiden sich von den dNTPs durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in Position C3 der Ribose und führen zum Kettenabbruch. Statistisch entstehen DNA-Fragmente, die sich in der Länge um 1 bp unterscheiden. Nach erneuter Aufreinigung des Gemisches kann es in einer mit einem Polymer gefüllten Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Basen der ddNTPs erlauben dann eine Bestimmung der Sequenz.

### **2.2.7. 'Multilocus Sequence Typing' (MLST) von *E. coli*-Stämmen**

Es wurden 31 *E. coli*-Stämme aufgrund interner Sequenzen der in Tab. 2-19 aufgeführten 7 'housekeeping'-Gene nach einem Standardprotokoll (Wirth *et al.*, 2006) typisiert. Hierfür wurden die Genfragmente nach den in Tab. 2-17 aufgeführten Reaktionsbedingungen amplifiziert, die PCR-Produkte enzymatisch aufgereinigt und als 'Template' für Sequenzier-PCRs eingesetzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Ridom SeqSphere Version Nr. 0.9.18 Software ausgewertet und typisiert.

**Tab. 2-13: Für *E. coli*-MLST verwendete 'housekeeping'-Gene**

<b>Gen</b>	<b>Genprodukt bzw. Funktion</b>	<b>Referenzsequenz</b>
<i>adk</i>	Adenylatkinase	
<i>fumC</i>	Fumarathydratase	
<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase	
<i>icd</i>	Isocitrat / Isopropylmalatdehydrogenase	
<i>mdh</i>	Malatdehydrogenase	
<i>purA</i>	Adenylosuccinatdehydrogenase	
<i>recA</i>	RecA	

### **2.2.8. Aufreinigung von DNA**

Tab. 2-14 führt die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Aufreinigung wäßriger DNA-Lösungen auf.

#### **Enzymatische DNA-Aufreinigung**

Überschüssige Primer und dNTPs wurden vor dem Sequenzieren von PCR-Produkten in einem Schritt durch Zugabe von Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase aus einem PCR-Reaktionsgemisch entfernt. Zu diesem Zweck erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 40 min, sowie anschließend zur Enzyminaktivierung 15 min bei 80 °C.

#### **DNA-Aufreinigung über eine Silicamembran**

In diesem Arbeitsschritt wurden DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen und Ansätzen mit Restriktionsenzymen mit dem Qiagen PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Aufreinigung einzel- oder doppelsträngiger DNA-Fragmente wird durch Adsorption der DNA an eine Silicamembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und eines pH-Wertes  $\leq 7.5$  erreicht.

#### **Phenol/Chloroform-Extraktion**

Zur Aufreinigung wurden wäßrige, DNA-haltige Lösungen 1:1 mit mindestens 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohollösung (25:24:1) geschüttelt und das Gemisch zur Phasentrennung 5 min bei 18 000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein Eppendorf-Cap überführt und der Überstand zur Extraktion von Phenolresten mit 1 Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 versetzt und erneut zentrifugiert. Dem Überstand wurden 2 Volumenteile 100 %iges Ethanol

und 1/10 Volumenteile 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) zugegeben. Die DNA-Fällung erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für ca. eine Stunde. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 18000 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min zentrifugiert, das DNA-Pellet nach einmaligem Waschen mit 70 %igem (v/v) Ethanol mittels Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 - 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  oder TE-Puffer resuspendiert.

### **Entsalzen eines PCR-Produktes (Elution aus einem Agarosegel)**

Wäßrige DNA-Lösungen zum Ansetzen von Ligationsreaktionen wurden mit Hilfe des GeneClean Kits entsalzt. 20  $\mu\text{l}$  einer DNA-Lösung wurden mit 80  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  verdünnt. Nach Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  Natriumjodid und 7  $\mu\text{l}$  Glasmilch wurde den Angaben des Herstellers entsprechend vorgegangen; nach zwei Waschschritten wurde das aufgereinigte PCR-Produkt in 14  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  eluiert.

### **2.2.9. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen**

Die gelöste DNA wurde mit 10 x Reaktionspuffer versetzt, mit dem Enzym *HindIII* bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 6 Stunden inkubiert und der Reaktionsansatz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht aufbewahrt. Zur direkten Weiterverarbeitung wurde die Spaltungsreaktion durch Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzymes (20 min bei  $75^{\circ}\text{C}$ ) beendet bzw. Ladepuffer zugegeben. Im Anschluß wurde das Spaltungsergebnis auf einem 0,8 – 1,5 %igem Agarosegel überprüft.

40 $\mu\text{l}$ -Restriktionsansatz:	10 $\mu\text{l}$ in $\text{H}_2\text{O}$ gelöste DNA
	4 $\mu\text{l}$ 10 x-Reaktionspuffer
	20 U Restriktionsenzym
	ad 40 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Zur Klonierung eines Vektors wurden Insert- und Vektor-DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.2.10. Horizontale Gelelektrophorese

Es wurden Agarosegele mit 0,8 - 1,5 % (w/v) Agarose in Laufpufferlösung verwendet. Aufzutrennende wäßrige DNA-Lösungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einer Ladepufferlösung versetzt und das Fragmentgemisch bei angelegten 140 V Gleichspannung in 1 Stunde aufgetrennt. Die Nukleinsäuredarstellung erfolgte mittels Ethidiumbromid und Visualisierung über einen UV-Transilluminator bei einer Lichtwellenlänge von 354 nm.

**50 x TAE-Puffer:** 242 g Tris  
57 ml Eisessig  
100 ml EDTA 0,5 M, pH 8  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**10 x TPE-Puffer:** 108 g Tris  
15 ml Phosphorsäure 85 %ig  
40 ml EDTA 0,5 M, pH 8  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 2.2.11. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das GeneClean Kit von Qiogene (Heidelberg) verwendet. Nach dem Ausschneiden der aus einem Agarosegel zu eluierenden, mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbaren DNA-Bande und Zugabe des 2- bis 3- fachen Volumens einer 5 M Natriumjodidlösung, wurde die Probe bei 50 °C bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose inkubiert. Nach Zugabe von 7 µl Glasmilch wurde 5 min auf Eis inkubiert und der Überstand nach kurzer Zentrifugation (5 s) verworfen. Die sedimentierte Glasmilch wurde dreimal mit jeweils 900 µl der mitgelieferten Waschlösung gewaschen, nach dem dritten Waschschrift der Überstand sorgfältig entfernt, die Probe ein weiteres Mal 1 min zentrifugiert, nach Zugabe von 10 µl H<sub>2</sub>O 5 min bei 50 °C inkubiert und 5 s zentrifugiert. Der Überstand wurde für die nachfolgenden Schritte eingesetzt.

## 2.2.12. 'Southern-Blotting' und Hybridisierungsexperimente

### 2.2.12.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen ('Southern-Blotting')

<b>Lösung 1:</b>	20 x SSC (NaCl + tri-Na-Citrat)	<b>Lösung 3:</b>	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
<b>Lösung 2:</b>	0,25 M HCl ( <i>Depurinierungslösung</i> )	<b>Lösung 4:</b>	0,5 M Tris 3 M NaCl ( <i>Neutralisierungslösung</i> )

Die Nylonmembran wurde auf eine passende Größe zugeschnitten und zunächst mit  $H_2O_{\text{bidest}}$ , sowie anschließend mit Lösung 1 überschichtet. Das Agarosegel wurde jeweils 15 min in die Lösungen 2 bis 4, anschließend auf eine mit Lösung 1 getränkte Brücke aus 'Whatman'-Papier gelegt und mit der befeuchteten Nylonmembran blasenfrei bedeckt. Nach Auflegen ausreichend saugfähigen Papiers, Auflegen einer Glasplatte und gleichmäßigen Beschwerens mit etwa 200–400 g, sowie einer Versuchsdauer von 24–48 h wurde die Membran am Ende jeweils 5 min lang mit 0,4 M NaOH-Lösung sowie anschließend mit 0,2 M Trislösung gewaschen und mittels UV-Strahlung fixiert. Beim Erstellen eines 'Southern Blot' durch Anlegen eines Vakuums wurden nach Abdichtung der Membran durch eine Plastikmaske durch Anlegen eines Unterdruckes von 50 mbar die denaturierenden, sowie die neutralisierende Lösung durch das Gel hindurchgezogen und anschließend im eigentlichen Transferschritt durch Hindurchziehen einer 20 x SSC-Lösung eine Übertragung der DNA auf die Nylonmembran erreicht.

### 2.2.12.2. Markieren der IS100-Sonde

Als Sonde für den Nachweis IS100-spezifischer Sequenzen diente das mit dem ECL-Kit von Amersham Pharmacia Europe (Freiburg) markierte IS100-PCR-Produkt des *E. coli*-Stammes 536. Die Markierung der Sonde erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. 5  $\mu$ l von 10  $\mu$ l 'GeneClean'-Eluat wurden zunächst in einer 1:2-Verdünnung mit  $H_2O$  5 min lang zunächst bei 96 °C und auf Eis inkubiert, bevor 10  $\mu$ l Peroxidase enthaltendes 'Labeling Mix' und anschließend 10  $\mu$ l Glutaraldehyd zugegeben wurden.

Nach 10- bis 15-minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Detektion mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol enthaltenden Lösung.

### **2.2.12.3. 'Southern Blot'-Hybridisierung mit der markierten IS100-Sonde**

Je Southern Blot wurde mit 10-15 ml Hybridisierungslösung 30-45 min bei 42 °C prähybridisiert und anschließend die markierte Sonde zugegeben; die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Die Membran wurde zweimalig je 10 min bei 50 °C mit einer Lösung aus 0,5 x SSC und 0,4 % SDS, sowie zweimalig je 5 min bei Raumtemperatur mit 2 x SSC-Lösung gewaschen. Die Membran wurde in einem Gemisch aus je 4-5 ml Detektionslösung I und II des Herstellers ca. 1 min lang geschwenkt. Die Signaldetektion erfolgte mit Röntgenfilmen.

### **2.2.12.4. Markieren der 17 bp-Oligonukleotidsonde**

Zur Markierung des Oligonukleotides wurde das 'DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit' von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Das Oligonukleotid wurde mit Digoxigenin-ddUTP markiert und die Hybridisierung mit homologen DNA-Bereichen durch Verwendung eines Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugates und des Chemilumineszenzreagens CSPD über konventionelle Röntgenfilme nachgewiesen.

Reaktionsansatz zum Markieren des Oligonukleotides:

- 4 µl Reaktionspuffer
- 4 µl CoCl<sub>2</sub>-Lösung
- 100 pmol Oligonukleotid
- 1 µl DIG-ddUTP-Lösung
- 1 µl (100 U) Terminale Transferase

Die einzelnen Komponenten wurden in ein auf Eis inkubiertes Eppendorf-Cap pipettiert, der Ansatz wurde bis zu einem Volumen von 20 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt und gemischt, 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wieder auf Eis gestellt. 2 µl einer Mischung aus 2 µl Glykogenlösung und 400 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8) wurden zum Beenden der Reaktion zugegeben. Die Präzipitation markierter Oligonukleotide erfolgte mit 2,5 µl einer 4 M LiCl-Lösung und 75 µl vorgekühltem

Ethanol (-20 °C) in 2 h bei -70 °C. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13000 Upm wurde das unsichtbare Pellet mit 50 µl kaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### **2.2.12.5. 'Southern Blot'-Hybridisierung mit der markierten Oligonukleotidsonde**

**Hybridisierungspuffer:** 7 % SDS  
50 % deionisiertes Formamid  
5 x SSC  
2 % Blocking Reagent  
50 mM Natriumphosphatlösung, pH 7  
0,1 % N-Lauroylsarcosin

Nach Prähybridisierung des Southern Blot für mindestens 4 h bei 30 °C wurden 4 µl der Lösung mit der markierten Oligonukleotidsonde pro ml Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 35 °C. Gewaschen wurde die Membran 2 x 15 min bei Raumtemperatur mit einer 2 x SSC / 0,1 % SDS (w/v)-Lösung, sowie 5 min mit einer Lösung von 0,3 % Tween 20 (v/v) in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl/ pH 7,5). Anschließend wurde die Membran in dieser Lösung inkubiert. Nach 60 min Inkubation wurde das Antikörperkonjugat (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat) mit 75 mU/ml in der Blockpufferlösung gelöst und die Membran bei Raumtemperatur 30 min in 20 ml dieser Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde der Blot erneut 2 x 15 min in Maleinsäurepuffer / Tween 20 gewaschen und 5 min dem alkalischen pH-Wert (pH 9,5) des Detektionspuffers ausgesetzt, um geeignete Bedingungen für die Alkalische Phosphatase zu schaffen.

**Detektionspuffer:** 0,1 M Tris-HCl  
0,1 M NaCl  
pH 9,5 (20 °C)

Das Alkalische Phosphatase-Substrat CSPD wurde mit 25 mmol/l in Detektionspuffer gelöst, der Blot mit 1-2 ml dieser Lösung überschichtet und nach ca. 5 min mit der



Membranunterseite über Whatmanpapier gezogen, in Folie eingeschweißt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Exposition gegen einen Röntgenfilm.

### **2.2.13. DNA-Klonierung**

#### **2.2.13.1. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Zur Verminderung von Religationen von Vektorfragmenten bei Ligationsreaktionen wurden DNA-Enden der entsprechenden Fragmente nach Restriktionsspaltung dephosphoryliert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 x Phosphatasepuffer und 0,5 U Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm pro µg Vektor-DNA wurde die 5'-Phosphatgruppe während einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C abgespalten. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzymes (15 min bei 85 °C) und Reinigung der DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung.

#### **2.2.13.2. Auffüllen 5'-überhängender DNA-Einzelstrangenden**

**Lösung 1:** 0,5 mM dATP/dCTP/dTTP/dGTP

**Lösung 2:** 10 x Reaktionspuffer  
(Tris-HCl (pH 7,5) 200 mM  
MgCl<sub>2</sub> 100 mM)

Für eine 'blunt end'-Ligation wurden einzelsträngige 5'-überhängende Enden der DNA-Schnittstellen einer Restriktionsendonuklease mit Hilfe des DNA-Polymerase-Klenow-Fragmentes aufgefüllt. Zu 13 µl bzw. einer ca. 1 µg des gelösten DNA-Fragmentes enthaltenden Menge wurden 4 µl des dNTP-Mix, 2 µl des 10 x Reaktionspuffer und 5 U des gelösten Klenow-Fragmentes hinzugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei 25 °C inkubiert und das Klenow-Fragment anschließend 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert. Die DNA wurde abschließend phenolisiert, gefällt und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

### **2.2.13.3. DNA-Ligation**

Sowohl die 'blunt end'-, als auch die 'sticky end'-Ligation erfolgten idealerweise über Nacht, erstere bei Raumtemperatur, letztere bei 14 °C im Wasserbad. Für die Integration eines DNA-Inserts in einen Plasmidvektor wurden Insert und Vektor-DNA zunächst geschnitten und anschließend im Verhältnis 3:1 eingesetzt.

Ligationsansatz:    10 µl geschnittenes Insert  
                          3 µl-DNA  
                          4 µl 5 x T4-Ligasepuffer  
                          1 µl T4-Ligase (1 U)  
                          2 µl H<sub>2</sub>O

### **2.2.13.4. Herstellung kompetenter Bakterienzellen**

**(für Calciumchlorid/Hitzeschock-Transformation)**

50 ml LB-Medium wurden mit 500 µl einer Übernachtskultur des entsprechenden Wirtsstammes angeimpft und die Bakterien auf dem Schüttler bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 600 angezüchtet. Die Gesamtmenge wurde auf zwei sterile Röhren verteilt, 10 min mit 4500 Upm bei 4 °C zentrifugiert, die Pellets in 20 ml eiskalter, 100 mM Calciumchloridlösung aufgenommen und 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 4500 Upm zentrifugiert, die Pellets in 2,5 ml 100 mM Calciumchloridlösung aufgenommen und nach Zugabe von jeweils 520 µl 87 %iger Glycerinlösung das die Zellen enthaltende Gesamtvolumen zu Einzelmengen von 200 µl aliquotiert. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

### **2.2.13.5. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen**

Ein 20 µl-Ligationsansatz wurde auf 2 x 200 µl kompetente XL 1 Blue-Zellen in CaCl<sub>2</sub>/Glycerinlösung verteilt. Die Zellen wurden mindestens 30 min auf Eis inkubiert und 90 s einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurde der Transformationsansatz 5 min auf Eis inkubiert, bevor 1 ml LB-Medium hinzupipettiert

und das 'Eppendorf'- Cap 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler gelassen wurde. Schließlich wurden die Bakterien bei 5000 Upm (RT) einige Minuten abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektivnährböden ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

#### **2.2.13.6. Blau-Weiß Screening (X-Gal-Test)**

Zur Selektion rekombinanter Klone wurden *E. coli*-Stämme mit einer Deletion im *lacZ*-Gen (*lacZ*ΔM15) verwendet, die keine β-Galaktosidase bilden können (*E. coli*-Stamm XL1Blue). Ein pBluescript-Derivat wurde als Klonierungsvektor verwendet und führt durch das *lacZ*-Gen zur Komplementation des β-Galaktosidase-Defektes. Zellen, die den Vektor durch Transformation aufgenommen haben, können in Anwesenheit des die β-Galactosidase induzierenden Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid (IPTG) X-Gal zu Galactose und 5-Bromo-4-Chloro-3-Hydroxyindol spalten. Diese Substanz wird dann zum unlöslichen blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo oxidiert. Die bekannten Klonierungsvektoren enthalten im *lacZ*-Gen eine multiple Klonierungsstelle, so daß die Ligation des Vektors mit einem Insert dazu führt, daß das *lacZ*-Gen unterbrochen und somit die Bildung einer funktionellen β-Galaktosidase unmöglich wird. Zellen ohne Vektor, bei denen die Transformation nicht erfolgreich war, werden durch eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz negativ selektiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. 'Multilocus Sequence Typing' (MLST) von *E. coli*-Stämmen

Die *E. coli*-Stämme wurden nach einem Schema typisiert, das auf dem Sequenzieren der sieben 'housekeeping'-Gene *adh*, *fumC*, *gyrB*, *mdh*, *icd*, *purA* und *recA* beruht (Wirth *et al.*, 2006).

##### 3.1.1. Typisierung und Zuordnung zu bekannten Sequenztypen (ST)

Die 30 typisierten *E. coli*-Stämme gehörten zu 17 verschiedenen ST. In Tab. 3-1 sind für jeden Stamm der ST und, sofern bekannt, der klonale Komplex, die phylogenetische ECOR-Gruppe (A, B1, B2, D oder E) und ein Referenzstamm für den jeweiligen ST angegeben. Die im folgenden aufgeführten ST wurden nach dem unter 2.2.7. beschriebenen MLST-Protokoll ermittelt. Für 26 der 31 zu typisierenden *E. coli*-Stämme konnte der ST eindeutig ermittelt werden. Für vier *E. coli*-Stämme (s. 3.1.2.) wurde ein neuer ST identifiziert (vgl. 3.1.2.). Die *E. coli*-Modellstämme MG1655 (K-12) und 536 dienten für alle weiteren Experimente dieser Arbeit als Negativ- bzw. Positivkontrolle, ihre ST waren bereits bekannt ([http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/Downloads\\_HTML](http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/Downloads_HTML)).

**Tab. 3-1: MLST-Analyse der *E. coli*-Isolate**

Stammbezeichnung / Serotyp	Pathotyp	ST	Phyl. Gruppe	ST-Komplex	Referenzstamm
0512E015 (OR:H-)	EHEC	25	B1	-	3171/00
11205019 (OR:H-)	EHEC	1418	(B1)	-	-
5726/96 (O3:H10)	EHEC	10	A	10	17-2
4941/97 (OntH-)	EHEC	25	B1	-	3171/00
4828/97 (O40:H-)	EHEC	26	B1	-	3199/98
3357/98 (O60:H-)	EHEC	360	(B1)	23	IMT7927
4595/97 (O62:H-)	EHEC	33	AxB1	-	4797/97
1505M052 (O128:H-)	EHEC	1419	(B1)	-	-
11055110 (O128:H-)	EHEC	33	AxB1	-	4797/97
3172/97 (O128:H2)	EHEC	25	B1	-	3171/00
3600/97 (O128:H2)	EHEC	25	B1	-	3171/00
3115/97 (O128:H2)	EHEC	25	B1	-	3171/00
3171/97 (O128:H2)	EHEC	25	B1	-	3171/00
EH250	EHEC	10	A	10	17-2

5480/95 (O3:H2)	EAEC	10	A	10	17-2
17-2 (O3:H2)	EAEC	10	A	10	17-2
4140/86 (O44:Hnt)	EAEC	30	D	-	4140/86
7482/95 (O73:H1)	EAEC	30	D	-	4140/86
7484/94 (O86:H18)	EAEC	31	D	31	4356/96
RD2 (O111:H2)	EAEC	43	A	10	ECOR 10
RD7 (O111:H2)	EAEC	43	A	10	ECOR 10
DPA065 (O119:Hnt)	EAEC	10	A	10	17-2
536 (O6:K15:H31)	UPEC	92	B2	-	
J96 (O4:K:H5)	UPEC	12	B2	12	
E-B35 (O4:K12:H5)	UPEC	12	B2	12	20025
2980 (O18ac:K5:H5/11)	UPEC	1416	(B2)		
764 (O18:K5:H5/11)	UPEC	14	B2	14	21084
1E3 (nt)	Komm.	1417	(A)		
F18 (OR:K1:H5)	Komm.	95	B2	95	A54
AC/1 (O78)	APEC	88	B1	23	ECOR 70
MG1655 (OR:K12:H48)	K-12	98	A	10	
DSM6601 (O6:K5:H1)	Probiot.	73	B2	73	ECOR 51

ST, ST-Komplex, die phylogenetische ECOR-Gruppe und ein Referenzstamm für den jeweiligen ST sind für vorbeschriebene ST der typisierten Stämme dieser Studie angegeben. Nicht für jeden ST kann aktuell ein ST-Komplex angegeben werden. Die Stämme 2980, 1E3, 11205019 und 1505M052 ließen sich keinem der bislang beschriebenen ST zuordnen; die Stämme 536 und MG1655 waren vortypisiert.

Die 32 in Tab. 3-1 aufgeführten *E. coli*-Stämme gehörten zu 19 verschiedenen ST sieben verschiedener ST-Komplexe. Mindestens fünf verschiedene ST lassen sich bislang keinem ST-Komplex zuordnen, während die neu definierten ST 1416, 1417, 1418 und 1419 in jeweils mindestens fünf Allelen mit einem innerhalb des Stammkollektives dieser Studie für andere Stämme ermittelten ST übereinstimmten. Somit repräsentiert das in dieser Arbeit untersuchte Stammkollektiv eine bezüglich der *E. coli*-Phylogenie relativ heterogene Stammsammlung (vgl. 4.1.).

Die 14 STEC/EHEC-Stämme dieser Studie zählten zu fünf verschiedenen ST, die acht EAEC-Stämme zu vier ST. Die fünf UPEC-Stämme gehörten zu vier ST, und auch die übrigen Stämme (ein Fäkalisolat aus einer Langzeitstudie zu chronischen Harnwegsinfekten (1E3), sowie der Fäkalstamm (F18), der vogelpathogene O78-Stamm (AC/1), der apathogene K-12-Stamm MG1655 sowie der probiotische Stamm DSM6601) gehörten zu jeweils einem unterschiedlichen Sequenztyp.

### 3.1.2. Identifizierung neuer Sequenztypen (ST)

Die Stämme 2980, 1E3, 11205019 und 1505M052 ließen sich keinem bereits beschriebenen ST zuordnen; sie repräsentieren neu identifizierte und nach Einsenden der Sequenzen an das Environmental Research Institute (ERI) des University College Cork (UCC) neu benannte ST (s. Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Neu identifizierte Sequenztypen (ST) für *E. coli*

Neuer ST	Stamm	Allel <i>adk</i>	Allel <i>fumC</i>	Allel <i>gyrB</i>	Allel <i>icd</i>	Allel <i>mdh</i>	Allel <i>purA</i>	Allel <i>recA</i>
1416	2980	14	14	10	14	<b>8</b>	7	10
1417	1E3	10	11	4	8	<b>9</b>	<b>13</b>	2
1418	11205019	6	<b>248</b>	14	21	9	7	7
1419	1505M052	6	6	14	21	9	<b>169</b>	7

Es sind die Allele für alle sieben sequenzierten 'housekeeping'-Gene angegeben. Der Stamm 2980 unterschied sich in seinem *mdh*-Allel (8), der Stamm 1E3 in seinen Allelen für die Gene *mdh* (9) und *purA* (13) von ST10. Der Stamm 11205019 unterschied sich in seinem Allel für das Gen *fumC* (248), der Stamm 1505M052 in seinem Allel für das Gen *purA* (169) von ST25.

Die Stämme 11205019 und 1505M052 (beide ECOR-Gruppe B1, unterschieden sich in jeweils einem Allel von ST 25) dürften künftig gemeinsam mit ST 25 einen ST-Komplex bilden, während der Stamm 2980 (ECOR-Gruppe B2, unterschieden sich in einem Allel von ST 14) innerhalb des Stammkollektives dieser Studie eng verwandt war mit *E. coli* 764 und der Stamm 1E3 (ECOR-Gruppe A, unterschieden sich in zwei Allelen von ST 10) dem ST 10-Komplex zugehörte.

### 3.1.3. Phylogenetische Analyse

Abb. 3-1 zeigt für die 30 in dieser Arbeit typisierten *E. coli*-Stämme die verwandtschaftlichen Zusammenhänge (basierend auf ihrem Kernchromosom). Es gehörten 22 von 32 typisierten Stämmen (mit den Stämmen MG1655 und 536) zu den phylogenetischen Gruppen A, B1 und AxB1 (s. Tab. 3-1). Zu den Gruppen A, B1 und AxB1 zählten alle 14 typisierten EHEC-Stämme (A, B1, AxB1), fünf von acht EAEC-Stämmen (A), der Stamm 1E3 (A), der APEC-Stamm (B1) und der K-12-Stamm MG1655 (A). Lediglich 10 der 32 Stämme zählten zu den Gruppen B2 und D. Diesen

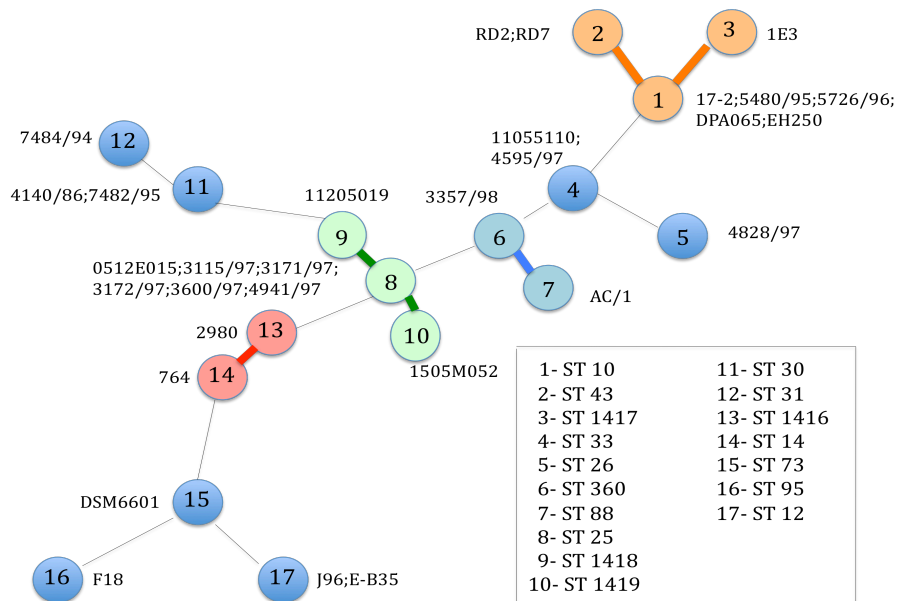
beiden Gruppen zuzurechnen waren drei der acht EAEC-Stämme (D), alle fünf UPEC-Stämme (B2), die Stämme F18 (B2) und DSM6601 (B2).

Die meisten Stämme dieser Arbeit zählten zu zwei klonalen Komplexen: den klonalen Komplexen ST 25 und ST 10. Zum ST 25-klonalen Komplex der phylogenetischen Gruppe B1 zählten acht der in dieser Arbeit typisierten Stämme; sechs Stämme des ST 25 sowie zwei Stämme zweier der vier neu identifizierten ST, die sich nur in jeweils einem Allel vom ST 25 unterschieden. Zum ST10-klonalen Komplex der phylogenetischen Gruppe A zählten ebenfalls acht Stämme; fünf Stämme des ST 10, zwei weitere Stämme sowie einer der Stämme mit einem neu identifizierten ST (vgl. Abb. 4-1).

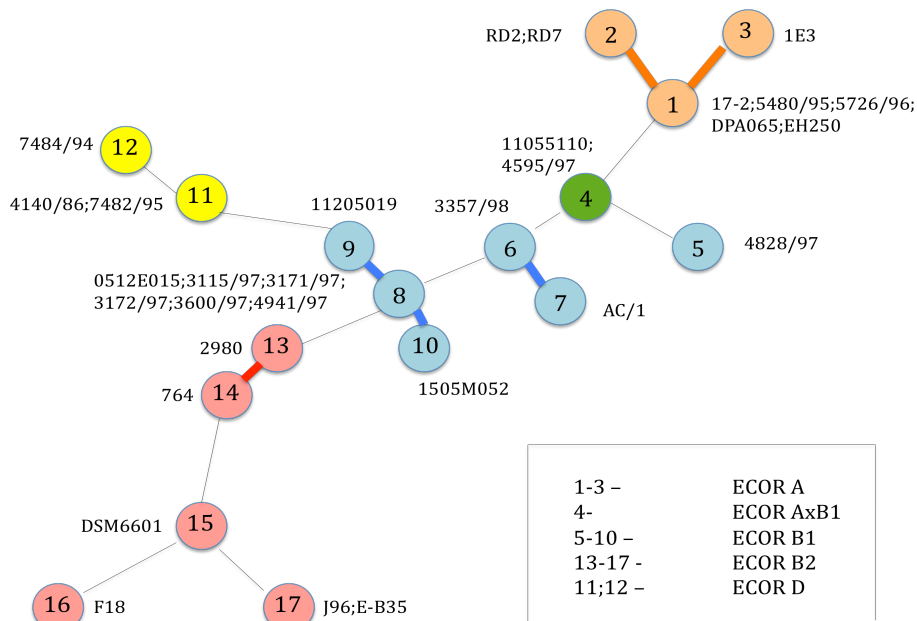
**Tab. 3-3: Zuordnung ermittelter ST zu den phylogenetischen Gruppen A, B1, AxB1, B2 und D**

A	ST	B1	ST	AxB1	ST	B2	ST	D	ST
5726/96		0512E015	25	4595/97	33	536	92	4140/86	30
EH250		<b>11205019</b>	1418	11055110	33	J96	12	7482/95	30
5480/95	10	4941/97	25			E-B35	12	7484/94	31
17-2	10	4828/97	26			<b>2980</b>	1416		
RD2	10	<b>3357/98</b>	360			764	14		
RD7	10	<b>1505M052</b>	1419			F18	95		
DPA065	43	3172/97	25			DSM6601	73		
<b>1E3</b>	43	3600/97	25						
MG1655	10	3115/97	25						
	1417	3171/97	25						
	98	AC/1	88						

Hervorgehobene Stämme wurden einer phylogenetischen Gruppe aufgrund von Ähnlichkeiten mit einem ST bekannter phylogenetischer Gruppenzugehörigkeit zugeteilt.



A



B

**Abb. 3-1: Verwandtschaftsverhältnisse der durch MLST analysierten *E. coli*-Stämme (neighbour joining tree).** Klonale Verteilung der untersuchten *E. coli*-Stämme. ST desselben klonalen Komplexes sind mit farbigen Verbindungslinien hervorgehoben (A). Zugehörigkeit der Stämme zu den phylogenetischen Gruppen A, B1, AxB1, B2 und D (B). Modifiziert nach Ridom SeqSphere Version 0.9.18.



### 3.2. Untersuchungen zur Verbreitung des *irp* / *fyuA*-Genclusters und der PAI III<sub>536</sub>

Mittels PCR wurde unter 36 *E. coli*-Stämmen (STEC/EHEC, EAEC, UPEC, APEC, drei Fäkalstämmen und zwei apathogenen *E. coli*-Stämmen) und 14 *S. enterica*-Stämmen das Vorkommen je zwei spezifischer Fragmente des (i) *irp* / *fyuA*-Genclusters und der (ii) PAI III<sub>536</sub> des UPEC-Stammes 536 untersucht.

#### 3.2.1. PCR-Nachweis der Gene *irp2* und *fyuA*

Das *irp* / *fyuA*-Gencluster wurde im Genom von 86 % der *E. coli*- und 86 % der *S. enterica*-Stämme dieser Studie nachgewiesen. Die Gene *irp2* und *fyuA* können als Marker für das Vorkommen des *irp* / *fyuA*-Genclusters verwendet werden (Schubert *et al.*, 1999). Der *E. coli*-Stamm MG1655 (K-12) diente als Negativkontrolle für das Vorliegen beider Gene. Als Positivkontrolle diente der *E. coli*-Stamm 536. Abb. 3.2. veranschaulicht die Primerauswahl und Lokalisation amplifizierter Gensequenzen. Etwa 3 % aller bislang untersuchten *E. coli*-Stämme weisen eine das Gen *fyuA* umfassende Deletion im 3'-Bereich der Insel auf; in keinem der in dieser Arbeit untersuchten Stämme wurde diese Deletion detektiert.

Tab. 3-4: Nachweis der *irp2* / *fyuA*-Gene in den untersuchten Stämmen

Stammbezeichnung / Serotypisierung	<i>irp2</i> -PCR	<i>fyuA</i> -PCR
EHEC 0512E015 (OR:H-)	positiv	positiv
EHEC 11205019 (OR:H-)	positiv	positiv
EHEC 5726/96 (O3:H10)	positiv	positiv
EHEC 4941/97 (Ont:H-)	positiv	positiv
EHEC 4828/97 (O40:H-)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
EHEC 3357/98 (O60:H-)	positiv	positiv
EHEC 4595/97 (O62:H-)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
EHEC 1505M052 (O128:H-)	positiv	positiv
EHEC 11055110 (O128:H-)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
EHEC 3172/97 (O128:H2)	positiv	positiv
EHEC 3600/97 (O128:H2)	positiv	positiv
EHEC 3115/97 (O128:H2)	positiv	positiv
EHEC 3171/97 (O128:H2)	positiv	positiv
EHEC 8081/97 (Ont:H8)	positiv	positiv
EHEC 4794/97 (O111:H-)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
EHEC 3117/97 (O128:H-)	positiv	positiv
EAEC 5480/95 (O3:H2)	positiv	positiv
EAEC 17-2 (O3:H2)	positiv	positiv
EAEC 4140/86 (O44:Hnt)	positiv	positiv
EAEC 7482/95 (O73:H1)	positiv	positiv

EAEC 7484/94 (O86:H18)	positiv	positiv
EAEC RD2 (O111:H2)	positiv	positiv
EAEC RD7 (O111:H2)	positiv	positiv
EAEC DPA065 (O119:Hnt)	positiv	positiv
EAEC DEF047 (O86:Hnt)	positiv	positiv
EAEC DPT041 (O86:Hnt)	positiv	positiv
UPEC 536 (O6:K15:H31)	positiv	positiv
UPEC J-96 (O4:K:H5)	positiv	positiv
UPEC E-B35 (O4:K12:H5)	positiv	positiv
UPEC 2980 (O18ac:K5:H5/11)	positiv	positiv
UPEC 764 (O18:K5:H5/11)	positiv	positiv
1E3 (nt)	positiv	positiv
F18 (OR:K1:H5)	positiv	positiv
APEC AC/1 (O78)	positiv	positiv
MG1655 (OR:K12:H48)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
DSM6601 (O6:K5:H1)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 315 II(6,8:a:z52)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 1752 (16:z:-)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> 1649 (38:z54:-)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> IIIb 1474 (50:l,v:z35)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 1757 IIIb (53:r:z68)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 50/95 IIIb (61:k:1,5)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 461/95 IIIb (61:k:1,5)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 658/95 IIIb (61:k:1,5)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 1376/95 IIIb (61:i:z)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 1380 IIIb (61:l,v:1,5,(7))	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 1474 IIIb (50:l,v:z35)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 845/96 IIIb (47:r:z53)	positiv	positiv
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> 1701 VI (41:b:1,7)	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> 1443 VI (45:a:e,n,x)	positiv	positiv

Insgesamt 31 (86 %) der hier untersuchten 36 *E. coli*-Stämme waren *irp2* / *fyuA*-PCR-positiv; 12 (75 %) der 16 untersuchten EHEC-Stämme, zehn (100 %) der zehn untersuchten EAEC-Stämme, fünf (100 %) der fünf getesteten UPEC-Stämme, der Stamm 1E3 und F18, sowie der APEC-Stamm AC/1 und der probiotische Stamm DSM6601. 12 (86 %) der 14 untersuchten *S. enterica*-Stämme waren *irp2* / *fyuA*-positiv.

### 3.2.2. 'Southern Blot'-Hybridisierung zum Nachweis einer 17 bp-DR-Sequenz

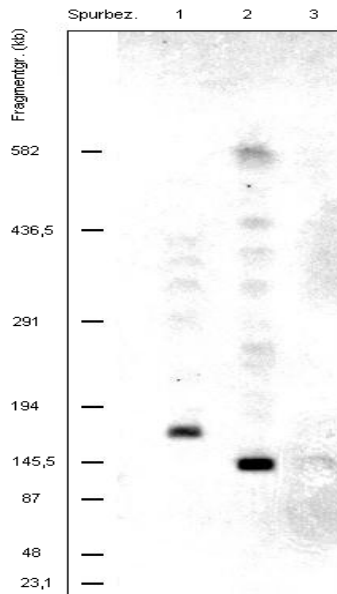
Obwohl die *E. coli*-HPI zur evolutionären *Yps*-HPI-Linie zählt, ist das 17 bp-DR im Chromosom aller bislang untersuchten Stämme der Spezies *E. coli* nicht konserviert. Chromosomale DNA der in Tab. 3-5 aufgeführten Stämme wurde mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III inkubiert. 'Southern Blots' der anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einer für die

nachzuweisende 17 bp-Sequenz aus dem 3'-Bereich von *asntRNA*-Genen spezifischen, Digoxigenin-ddUTP-markierten Sonde hybridisiert.

**Tab. 3-5: Nachweis des 17 bp-DR durch 'Southern Blot'-Analyse**

<b>Stammbezeichnung EHEC</b>	<b>Bandenzahl</b>
5726/96	2-3
4941/97	4-5
4828/97	3-4
11055110	3
3600/97	4-5
3115/97	4-5
3171/97	4-5
8081/97	4-5
4797/97	4-5
3117/97	6
RD2	1
RD7	1
5480/95	3-4
7484/94	3-4
17-2	2
7482/95	3
DEF047	2
4140/86	2
DPA065	3
DPT041	4-5
J96	2
MG1655	3-4
DSM6601	5-6

Zusätzlich wurde für die Stämme MG1655, 536 und 536-21 *Xba*I-geschnittene und über Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) aufgetrennte sowie mittels 'Southern Blot' auf einer Membran fixierte chromosomale DNA mit der 17 bp-Oligonukleotidsonde hybridisiert (s. Abb. 3-3). Für alle drei Stämme war eine einzelne Hybridisierungsbande sichtbar. Für den Stamm MG1655 wurde die entsprechende Bande bei einer Höhe von etwa 170 kb, für die Stämme 536 und 536-21 bei einer Höhe  $\leq 145$  kb detektiert.



**Abb. 3-2: Nachweis des 17 bp-DR bzw. einer identischen Sequenz aus dem 3'-Bereich von *asntRNA*-Genen** Die *Xba*I-geschnittene und mittels PFGE aufgetrennte DNA der Stämme MG1655 (Spur 1), 536 (Spur 2) und 536-21 (Spur 3) wurden mit einer Digoxigenin-ddUTP-markierten, für die nachzuweisende 17 bp-Sequenz spezifischen Sonde hybridisiert. Die DNA des *E. coli*-Stammes MG1655 diente als Referenzstamm.

### 3.2.3. PCR-Nachweis zweier Fragmente des äußersten 5'-Bereiches der PAI III<sub>536</sub>

Die in dieser Studie verwendeten *E. coli*-Stämme wurden zusätzlich zur HPI auf das Vorkommen des 5'-Bereiches der PAI III<sub>536</sub> untersucht, der eine vollständige Kopie des IS100 umfaßt. Der 5'-Bereich der PAI III<sub>536</sub> war für keinen der in dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Stämme mit den etablierten PCR nachweisbar.

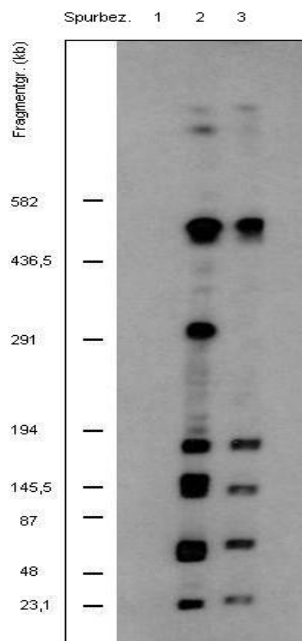
### 3.3. Untersuchungen zur Verbreitung des IS100

Das IS100 ist im Bereich der AT-reichen, variablen Region der *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*-HPI integriert, fehlt aber im Bereich der *E. coli*-HPI bislang untersuchter Stämme, obwohl diese in ihren Kernsequenzen eine 98-100 %ige Identität zu den HPI-Kernsequenzen des *Y. pseudotuberculosis*- und *Y. pestis*-Genomes aufweist (B. Lesic and E. Carniel, 2005). Das IS100 liegt jedoch in zahlreichen Kopien im Chromosom des Stammes 536 vor (s. Abb. 3-4); im Bereich der PAI III<sub>536</sub> mit einer intakten Kopie im 5'-Bereich dieser Insel, sowie mit einer kryptischen Kopie downstream des *iro*-Genclusters (Dobrindt *et al.*, 2001). Im *Y. pestis*-Genom schließen

zwei Kopien des *IS100* den *pgm*-Locus ein (Fetherston *et al.*, 1992). Sowohl die HPI des *Y. pestis*-Genomes, als auch die PAI III<sub>536</sub> zeigen vergleichsweise hohe Deletionsraten, die auf homologe Rekombination zwischen jeweils zwei Kopien des *IS100* zurückgeführt werden.

### 3.3.1. Nachweis des *IS100* im Chromosom des UPEC-Stammes 536

Das *IS100* liegt im Chromosom des UPEC-Stammes 536 in zahlreichen Kopien vor (s. Abb. 3-4). DNA-Sequenzierungen aller bekannten PAIs des Stammes 536 zeigen, daß das *IS100* intakt oder in Fragmenten im Bereich der Pathogenitätsinseln PAI I<sub>536</sub>-III<sub>536</sub> vorkommt. Für die Stämme MG1655, 536 und 536-21 wurde ein 'Southern Blot' *Xba*I-geschnittener chromosomaler DNA dieser Stämme mit einer *IS100*-spezifischen Sonde hybridisiert.



**Abb. 3-3: Nachweis des *IS100* im Genom der *E. coli*-Stämme MG1655, 536 und 536-21**

Die *Xba*I-geschnittene und mittels PFGE aufgetrennte DNA der Stämme MG1655 (Spur 1), 536 (Spur 2) und 536-21 (Spur 3) wurde mit einer *IS100*-spezifischen Sonde hybridisiert.

### 3.3.2. PCR-Nachweis des IS100

Die Verbreitung des IS100 wurde mittels PCR unter allen 36 *E. coli*-Stämmen sowie den überwiegend *irp2* / *fyuA*-positiven 14 *S. enterica*-Stämmen dieser Studie untersucht (s. Tab. 3-8). Das IS100 war mit der durchgeführten PCR in 56 % der *E. coli*-Stämme, jedoch im Genom keines der *S. enterica*-Stämme nachweisbar.

**Tab. 3-6: Ergebnisse der IS100-PCR**

Stammbezeichnung / Serotypisierung	IS100-PCR	<i>irp2</i> - / <i>fyuA</i> -PCR
EHEC 0512E015 (OR:H-)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 11205019 (OR:H-)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 5726/96 (O3:H10)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EHEC 4941/97 (OntH-)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 4828/97 (O40:H-)	negativ	negativ
EHEC 3357/98 (O60:H-)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EHEC 4595/97 (O62:H-)	negativ	negativ
EHEC 1505M052 (O128:H-)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 11055110 (O128:H-)	negativ	negativ
EHEC 3172/97 (O128:H2)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 3600/97 (O128:H2)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 3115/97 (O128:H2)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 3171/97 (O128:H2)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 8081/97 (Ont:H8)	negativ	<b>positiv</b>
EHEC 4794/97 (O111:H-)	negativ	negativ
EHEC 3117/97	negativ	<b>positiv</b>
EAEC 5480/95 (O3:H2)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC 17-2 (O3:H2)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC 4140/86 (O44:Hnt)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC 7482/95 (O73:H1)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC 7484/94 (O86:H18)	negativ	<b>positiv</b>
EAEC RD2 (O111:H2)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC RD7 (O111:H2)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC DPA065 (O119:Hnt)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC DEF047 (O86:Hnt)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
EAEC DPT041 (O86:Hnt)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
UPEC 536 (O6:K15:H31)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
UPEC J96 (O4:K:H5)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
UPEC E-B35 (O4:K12:H5)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
UPEC 2980 (O18ac:K5:H5/11?)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
UPEC 764 (O18:K5:H5/11)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
1E3 (nt)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
F18 (OR:K1:H5)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
APEC AC/1 (O78)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
MG1655 (OR:K12:H48)	negativ	negativ
DSM6601 (O6:K5:H1)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 315 II(6,8:a:z52)	negativ	negativ
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 1752 (16:z:-)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> 1649 (38:z54:-)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> IIIb 1474 (50:l,v:z35)	negativ	<b>positiv</b>

<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 1757 IIIb (53:r:z68)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 50/95 IIIb (61:k:1,5)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 461/95 IIIb (61:k:1,5)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 658/95 IIIb (61:k:1,5)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 1376/95 IIIb (61:i:z)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 1380 IIIb (61:l,v:1,5,(7))	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 1474 IIIb (50:l,v:z35)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. diarizonae 845/96 IIIb (47:r:z53)	negativ	<b>positiv</b>
<i>S. enterica</i> subsp. indica 1701 VI (41:b:1,7)	negativ	negativ
<i>S. enterica</i> subsp. indica 1443 VI (45:a:e,n,x)	negativ	<b>positiv</b>
<i>Y. enterocolitica</i> WA-314 (STO8)	negativ	<b>positiv</b>
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 252 (O1A)	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig die weite Verbreitung des IS100 in einem heterogenen Kollektiv von *E. coli*-Stämmen sowie das im Vergleich dazu auffällige Fehlen des 986 bp-IS100-Fragmentes im Genom der 14 untersuchten *S. enterica*-Stämme. Für 20 (56 %) der insgesamt 36 untersuchten *E. coli*-Stämme war das IS100 nachweisbar. Der Stamm 7484/94 war PCR-negativ, das IS100 ließ sich aber mittels 'Southern Blot'-Hybridisierungen nachweisen (vgl. 3.3.4.). Insgesamt 31 (86 %) der hier untersuchten 36 *E. coli*-Stämme waren *irp2* / *fyuA*-positiv; 20 (65 %) von ihnen zusätzlich IS100-positiv.

### 3.3.3. Korrelationsanalyse IS100 – HPI

Mittels linearer Regressionanalyse (PARTEK Genomics Suite-Software) besteht innerhalb des Kollektives von 37 Stämmen dieser Arbeit (*E. coli*-Stammkollektiv inkl. des später als non-*E. coli* ausgeschlossenen Stammes 8B5) eine signifikante positive Korrelation des Vorkommens des IS100 mit der HPI ( $r = 0,35$ ;  $p < 0.015$ ). Das Vorhandensein bzw. Fehlen des jeweiligen Charakteristikums (IS100 oder HPI) wurde mit '1' bzw. '0' bezeichnet.

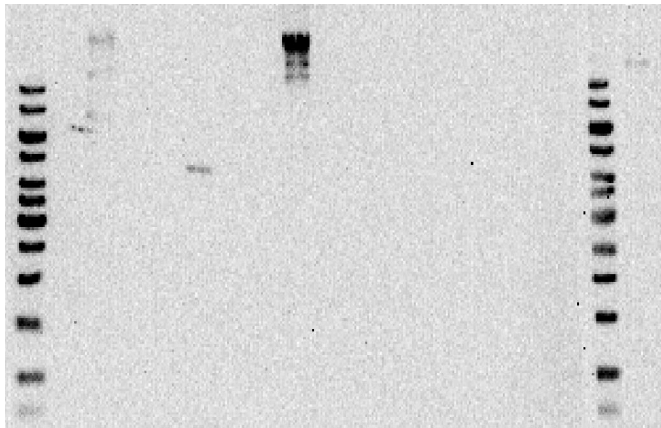
### 3.3.4. 'Southern Blot'-Hybridisierungen zum Nachweis des IS100

Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse, Abschätzung der IS100-Kopienzahlen und Feststellung von Bandenmusterähnlichkeiten oder -differenzen unter 32 *E. coli*-Stämmen wurden 'Southern Blot'-Hybridisierungen *Hind* III-geschnittener chromosomaler DNA mit der IS100-Sonde durchgeführt (vgl. 3.3.1.). Tab. 3-9 und Abb. 3-5 zeigen die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente.

Tab. 3-7: Nachweis des IS100 in den untersuchten *E. coli*-Isolaten

Bandenzahl	0	1	2	3
<i>E. coli</i> -Stämme	0512E015	5726/96	DPA065	(3357/98)
	11205019	4140/86		5480/95
	4941/97	7482/95		17-2
	4828/97	7484/94		536
	4595/97	RD2/		J96
	1505M052	RD7		1E3
	11055110	E-B35		F18
	3172/97	2980		
	3600/97	764		
	3115/97	AC/1		
	3171/97	DSM6601		
	EH250			

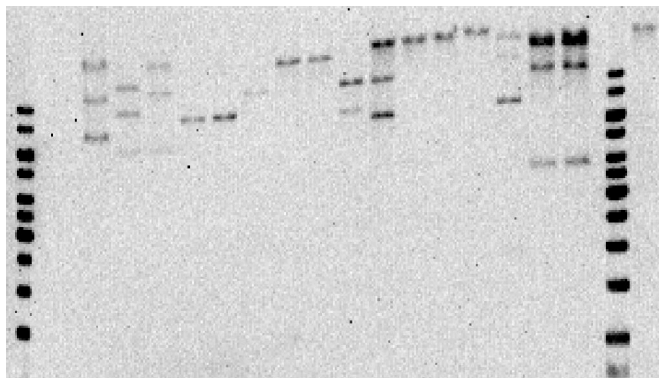
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



(A)

	Stamm		Stamm
1	Marker	11	1505M052
2	MG1655	12	11055110
3	536	13	3172/97
4	0512E015	14	3600/97
5	11205019	15	3115/97
6	5726/96	16	3171/97
7	4941/97	17	EH250
8	4828/97	18	Marker
9	3357/98	19	AC/1
10	4595/97		

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



(B)

	Stamm		Stamm
1	Marker	11	DPA065
2	MG1655	12	J96
3	536	13	E-B35
4	5480/95	14	2980
5	17-2	15	764
6	4140/86	16	1E3
7	7482/95	17	8B5
8	7484/94	18	F18
9	RD2	19	Marker
10	RD7	20	DSM6601

Abb. 3-4: Hybridisierungen chromosomaler *E. coli*-DNA mit einer IS100-spezifischen Sonde.



Für den EAEC-Stamm 7484/94 konnte mit der durchgeführten PCR kein *IS100* nachgewiesen werden. Hybridisierungen mit der *IS100*-Sonde ließen ein im Vergleich mit anderen Banden abgeschwächtes Signal erkennen. Im 7484/94-Genom könnte ein Fragment des *IS100* vorliegen oder ein mit dem *IS100* verwandtes IS-Element, so daß ein Nachweis mit den verwendeten Primern nicht gelänge. Sowohl die Gruppe der Stämme mit einer Hybridisierungsbande, als auch die Gruppe der Stämme mit je drei Hybridisierungsbanden umfassen apathogene und pathogene Isolate.

## 4. Diskussion

Die genetische Variabilität und die kurzen Generationszeiten von Prokaryoten ermöglichen eine besonders effiziente Anpassung an sich wechselnde Umweltbedingungen. Neben der Konservierung essentieller Funktionen, deren kodierende Sequenzen allen Bakterien einer Spezies gemein sind, weisen Bakteriengenome variable DNA-Bereiche auf, die ihnen die Besiedelung neuer ökologischer Nischen ermöglichen (J. Hacker und E. Carniel, 2001; Feil, 2004). Die als klonal beschriebene Populationsstruktur der Spezies *E. coli* einerseits sowie die sich um bis zu ein Mbp unterscheidenden Genomgrößen einzelner *E. coli*-Isolate zeigen für diese Spezies die Bedeutung der Konservierung essentieller Sequenzen, aber auch die Bedeutung der genetischen Variabilität für die Zusammensetzung des Bakteriengenomes. Das Kerngenom macht lediglich 60 bis 70 % des *E. coli*-Gesamtgenomes aus (Welch *et al.*, 2002) und umfaßt schätzungsweise mindestens 3.100 translatierbare 'Offene Leseraster' (ORF), darunter die rund 232 essentiellen Gene des 'genomischen Rückgrades' des K-12-Stammes MG1655. Die zahlreichen Patho- und Ökotypen der Spezies *E. coli* unterscheiden sich in der Zusammensetzung des flexiblen Genpools, der 27, 2 % der translatierbaren ORF des MG1655-Genomes ausmacht (Dobrindt *et al.*, 2003). Prototypische Bestandteile des flexiblen Genpools, darunter mobile genetische Elemente bzw. mosaikartig aus horizontal transferierten Sequenzen zusammengesetzte DNA-Bereiche (Dobrindt *et al.*, 2002; Collyn *et al.*, 2004), können ein sehr variables Vorkommen auch unter genetisch eng verwandten Bakterien einer Art zeigen. Für eine Aussage zur Populationsstruktur der Spezies *E. coli* werden zur Typisierung beispielsweise die Sequenzen essentieller 'housekeeping'-Gene untersucht (M. Achtman, 2001) (s. 4.1.). Für *E. coli* wird inzwischen von einer weniger klonalen Populationsstruktur ausgegangen, als bislang angenommen (Wirth *et al.*, 2006). Da alle variablen Bereiche des Bakteriengenomes potentiell instabil und häufig variabel sind, eignen sich Sequenzen des flexiblen Genpools häufig nicht für phylogenetische Untersuchungen. Mobile genetische Elemente und durch diese mobilisierbare Sequenzbereiche können, müssen aber keine Coevolution mit dem Kerngenom zeigen.

Die 'High Pathogenicity Island' (HPI) zeigt eine weite Verbreitung über Gattungsgrenzen hinweg, während die Pathogenitätsinsel PAI III<sub>536</sub> bislang lediglich für das Genom des UPEC-Stammes 536 beschrieben wurde (s. 4.2.). Pathogenitätsinseln sind potentiell instabile Bereiche, deren Mobilität auf den Eigenschaften mobiler Elemente, wie Bakteriophagen, oder multipler Kopien von IS-Elementen beruhen kann.

Das IS100 ist in Verbindung mit der HPI humanpathogener *Y. pseudotuberculosis*- und *Y. pestis*-Stämme sowie Pathogenitätsinseln des *E. coli* 536-Genomes beschrieben worden. Über die Verbreitung des IS100 unter verschiedenen Genera ist bislang wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Verbreitung des IS100 innerhalb eines heterogenen *E. coli*-Stammkollektives (s. 4.3.).

#### **4.1. MLST und phylogenetische Analyse**

Die auf 'Multilocus-Enzymelektrophorese' (MLEE)-Daten beruhende Definition der ECOR-phylogenetischen Abstammungsgruppen A, B1, B2, D, sowie der Hybridgruppen AxB1 und ABD erlaubte bereits in der Vergangenheit eine übersichtliche Zuteilung von *E. coli*-Isolaten zu im wesentlichen vier phylogenetischen Gruppen. Eine zunächst beschriebene phylogenetische Gruppe E ließ sich in jüngeren Studien nicht klar von den übrigen Gruppen abgrenzen und wird daher meist vernachlässigt. Eine Typisierung mittels MLST für das bislang größte untersuchte globale *E. coli*-Stammkollektiv erbrachte einen Stammbaum, der mit jenem aufgrund der älteren Zuteilung zu den bekannten ECOR-phylogenetischen Gruppen im wesentlichen übereinstimmte (Wirth *et al.*, 2006). Die 32 mittels MLST typisierten *E. coli*-Stämme der vorliegenden Arbeit gehören 19 verschiedenen ST entsprechend den fünf ECOR-Abstammungsgruppen A, B1, B2, D und AxB1 zu. Es handelt sich somit um ein relativ heterogenes Kollektiv von in verschiedenen Jahren und an verschiedenen Orten zumeist von Patienten gewonnenen humanpathogenen Isolaten verschiedener *E. coli*-(Patho)Varianten (EHEC, EAEC, UPEC, apathogene Stämme, Fäkalstämme, APEC).

Die Zugehörigkeit zu bestimmten *E. coli*-Varianten erlaubt nicht unbedingt eine Aussage zur genetischen Verwandtschaft von *E. coli*-Stämmen. Bestimmte Pathotypen

sind aber wiederholt und unabhängig voneinander in bestimmten evolutionären Linien innerhalb der *E. coli*-Gesamtpopulation entstanden (Wirth *et al.*, 2006). So zählt die Mehrzahl pathogener *E. coli* zu den phylogenetischen Linien B2 und D (Bingen *et al.*, 1998; Boyd und Hartl, 1998); in dieser Arbeit waren es zehn von 33 Stämmen (alle ExPEC / APEC / Kommensalstämmen, sowie drei der acht EAEC). Vermutlich handelt es sich bei der Gruppe B2, und nicht wie früher angenommen D um die evolutionsbiologisch älteste der ECOR-phylogenetischen Gruppen (Nelson *et al.*, 1997; Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Die zur Gruppe B2 zählenden Stämme dieser Studie (alle ExPEC-Stämme, aber auch die Kommensalstämmen F18 und DSM6601) sind besonders heterogen bezüglich ihrer klonalen Verteilung; möglicherweise zeigt sich hier, daß es sich um Stämme einer evolutionsbiologisch älteren *E. coli*-Linie handelt. Die Mehrzahl, d. h. rund zwei Drittel der in dieser Arbeit untersuchten Stämme, im wesentlichen Non-O157-EHEC- und die übrigen EAEC-Stämme, sind weniger heterogen bezüglich ihrer ST und zählen zu den phylogenetischen Gruppen A, B1 und AxB1, den evolutionsbiologisch jüngeren Linien innerhalb der Spezies *E. coli*.

#### **4.2. Verbreitung der HPI und der PAI III<sub>536</sub>**

Eine erhöhte bakterielle Virulenz ist in den meisten Fällen durch horizontal erworbene Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren gekennzeichnet, die in vielen Fällen z. B. auf Plasmiden, Bakteriophagen oder im Sequenzzusammenhang von Pathogenitätsinseln (PAI) vorkommen (Hacker *et al.*, 1990; Ochman *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2006). Es wurden erhöhte homologe Rekombinationsraten beschrieben (Wirth *et al.*, 2006). Eine erhöhte Virulenz kann eine erhöhte Fitness für die Besiedelung einer ökologischen Nische innerhalb eines Makroorganismus bedingen (H. Schmidt und H. Hensel, 2004), die eine erhöhte Reproduktionsrate und verbesserte Überlebensfähigkeit des virulenten Mikroorganismus in seinem Habitat bedeutet. Auf diese Weise können wiederum die neuen, mosaikartig zusammengesetzten DNA-Bereiche besonders effizient weitergegeben werden. Somit bedingen nicht nur bestimmte Sequenzzusammensetzungen eine erhöhte Virulenz, sondern eine erhöhte Fitness eines Mikroorganismus fördert auch die Verbreitung bestimmter Zusammensetzungen genetischen Materials. Die HPI könnte die Evolution pathogener bzw. virulenter *E. coli*-Varianten gefördert haben. Eine aus anderen Gründen bestehende erhöhte Virulenz

HPI-positiver *E. coli* und anderer *Enterobacteriaceae* könnte aber auch dazu geführt haben, daß sich der Fitnessfaktor HPI stärker als andere Fitnessfaktoren in einer größeren *E. coli*-Subpopulation durchsetzen konnte. Für die Verbreitung der HPI scheint jedoch nach neuen Erkenntnissen eine positive Selektion durch eine direkte fitness- und pathogenitäts- bzw. virulenzfördernde Wirkung immer wahrscheinlicher. Die HPI wurde ursprünglich als eine 'Fitnessinsel' beschrieben, die lediglich innerhalb des Genus *Yersinia* mit einem hoch-virulenten Phänotyp korreliert und über eine für eine Genomische Insel besonders große Zahl bakterieller Spezies, Genera und sogar Familiengrenzen hinweg verbreitet ist (Schubert *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2002; Koczura *et al.*, 2003; Mokracka *et al.*, 2004). Inzwischen wurden auch für die Spezies *E. coli* und andere *Enterobacteriaceae* eine Korrelation des Vorliegens der HPI mit einem virulenten Phänotyp beschrieben (Schubert *et al.*, 2002; Lawlor *et al.* 2007; Lin *et al.*, 2008; Paauw *et al.*, 2009a) und neben einem fitnessfördernden, eventuell auch im Genom apathogener *E. coli*-Stämme des Darmes (Rakin *et al.*, 1999) und des probiotischen Stammes DSM6601 (Schubert *et al.*, 1999), ein direkt virulenzfördernder Effekt durch die schwächende Wirkung des Yersiniabactin auf die Wirkung aktivierter Immunzellen (Paauw *et al.*, 2009b). Die bakterielle Expression von HPI-Genen, darunter auch das für das 230 kDa-Protein HMWP2 kodierende *irp2*, sowie das für den Yersiniabactinrezeptor FyuA kodierende *fyuA* sind erhöht in Umgebungen, die sich durch einen Mangel an freiem Eisen auszeichnen, darunter auch der menschliche Körper, in besonderem Maße während einer Infektion (Ward *et al.*, 2005; Chauvaux *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008). Die Stabilisierung der Insel bei häufig erhaltener Funktionalität (Schubert *et al.*, 2009) und Korrelation mit 'fitten' pathogenen *E. coli*-Phänotypen sprechen für eine positive Selektion der HPI. Die HPI-Stabilisierung im Rahmen des sogenannten 'homing' (Hacker and Kaper, 2000) kommt durch die Afunktionalität der verkürzten P4-homologen Integrase und fehlende Konservierung des die *Yps*-HPI im *Y. pseudotuberculosis*- und *Y. pestis*-Genom flankierenden 3'-17 bp-DR zustande (Schubert *et al.*, 1999). Trotz dieser Stabilisierung wurde eine Funktionalität der HPI im Genom von 92 % von 54 *E. coli*-Stämmen der phylogenetischen Gruppe B2, sowie 32 % *E. coli*-Stämmen der phylogenetischen Gruppe A und 48 % der phylogenetischen Gruppe B1 nachgewiesen (Schubert *et al.*, 2002). *E. coli*-Stämme der Gruppen B2 und

D wurden als HPI-positiv beschrieben (Schubert *et al.*, 2009), womit auch die PCR-Ergebnisse dieser Studie übereinstimmen. In dieser Arbeit wurde die Verbreitung der HPI in einem Stammkollektiv aus 37 *E. coli* und 14 *S. enterica*-Stämmen untersucht. Bei den *S. enterica*-non-subsp. I-Stämmen, die zu 86 % (12 von 14) HPI-positiv waren, handelt es sich um ein heterogenes Kollektiv von Isolaten, die von Tieren und Menschen isoliert wurden; im Genom von *S. enterica* subsp. I-Stämmen liegt die HPI nicht vor (Ölschläger *et al.*, 2003). Die *E. coli*-Stämme zählten mehrheitlich zwar nicht zur ECOR-phylogenetischen Gruppe B2, dennoch war die HPI in insgesamt 84 % (31 von 37) der *E. coli*-Stämme nachweisbar. Unter Stämmen der ECOR-phylogenetischen Gruppen A und B1 scheint die Insel nur sporadisch vorzukommen (Clermont *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2009); in den meisten der in dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Stämme dieser phylogenetischen Gruppen waren die HPI-Gene jedoch nachweisbar. Die *E. coli*-Stämme sind mehrheitlich Patientenisolate aus *E. coli*-bedingten Ausbrüchen aus verschiedenen Jahren und von verschiedenen Orten (EHEC-, EAEC-, UPEC-Ausbrüche). Die HPI-negativen *E. coli*-Stämme zählten zu den ST 26 (B1), 33 (AxB1) und 98 (A).

Die für eine Genomische Insel ungewöhnlich weite Verbreitung der HPI läßt sich möglicherweise nicht nur durch die positive Selektion des Yersiniabactin-Systemes oder die nahe Verwandtschaft verschiedener *Enterobacteriaceae* und deren gemeinsame Habitate erklären, sondern auch durch einen besonders effizienten Mechanismus der horizontalen Verbreitung. Wie auch die PAI III<sub>536</sub> über zwei alternative Mechanismen aus dem UPEC 536-Chromosom deletieren kann, durch homologe Rekombination zwischen zwei Kopien des IS100, oder durch ortsspezifische Rekombination, könnte die *E. coli*-HPI in der Vergangenheit ebenfalls durch alternative Mechanismen in das *E. coli*-Genom integriert worden sein. Die *Yps*-HPI des *Yersinia*-Genomes ist mit dem IS-Element IS100 assoziiert und kann durch homologe Rekombination zwischen zwei IS100-Kopien hochfrequent aus dem *Y. pestis*-Genom deletieren. Auch die PAI III<sub>536</sub> deletiert unter stabilen Kulturbedingungen des UPEC-Stammes 536 mit höherer Frequenz über homologe Rekombination zwischen zwei IS100-Kopien, als über den Mechanismus der ortsspezifischen Rekombination. Es ist daher denkbar, daß die HPI unter *E. coli*-Stämmen ebenfalls effizient über einen Mechanismus verbreitet wurde, der das Vorhandensein multipler Kopien des IS100 beinhaltet, selbst wenn das IS100 im

Genom heutiger, diesbezüglich untersuchter *E. coli*-Stämme kein Bestandteil der AT-reichen variablen Region der HPI ist. Das Vorkommen des *IS100* korreliert für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme signifikant mit dem Vorliegen der HPI-Gene *irp2* und *fyuA* ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,015$ ). Die ursprüngliche(n) *IS100*-Kopie(n) könnte(n) nach Integration in ein oder mehrere *E. coli*-Vorläufergenome eine Positionsänderung erfahren haben. Es muß zudem in einigen Fällen zu einer Verfielfältigung von *IS100*-Kopien in bestimmten *E. coli*-Vorläufergenomen gekommen sein (vgl. 4.3.). Interessanterweise ist das *IS100* mit zahlreichen Pathogenitätsinseln des *E. coli* 536-Genomes assoziiert.

Da die Verbreitung und Evolution der HPI aufgrund der ursprünglichen oder fortbestehenden Weitergabe durch einen oder verschiedene Mechanismen des horizontalen Gentransfers nicht mit der Phylogenie des *E. coli*-Wirtsgenomes korreliert, können andererseits *E. coli*-Stämme verschiedener phylogenetischer Gruppen hochgradig verwandte HPI-Sequenzen aufweisen (Schubert *et al.*, 2009). Die HPI könnte mehrfach in ein Genom der Spezies *E. coli* integriert worden sein, wie dies bereits für andere Virulenzgene beschrieben wurde (Escobar-Paramo *et al.*, 2004). Neuere Studien betonen jedoch auch die Möglichkeit, die HPI könnte gemeinsam mit dem Colibactin-Gencluster unter Beteiligung von Plasmiden und ICE-ähnlichen Elementen in einem größeren Sequenzzusammenhang acquiriert worden sein (Putze *et al.*, 2009) sowie nach ihrer Integration in ein *E. coli*-Vorläuferchromosom intraspezifisch durch homologe Rekombinationen eine weitere Verbreitung erfahren haben (Schubert *et al.*, 2009).

Alle Stämme des Stammkollektives dieser Arbeit wurden des weiteren auf das Vorliegen des 5'-Bereiches der PAI III<sub>536</sub> hin untersucht, da dieser eine intakte Kopie eines *IS100* umfaßt. Der 5'-Randbereich der PAI III<sub>536</sub> war im Genom keines der untersuchten Stämme nachweisbar. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um den Sequenzzusammenhang handelt, in dem das *IS100* in ein Vorläuferchromosom integriert wurde. Die PAI III<sub>536</sub> umfaßt unter anderem die für S-Fimbrien und das Siderophor Salmochelin kodierenden Sequenzen (Dobrindt *et al.*, 2001; Feldmann *et al.*, 2007).

### 4.3. Verbreitung des IS100

Für besonders virulente klonale Gruppierungen innerhalb der Spezies *E. coli* wurde eine beschleunigte Evolution durch erhöhte homologe Rekombinationsraten beschrieben. Ebenfalls für hoch-pathogene klonale Gruppierungen innerhalb einer Spezies, beispielsweise die *Y. pseudotuberculosis*-Subspezies *Y. pestis*, wurden erhöhte IS-Element-Kopienzahlen festgestellt. IS-Elemente sind häufig an homologen Rekombinationsreaktionen beteiligt. Die IS-Elementzahl im *Y. pestis*-Genom ist besonders groß und eine der offensichtlichsten Differenzen zum *Y. pseudotuberculosis*-Genom; das zweithäufigste der IS-Elemente des *Y. pestis*-Genomes ist das IS100, das im *Y. pseudotuberculosis*-Genom lediglich in wenigen Kopien vorkommt (Parkhill *et al.*, 2001). Die große Kopienzahl des IS100 im *Y. pestis*-Genom wurde mit der Evolution dieser hoch-virulenten Subspezies in Verbindung gebracht (Hinchliffe *et al.*, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchen Größenordnungen das IS100 im Bakterienchromosom der zahlreichen im wesentlichen pathogenen *E. coli*-Stämme vorkommt.

IS-Elemente sind die einfachste Form eines Transposons, die für etwa 60 % der Mutationen prokaryoter Genome verantwortlich sind. Aus diesem Grunde scheint die evolutionäre Bedeutung von IS-Elementen in ihrem mutagenen Potential zu liegen, wie dies unter anderem für das IS100 des *Y. pestis*-Genomes vermutet wird. IS-Elemente liegen häufig in multiplen Kopien in einem Genom vor. Aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen intra- und intergenomischen Rekombinationsreaktionen, darunter Deletionen, Inversionen und Replicon-Fusionen (Mahillon *et al.*, 1999), sind IS-Elemente potentiell sehr variabel bezüglich ihrer Kopienzahlen und Lokalisationen in einem Genom, ihre intragenomische Transposition unterliegt jedoch der Kontrolle zahlreicher element- und wirtsspezifischer Faktoren. Streßbedingungen können im Bakteriengenom zu einer erhöhten Transpositionsrate, Verfielfältigung von IS-Elementen und genetischen Neuordnungen unter Beteiligung von IS-Elementen führen. Die Entstehung virulenter klonaler Bakteriengruppierungen durch erhöhte Rekombinationsraten umfaßt die ganze Bandbreite intra- und intergenomischer genetischer Rekombinationen, sei es durch die Exzision oder Integration von Bakteriophagen, Plasmiden, konjugativen Transposons oder ganzer Genomischer



Inseln, oder beispielsweise durch eine erhöhte Transpositionsrate von IS-Elementen und sukzessive, auf homologen Rekombinationen zwischen IS-Elementen beruhende genetische Umlagerungen. Im Laufe der Zeit dürften viele dieser Kopien wieder verlorengehen oder nur als Fragmente bestehen bleiben. Als häufige integrale Bestandteile größerer Elemente, besonders natürlich vorkommender Plasmide, können IS-Elemente auch über Gattungsgrenzen hinweg verbreitet werden und sich in einem neuen Wirtsgenom etablieren. IS-Elemente sind nicht selten über eine Vielzahl eu- als auch archaebakterieller Genera verbreitet (Mahillon *et al.*, 1999), so daß das Vorkommen des *IS100* sowohl im Genom der Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, als auch der Spezies *E. coli* nicht überrascht. Da in dieser Arbeit für keinen der 37 untersuchten *E. coli*-Stämme ein Nachweis des *IS100* erfolgte, ohne daß nicht auch die Gene *irp2* und *fyuA* nachweisbar gewesen wären, ist es denkbar, daß die Integration des *IS100* in ein *E. coli*-Vorläufergenom sich parallel zur Integration der HPI vollzog. Die Zahl *irp2* / *fyuA*-negativer Stämme war allerdings in dem hier untersuchten Kollektiv mit sechs HPI-negativen *E. coli*-Stämmen und zwei HPI-negativen *S. enterica*-Stämmen relativ gering.

Der Nachweis des *IS100* mittels PCR umfaßte ein 986 bp-Fragment dieses IS-Elementes und ergab, daß die Mehrzahl der untersuchten Non-O157-EHEC-Stämme und der K12-Stamm MG1655 *IS100*-negativ, alle EAEC- und UPEC-Stämme, sowie zwei der drei Fäkalstämme *IS100*-positiv sind. Insgesamt 54 % aller untersuchten *E. coli*-Stämme, sowie 66 % der HPI-positiven Stämme dieser Studie waren *IS100*-positiv. Alle 14 *S. enterica*-Stämme waren *IS100*-PCR-negativ. Das Vorliegen veränderter oder verkürzter Fragmente des *IS100*, die mit der durchgeführten PCR nicht nachweisbar gewesen wären, ist möglich. Da bis auf einen alle in der 'Southern Blot'-Hybridisierung *IS100*-positiven *E. coli*-Stämme auch PCR-positiv waren, liegt im Genom *IS100*-positiver *E. coli*-Stämme der mittels PCR nachgewiesene zentrale Bereich des *IS100* in mindestens einer Kopie im *E. coli*-Chromosom vor.

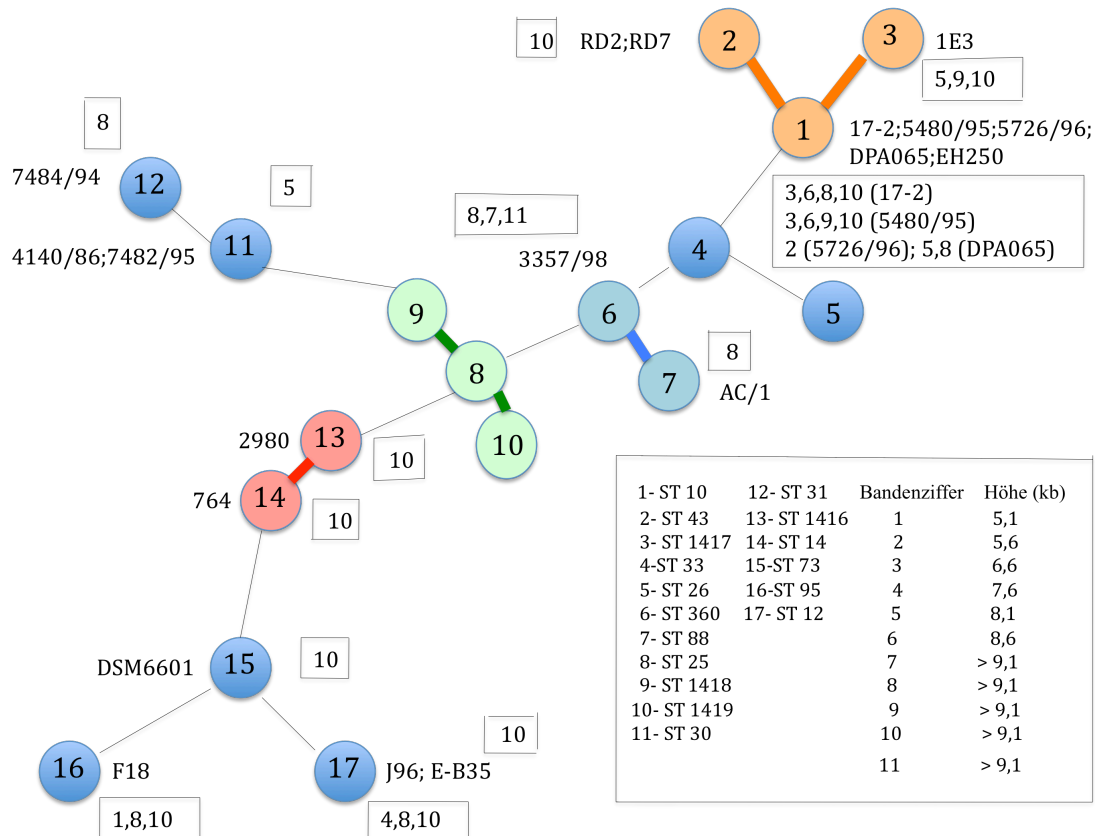
Da IS-Elemente lediglich ihrer eigenen Transposition dienende Funktionen kodieren, sind sie selektionsneutral. Für evolutionsbiologisch sehr junge, hoch-klonale Spezies wie *Y. pestis*, *M. tuberculosis* oder *B. anthracis* können IS-Elemente daher zur Typisierung von Isolaten innerhalb der Spezies herangezogen werden. Ein Grund ist die

in evolutionsbiologischen Maßstäben Kürze der vergangenen Zeitspanne seit der Entstehung dieser klonalen Gruppierungen, die sich in den Identitätsgraden von 'housekeeping'-Genen verschiedener Isolate widerspiegelt, sowie die Tatsache, daß bestimmte IS-Elemente im Genom der genannten Spezies in besonders großen Kopienzahlen vorliegen. Im *Y. pestis* Biovar Orientalis CO92-Genom wurde zudem eine größere Zahl partieller oder vollständiger Kopien der IS-Elemente *IS1541*, *IS100* und *IS285* nachgewiesen als im putativ älteren *Y. pestis* Biovar Medievalis-Stamm KIM, welches als ein Beispiel für die fortbestehende Mobilität von IS-Elementen angesehen werden kann (Anisimov *et al.*, 2004), die auch mit einer extremen Instabilität von Makrorestriktionsmustern bestimmter Stämme selbst nach Subkultivierung der gleichen Stämme in Verbindung gebracht wurde (Guiyoule *et al.*, 1994). In vielen Fällen liegt ein bestimmtes IS-Element in ein bis sechs Kopien in einem Genom vor. 'Southern Blot'-Hybridisierungen *Hind*III-geschnittener chromosomaler DNA der einzelnen *E. coli*-Stämme mit der *IS100*-spezifischen Sonde ergaben für die untersuchten *IS100*-positiven Stämme dieser Arbeit ein bis maximal drei bzw. vier Signale. Somit kommt das *IS100* im Genom in dieser Arbeit untersuchter *E. coli*-Stämme nicht in exzessiv erhöhten Kopienzahlen vor. Die Konservierung oder Integration von *IS100*-Kopien an einer identischen Position im Chromosom verschiedener *E. coli*-Linien kann sich in identischen Hybridisierungsbanden widerspiegeln (vgl. 3.3.4.). Abb. 4 vergleicht die in dieser Arbeit mittels MLST analysierten *E. coli*-Stämme bezüglich des Vorkommens und der Lokalisation des *IS100* im Bakterienchromosom.

Die Zusammensetzung und Verbreitung von Pathogenitätsinseln über Gattungsgrenzen hinweg zeigt, wie mosaikartig aus Sequenzen verschiedenen Ursprunges zusammengesetzte Genomische Inseln die Evolution neuer und hoch-pathogener Bakterienvarianten vorantreiben können und die große Bedeutung von IS-Elementen für 'rearrangements', die zur Entstehung und Verbreitung Genomischer Inseln bzw. Pathogenitätsinseln beitragen.

### **Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß ein 986 bp-Fragment des *IS100* ein häufiger Bestandteil des *E. coli*-Chromosomes ist. Nähere Untersuchungen der Insertions-Loci des *IS100* im *E. coli*-Chromosom und angrenzender DNA-Bereiche könnten Aufschluß darüber geben, in welchen Sequenzzusammenhängen das *IS100* im *E. coli*-Genom vorliegt und über welchen Mechanismus das *IS100* in ein *E. coli*-Vorläufergenom integriert wurde.



**Abb. 4: Vorkommen des IS100 und IS100-Hybridisierungsmuster für in dieser Studie mittels MLST analysierte *E. coli*-Stämme.** Sequenztypen (ST) desselben klonalen Komplexes sind mit farbigen Verbindungslinien hervorgehoben. Den ST sind die mittels MLST analysierten Stämme dieser Arbeit und den Stämmen in Kästchen Bandennummern zugeordnet. Ansteigende Zahlen der Bandennummern entsprechen IS100-Lokalisationen auf DNA-Fragmenten ansteigender Größe (kb). Identische Bandennummern bedeuten identische Hybridisierungssignale.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden 30 *E. coli*-Stämme eines heterogenen Stammkollektives mittels 'Multilocus Sequence Typing' (MLST) typisiert. Die 30 typisierten *E. coli*-Stämme gehörten 17 verschiedenen Sequenztypen (ST) an.

Es wurden vier neue ST der vier Stämme 2980, 1E3, 11205019 und 1505M052 identifiziert, die sich keinem der bisher beschriebenen ST zuordnen ließen.

Insgesamt 37 *E. coli*-Stämme, darunter die 30 typisierten Stämme, sowie 14 *S. enterica*-Stämme wurden mittels PCR bezüglich des Vorkommens der 'High Pathogenicity Island' (HPI)-Markergene *irp2* und *fyuA* untersucht. Das *irp / fyuA*-Gencluster war im Genom von 84 % der *E. coli*- und 86 % der *S. enterica*-Stämme dieser Studie vorhanden.

Unter den 37 bezüglich des HPI-Vorkommens gescreenten *E. coli*-Stämmen wurde die Verbreitung des IS-Elementes *IS100* untersucht. Ein 986 bp großes zentrales Fragment dieses IS-Elementes war mittels PCR in 54 % der *E. coli*-Stämme nachweisbar. Das entspricht 65 % der HPI-positiven *E. coli*-Stämme dieser Studie. Alle 14 *S. enterica*-Stämme waren *IS100*-PCR-negativ. 'Southern Blot'-Hybridisierungen chromosomaler DNA mit einer *IS100*-spezifischen Sonde ergaben für alle 32 untersuchten *E. coli*-Stämme null bis drei Signalbanden und ließen große Ähnlichkeiten in den Hybridisierungsprofilen erkennen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals die weite Verbreitung des *IS100* innerhalb der Spezies *E. coli* und große Ähnlichkeiten bezüglich der chromosomalen Lokalisationen einzelner Kopien in einem heterogenen Kollektiv von *E. coli*-Stämmen.

## 6. Literatur

- Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E.** (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 14043-14048.
- Achtman, M.** (2001) A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. *Genetics. Academic Press.* doi:10.1006/bkmm.2001.0023.
- Aguiar-Alves F, Medeiros F, Fernandes O, Gudziki Pereira RM, Perdreau-Remington F, Riley LW.** (2006) New Staphylococcus aureus genotyping method based on exotoxin (set) genes. *J. Clin. Microbiol.* **44(8)**:2728-2732.
- Anisimov, A. P., Lindler, L. E., and Pier, G. B.** (2004) Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 17, Nr. 2, 434-464.
- Arber, W.** (1993) Evolution of procaryotic genomes. *Gene.* **135**, 49-56.
- Bach, S., Buchrieser, C., Prentice, M., Guiyoule, A., Msadek, T. and Carniel, E.** (1999) The high- pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 undergoes low-frequency deletion but not precise excision, suggesting recent stabilization in the genome. *Infect. Immun.* **67**, 5091-5099.
- Bach, S., de Almeida, A., and Carniel, E.** (2000) The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 289-294.
- Bearden SW, Fetherston JD, Perry RD.** (1997) Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* **65(5)**:1659-1668.
- Bifani, P.B., Plikaytis, B.B., Kapur, V. et al.** (1997) Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* **275**:452-57.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H. and Hacker, J.** (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**, 606-614.
- Boyd, E.F. and Hartl, D.L.** (1997) Recent Horizontal Transmission of Plasmids between Natural Populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **179(5)**:1622–1627.
- Braun, V., and Braun, M.** (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **529(1)**:78-85.

**Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD.** (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68(3)**:560-602.

**Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A. and Carniel, E.** (1998) The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn tRNA* genes. *Mol. Microbiol.* **30**, 965-978.

**Campbell, A. M.** (1992) Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J. Bacteriol.* **174**, 7495-7499.

**Carniel, E., Guiyoule, A., Guilvout, I., Mercereau-Puijalon, O.** (1992) Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* **6(3)**:379-88.

**Carniel, E.** (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes and Infection* **3**: 561–569.

**Clermont, O., Cordevant C, Bonacorsi S, Marecat A, Lange M, Bingen E.** (2001) Automated ribotyping provides rapid phylogenetic subgroup affiliation of clinical extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39(12)**:4549-53.

**Hacker J, Carniel E.** (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* **2(5)**:376-381.

**Chauvaux, S., Rosso, M.L., Frangeul, L., Lacroix, C., Labarre, L., et al.** (2007) Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiol.* **153**: 3112-3124.

**Cheetham BF, Katz ME.** (1995) A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* **18(2)**:201-208.

**Collyn, F., Billault, A., Mullet, C., Simonet, M., Marceau, M.** (2004) YAPI, new *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenicity island. *Infect. Immun.* **72(8)**:4784-90.

**Cooper VS, Lenski RE.** (2000) The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* **407(6805)**:736-739.

**Datz M, Janetzki-Mittmann C, Franke S, Gunzer F, Schmidt H, Karch H.** (1996) Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. *Appl Environ Microbiol.* **62(3)**:791-7.

**De Almeida, A. M., Guiyoule, A., Guilvout, I., Itean, I., Baranton, G. and Carniel, E.** (1993) Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb. Pathog.* **14**, 9-21.

- Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenailon O, Acquaviva C, Sayada C, Sunjevaric I, Rothstein R, Elion J, Taddei F, Radman M, Matic I.** (2000) Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell*.**103(5)**:711-21.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Fünfstück, R. and Hacker, J.** (2001) S-fimbria-encoding determinant *sfal* is located on pathogenicity island III536 of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **69**, 4248-4256.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. and Hacker, J.** (2002) Genetic Structure and Distribution of Four Pathogenicity Islands (PAI I536 to PAI IV536) of Uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **70**, 6365-6372.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H. and Hacker, J.** (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* **185**, 1831-1840.
- Dobrindt 2004
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J.** (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 414-424.
- Escherich, T.** (1885) Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr. Med.* **3**:515–22 und 547–54.
- Escobar-Paramo, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andremont A, Denamur E, Ruimy R.** (2004) Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70(9)**:5698-700.
- Euzeby** (2009) List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN)
- Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S** (2001) Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98(26)**:15056-61.
- Feil EJ, Spratt BG** (2001) Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:561-90.
- Feldmann, F., Sorsa, L.J., Hildinger, K., and Schubert, S.** (2007) The Salmochelin Siderophore Receptor IroN Contributes to Invasion of Urothelial Cells by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* In Vitro. *Infect. Immun.* **75(6)**:3183-87.



**Fetherston, J. D., Schuetze, P. and Perry, R. D.** (1992) Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* **6**, 2693-2704.

**Fetherston, J. D. and Perry, R. D.** (1994) The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. *Mol. Microbiol.* **13**, 697-708.

**Filée J, Siguier P, Chandler M.** (2007) Insertion sequence diversity in archaea. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.***71(1)**:121-57.

**Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF.** (2005) Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov.***2**:10.

**Goulet, P., and Picard, B.** (1989) Comparative electrophoretic polymorphism of esterases and other enzymes in *Escherichia coli*. *J.Gen.Microbiol.***135(1)**:135-43.

**Gophna U, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ.** (2001) *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol.Lett.***196(1)**:57-60.

**Groisman, E. A. and Ochman, H.** (1996) Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**, 791-794.

**Guiyoule, A., Grimont, F., Itean, I., Grimont, P.A., Lefevre, M., and E. Carniel** (1994) Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **32**:634-641.

**Hacker, J., Knapp, S. and Goebel, W.** (1983) Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited haemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *J. Bacteriol.* **154**, 1145-1154.

**Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and Goebel, W.** (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb.Pathog.* **8(3)**:213-25.

**Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. and Tschäpe, H.** (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**, 1089-1097.

Hacker 1990

**Hacker, J. and Kaper, J. B.** (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 641-679.

**Hacker, J. and Carniel, E.** (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* **2**, 376-381.

**Hacker, J., Blum-Oehler, G., Hochhut, B. and Dobrindt, U.** (2003) The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements. A review. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **50**, 321-330.

**Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS.** (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.***172(11)**:6175-81.

**Hinchliffe, S.J., Isherwood, K.E., Stabler, R.A., Prentice, M.B., Rakin, A., Nichols, R.A., Oyston, P.C.F., Hinds, J., Titball, R.W., and Wren, B.W.** (2003) Application of DANN Microarrays to Study the Evolutionary Genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Gen. Res.* **13**:2018-2029.

**Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Bruszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J.** (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol.Microbiol.***61(3)**:584-95.

**Hsieh, P.F., Lin, T.L., Lee, C.Z., Tsai, S.F., and Wang, J.T.** (2008) Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *KEscherichialebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J. Infect. Dis.***197**: 1717-1727.

**Huys, G., Cnockaert, M., Janda, J.M., Swings, J.** (2003) *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int. J.Syst.Evol.Microbiol.***53(3)**:807-10.

**Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L.** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123-140.

**Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Ölschläger, T. and Hacker, J.** (1999). A genomic island, termed High-Pathogenicity Island, is present in certain non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* **67**, 5994-6001.

**Knapp, S., Hacker, J., Then, I., Muller, D. and Goebel, W.** (1984) Multiple copies of hemolysin genes and associated sequences in the chromosomes of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **159**, 1027-1033.

**Klee, S.R., Nassif, X., Kusecek, B. et al.** (2000) Molecular and biological analysis of eight genetic islands that distinguish *Neisseria meningitidis* from the closely related pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **68**:2082-095.

**Koczura, R., Kaznowski, A.** (2003) Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **35**: 197-202.

**Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C,**

**Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD.** (1999) Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility.

*J.Clin.Microbiol.***37(8):**2607-18

**Kunkle, C.A., and Schmitt, M.P.** (2003) Analysis of the *Corynebacterium diphtheriae* DtxR regulon: identification of a putative siderophore synthesis and transport system that is similar to the *Yersinia* high-pathogenicity island-encoded yersiniabactin synthesis and uptake system. *J.Bacteriol.***185(23):**6826-40.

**Lawlor, M.S., O'Connor, C., and Miller, V.L.** (2007) Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect. Immun.* **75:**1463-1472.

**Leclercq AJ, Torrea G, Chenal-Francisque V, and Carniel E.** (2007) 3 IS-RFLP: a powerful tool for geographical clustering of global isolates of *Yersinia pestis*. *Adv.Exp.Med.Biol.***603:**322-6.

**Lesic, B., Bach, S., Ghigo, J. M., Dobrindt, U., Hacker, J. and Carniel, E.** (2004) Excision of the high- pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of its cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. *Mol. Microbiol.* **52:** 1337-1348.

**Lesic, B. and Carniel, E.** (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* **187:** 3352-3358.

**Lillard JW Jr, Fetherston JD, Pedersen L, Pendrak ML, Perry RD.** (1997) Sequence and genetic analysis of the hemin storage (hms) system of *Yersinia pestis*. *Gene.***193(1):**13-21.

**Lin, T.L., Lee, C.Z., Hsieh, P.F., Tsai, S.F., and Wang, J.T.** (2008) Characterization of integrative and conjugative element ICE*KpI*-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol.* **190:**515-526.

**Mahillon J, Chandler M.** (1998) Insertion Sequences. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.***62(3):**725-74.

**Mahillon J, Léonard C, Chandler M.** (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res.Microbiol.***150(9-10):**675-87.

**Maiden, M.C.** (1993) Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol.Lett.* **112(3):**243-50.

**Maiden, M.C.** (1998) Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis. Suppl* **1**:S12-20.

**Maiden, M.C.** (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.***60**:561-88.

**Maynard Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M., Spratt, B.G.** (1993) How clonal are bacteria? *Proc.Natl.Sci.USA* **90**:4384-88.

**McDonough, K.A. and Hare, J.M.** (1997) Homology with a repeated *Yersinia pestis* DNA sequence IS100 correlates with pesticin sensitivity in *Yersinia pseudotuberculosis*. *J.Bacteriol.* **179(6)**:2081-85.

**Middendorf B, Hochhut B, Leipold K, Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hacker J.** (2004)  
*J. Bacteriol.***186(10)**:3086-96.

**Milkman, R., and Bridges, M.M.** (1990) Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome.III.Clonal frames.*Genetics.***126(3)**:505-17.

*E. coli*-MLST homepage <http://mlst.ucc.ic/mlst/dbs/Ecoli>

**Mokracka, J., Koczura, R., Kaznowski, A.** (2004) Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**: 51-55.

**Nelson, K., Wang, F.S., Boyd, E.F., Selander, R.K.** (1997) Size and sequence polymorphism in the isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase gene (*aceK*) and flanking regions in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Genetics* **147**:1509-20.

**Ochman, H., Lawrence, J. G. and Groisman, E. A. (2000).** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299-304.

**Ochman, H.** (2001) Lateral and oblique gene transfer. *Curr.Opin.Genet.Dev.***11(6)**:616-9.

**Ochman, H., and Selander, R.K.** (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J.Bacteriol.***157(2)**:690-3.

**Ölschläger, T. A., Zhang, D., Schubert, S., Carniel, E., Rabsch, W., Karch, H. and Hacker, J.** (2003) The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *J Bacteriol* **185**, 1107-1111.

**Olsson C, Olofsson T, Ahrné S, Molin G.** (2003) The *Yersinia* HPI is present in *Serratia liquefaciens* isolated from meat. *Lett.Appl.Microbiol.***37(4)**:275-80.

**Paauw, A., Caspers, M.P.M., Leverstein-van Hall, M.A., Schuren, F.H.J., Montijn, R.C., et al.** (2009a) Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiol.* **155**:1558-1568.

**Paauw, A., Leverstein-van Hall, M. A., van Kessel, K.P.M., Verhoef, J., and Fluit, A. C.** (2009b) Yersiniabactin Reduces the Respiratory Oxidative Stress Response of Innate Immune Cells. *PLoS ONE* **4**(12): e8240.doi:10.1371/journal.pone.0008240

**Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeño-Tárraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG.** (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**(6858): 523-527.

**Pelludat, C., A. Rakin, C. A. Jacobi, S. Schubert, and J. Heesemann** (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **180**:538–546.

**Podladchikova, O.N., Dikhanov, G.G., Rakin, A.V., and Heesemann, J.** (1994) Nucleotide sequence and structural organization of *Yersinia pestis* insertion sequence IS100. *FEMS Microbiol.Lett.* **121**(3):269-74.

**Portnoy DA, Falkow S.** (1981) Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.* **148**(3):877-83.

**Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., Öhlschläger, T., Oswald, E., Forestier, C., Hacker, J., and Dobrindt, U.** (2009) Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.*, **77**(11):4696-4703.

**Rakin, A., Urbitsch, P. and Heesemann, J.** (1995) Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *Journal of Bacteriology* **177**, 2292–2298. Rakin 1999

**Rakin, A., Noelting, C, Schubert, S., and Heesemann, J.** (1999) Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Y. enterocolitica*. *Infect. Immun.* **67**: 5265-5274.

**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.

**Reiter WD, Palm P, Yeats S.** (1989) Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 1907-14.

**Roesch PL, Redford P, Batchelet S, Moritz RL, Pellett S, Haugen BJ, Blattner FR, Welch RA.** (2003) Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* **49(1):**55-67.

**Schmidt, H. and Hensel, M.** (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 14-56.

**Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. and Heesemann, J.** (1998) Prevalence of the "High- Pathogenicity Island" of *Yersinia* Species among *Escherichia coli* Strains That Are Pathogenic to Humans. *Infect. Immun.* **66**, 480-485.

**Schubert, S., Rakin, A., Fischer, D., Sorsa, J. and Heesemann, J.** (1999) Characterization of the integration site of *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 409- 414.

**Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D. and Heesemann, J.** (2000) High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J. Infect. Dis.* **182**, 1268-1271.

**Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J. and Denamur, E.** (2002) *Yersinia* High-Pathogenicity Island Contributes to Virulence in *Escherichia coli* Causing Extraintestinal Infections. *Infect. Immun.* **70**, 5335-5337.

**Schubert, S., Dufke, S., Sorsa, J. and Heesemann, J.** (2004) A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* **51**, 837-848.

**Schubert, S., Darlu, P., Clermont, O., Wieser, A., Magistro, G., Hoffmann, C., Weinert, K., Tenailon, O., Matic, I., Denamur, E.** (2009) Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species. *PLoS Pathog.* **5(1):**e1000257.

**Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS.** (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51(5):**873-84.

**Selander RK, Musser JM, Caugant DA, Gilmour MN, Whittam TS.** (1987) Population genetics of pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.* **3(1):**1-7.

**Tartof, S.Y., Solberg, O.D., Manges, A.R., Riley, L.W.** (2005) Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **43(12):**5860-4.

**Urwin, R., and Maiden, M.C.** (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11(10):**479-87.

**van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al** (1993) Strain identification

of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 406-9.

**Ward, P.P., Paz, E., and Conneely, O.M.** (2005) Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol. Life Sci.* **62(22)**: 2540-2548.

**Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Donnenberg, M. S. and Blattner, F. R.** (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17020-17024.

**Wilde C, Mazel D, Hochhut B, Middendorf B, Le Roux F, Carniel E, Dobrindt U, Hacker J.** (2008) Delineation of the recombination sites necessary for integration of pathogenicity islands II and III into the *Escherichia coli* 536 chromosome. *Mol. Microbiol.* **68(1)**:139-51.

**Williams, K. P.** (2002) Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. *Nucleic Acids Res.* **30**, 866-875.

**Wirth, T., Falush, D., Lan, Ruiting, Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., and Achtman, M.** (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60 (5)**: 1136-1151.

## 7. Anhang

### 7.1. Nukleotidsequenzen des IS100 (A), IS100kyp (B), IS100L (C), IS100X (D)

A tgtaacgaacgggtgcaatagtgatccacaccaacgcctgaaatcagatccagggggtaa  
tctgctctcctgattcaggagagttatggctacttttgagacagttatggaaftaaa  
tctgcacaagcaggaatgagtagccgggcgattgccagagaactggggatctcccga  
ataccgftaaacgttatttcaggcaaaatctgagccgcaaaatatacggcgcgacctg  
ctgttctcactcctggatgaataccgggattatattcgtcaacgcacgcgcatgctc  
atccttacaanaatcccggcaacggtaategctcgcgagatcagagaccagggatcgtg  
gcggaatgaccattctcagggcattcattcgttctctcggttcctcaggagcaggagc  
ctgccgttcggttcgaactgaacccggacgacagatgcaggttgactggggcactatgc  
gtaatggctcctaccgcttcacgtgttcgttctcgttctcggatacagccgaatgctgt  
acatcgaattcactgacaatatgctgttatgacacgctggagacctgccatcgaatgctgt  
tccgttctttgggtggtgcccgcgcgaagtgtgtatgacaatatgaaaactgtggttc  
tgcaacgtgacgcataatcagaccggcagcaccggttccatcctcgtctgtggcagttcg  
gcaaggagatgggcttctctcccactgtgtcggccctcagggcacagactaaaggta  
aggtggaacggatggtgcagtacacccgtaacagttttacatcccactaatgactcgc  
tgcgcccgatggggatcactgtcgtatgttgaacagccaaccgccacggctcgcgtggc  
tgcacgatgtcctaaccaacgaaagcatgaaacaatccaggcccgtccctgcgatcgt  
ggctcgaagagcagcagtcctatgctggcactgcctccggagaaaaaagagtatgacgtgc  
atcttgatgaaaatctggtgaacttcgacaaacaccccctgcacatccactctccatct  
acgactcattctgcagaggagtggcgtgatgatggaactgcaacatcaacgactgatggc  
gctcgcgggagttgcaactggaaagccttataagcgcagcgcctcgcgtgtcacaaca  
ggcagtagaccaggaatggagttatatggacttctggagcatctgcttcatgaagaaaa  
actggcagctcaacgtaaacaggcgtatgtataccgaaatggcagcctcccggcggt  
gaaaacgttcgaagagtatgacttcacattcggcaccggagcaccgcagaagcaactcca  
gtcgttacgctcactcagctcatagaacgtaatgaaaatctgattactggggccatc  
aggtgtggggaaaacccatctggcaatagcgtatgggctatgaagcagtcctgacaggtat  
caaagttcgttcacaacagcagcagatctattactcagttatctacggcacaacgtca  
gggccgttataaaaacgacgctcagcgtggagtaatggcccccgctgctcatcattga  
tgaataggctatctgccgtcagtcaggaagaagcaagctgttctccaggtcatcgc  
taaagttacgaaaagagcgcgaatgatcctgacatccaatctgccgttcgggagtgga  
tcaaacgttcgccggtgatgcagcactgacctcagcagatgctggaccgtacttacaccac  
tccatgtcgttcaaatcaaggagaaagctatcgactcagacagaaacgaaaggccggg  
ggtatagcagaagctaactcctgagtaaacgggtgatcaatattgggcccgttggaggaga  
tataagtgatcacttttcatccgtcgtgaca

B tgtaacgaacgggtgcaatagtgatccacaccaacgcctgaaatcagatccagggggtaa  
tctgctctcctgattcaggagagttatggctacttttgagacagttatggaaftaaa  
tctgcacaagcaggaatgagtagccgggcgattgccagagaactggggatctcccga  
ataccgftaaacgttatttcaggcaaaatctgagccgcaaaatatacggcgcgacctg  
ctgttctcactcctggatgaataccgggattatattcgtcaacgcacgcgcatgctc  
atccttacaanaatcccggcaacggtaategctcgcgagatcagagaccagggatcgtg  
gcggaatgaccattctcagggcattcattcgttctctcggttcctcaggagcaggagc  
ctgccgttcggttcgaactgaacccggacgacagatgcaggttgactggggcactatgc  
gtaatggctcctaccgcttcacgtgttcgttctcgttctcggatacagccgaatgctgt



acatcgaattcactgacaatatgcggtatgacacgctggagacctgccatcgtaatgcgt  
tccgcttcttgggtggtgccgcggaagtgttatgacaatatgaaaactgtggtc  
tgcaacgtgacgcatacagaccggcagcaccggttccatccttcgctgtggcagttcg  
gcaaggagatgggcttctccccgactgtgtcggccctcagggcacagactaaaggta  
aggtggaacggatggtgcagtacaccgtaacagttttacatcccactaatgactcgcc  
tgcgccgatggggatcactgtcgtatgtgaaacagccaaccgccacggctgtcgctggc  
tgcacgatgtcgctaaccaacgaaagcatgaaacaatccaggccccctcctcgatcgct  
ggctcgaagagcagcagtcctatgctggcactgcctccggagaaaaaagagtatgacgtgc  
atcttgatgaaaatctgggtgaacttcgacaaacacccccctgcatcatccactctccatct  
acgactcattctgcagaggagtgccgtgatgatggaactgcaacatcaacgactgatggc  
gctcgccggcagttgcaactggaaagccttataagcgcagcgcctgcgctgtcacaaca  
ggcagtagaccaggaatggagttatatggacttctggagcatctgcttcatgaagaaaa  
actggcagctcatcaacgtaaacaggcgatgtatacccgaatggcagccttccggcggt  
gaaaacgttcgaagagtatgacttcacattcgccaccggagcaccgcagaagcaactcca  
gtcgttacgctcactcagcttcatagaacgtaatgaaaatcgtattactggggccatc  
aggtgtgggggaaaacccatctggcaatagcgtatgggctatgaagcagtcctgtcaggtat  
caaagttcgcttcaaacagcagcagatctgttacttcagttatctacggcacaacgtca  
gggcccgtataaaaacgacgctcagcgtggagtaatggccccccgctgctcatcattga  
tgaataggctatctgccgtcagtcaggaagaagcaaagctgttcttccaggtcatcgc  
taaacgttacgaaaagagcgcgaatgactcctgacatccaatctgccgttcgggcagtgagg  
tcaaacgttcgccgggtgatgcagcactgacctcagcgtgctggaccgtatcttacacca  
ctcacatgtcgttcaaatcaaaggagaaagctatcactcagacagaaacgaaaggccgg  
ggttatagcagaagctaactcctgagtaaacgggtgatcaatattgggcccgttggtggag  
ataaagtggatcacttttcatccgctgtgaca

C tgaacgaacgggtgcaatagtatccacaccaacgcctgaaatcagatccagggggtaa  
tctgctctcctgattcaggagagtttatggcacttttgagacagttatggaaattaaaa  
tcttcacaagcagggaaatgagtagccggcgattgccagagaactggggatctcccga  
ataccgttaaacgttatttgaggcaaatctgagccgcaaaaatacggcgcgacctg  
ctgttcttactcctggatgaataccgggattatattcgtcaaccatcgccgatgtca  
tcttacaaaatcccggcaacggtaatcgtcgcgagatcagagaccagggatcctggtg  
cggaatgaccattctcagggcattcattcgttctctcgttctcagggagcaggagcc  
tgccgttcgggtcgaactgaaccggacgacagatgcaggttactggggcactatgcg  
taatggctcgtcaccgcttcacgtgttcgttctgttctcggatacagccgaatgctgta  
catcgaattcactgacaatatgcggtatgacacgctggagacctgccatcgtaatgcgtt  
ccgcttcttgggtggtgccgcggaagtgtgtatgacaatatgaaaactgtggttct  
gcaacgtgacgcatacagaccggcagcaccggttccatccttcgctgtggcagttcgg  
caaggagatgggcttctccccgactgtgtcggccctcagggcacagactaaaggtaag  
gtggaacggatggtgcagtacaccgtaacagttttacatcccactaatgactgcctgc  
gcccgatggggatcactgtcgtatgtgaaacagccaaccgccacggctgtcgctggctgc  
acgatgtcgctaaccaacgaaagcatgaaacaatccaggccccctcctcgatcgccggc  
tcgaagagcagcagtcctatgctggcactgcctccggagaaaaaagagtatgacgtgcatc  
ttgatgaaaatctgggtgaacttcgacaaacacccccctgcatcatccactctccatctacg  
actcattctgcagaggagtgccgtgatgatggaactgcaacatcaacgactgatggcgt  
cgccgggagttgcaactggaaagccttataagcgcagccgctgccgtgtcacaacaggc  
agtagaccaggaatggagttatatggacttctggagcatctgcttcatgaagaaaaact  
ggcagctcatcaacgtaaacaggcgatgtatacccgaatggcagccttccggcggtgaa  
aacgttcgaagagtatgacttcacattcgccaccggagcaccgcagaagcaactccagtc

gtfacgctcactcagcttcatagaacgtaatgaaaatcgttactggggccatcagg  
tgtggggaaaacccatctggcaatagcgcgatgggctatgaagcagtcctgcaggtatcaa  
agttcgctcacaacagcagcagatctgttacttcagttatctacggcacaacgtcaggg  
ccgttataaaacgacgcttcagcgtggagtaatggcccccgctgctcatcattgatga  
aataggctatctgccgtcagtcaggaagaagcaaagctgttcttcaggctacgctaa  
acgttacgaaaagagcgaatgatcctgacatccaatctgccgttcgggcgtgggatcaa  
acgttcgccggtgatgcagcactgacctcagcgcgatctggaccgtatcttacaccactca  
catgctgtcaaatcaaaggagaaagctatcgactcagacagaaacgaaagccgggggtt  
atagcagaagctaactctgagtaaacgggtgatcaatattgggccgttggtggagatat  
aagtgatcacttttcatccgctgtgaca

D tgtcaacgacggatgaaaagtgatccacttatactccaccaacggcccaatattgatcc  
accgttttactcaggattagcttctgtataaccccggccttctgttctgtctgagtcg  
atagctttctcctttgattgaaacgacatgtgagtggtgtaagatacggctccagcatcgc  
tgaggtcagtgctgcatcaccggcgaacgttgatcccactgccgaacggcagattgga  
tgtcaggatcattgcgctctttcgtaacgtttagcgcgatgacctggaagaacagctttgc  
ttctcctgactgaacggcagatagcctatttcatcaatgatgagcagggcggggggccat  
tactccacgctgaagctcgtttataacggccctgacgttgtccgtagataactgaagt  
aacagatctgctgctgttgaagcgaactttgatacctgcacggactgctcatagccc  
atcgctattgccagatcggttttcccacacctgatggcccagtaatacgaatatttca  
ttacgttctatgaagctgagtgagcgaacgactggagttgcttctgcggtgctccggcg  
gcaatgtgaagtcatacgttcgaacgtttaccgcccgggaagcgcattcgggtata  
catcgctgtttacgttgatgacggccagttttctcatgaagcagaggccaggaagtc  
catataactccattctcgttactgctgttgtagccgagccgcgcttataaggcttt  
ccagttgcaactgcccgagcgcctatcagtcgttgatgtgcagttgcatcatcacgcc  
actcctcgtgcttagatggagagtggatgatgcaggggggtttgtcgaagttaccaga  
ttttcatcaagatgcacgtcatactcttttctccggagcagtcagcatggactgctg  
ctcttcgagccagcgcagggacgggctggattgttcatgcttctgttcggttagc  
gacatcgtgcagccagcgcagaccgtggcgggtggctgttcaacatcagcagtgatccc  
catcggcgagggcagtcattagtggtgatgtaaaaactgttacgggtgactgcaccatc  
cgtccaccttaccttttagctgtgcccagaagggcacacagtcggggagagagcccatt  
ccttgttgaactaccacagcgaaggatggaaccgggtgctgaccgtctgatatgcgtcacg  
ttcagaaccacagtttcatattgtcatacaacttcgcgcggcacaccacaaagaa  
gcggaacgattacgatggcaggtctccagcgtgtcataacgcataattgtcagtgatcgc  
atgtacagcattcggctgtatccgagaacagcaacgaacacgtgaagcgggtgagcgacca  
ttacggatagtgccccagtcacctgcatttctgtccgggtcagttcgaaccgaacg  
gcaggctcctgctcctgaggaaccgagagagaacgaatgaatgcctgagaatggtcatt  
ccgccacgatatccctggtctctgaatctcgcgagcgattaccggttccgggattttgta  
aggatgagctaccgatgcgttgacgaatataatcccgggtatcattcaggagtgaagca  
acagcaggtcgcgggcgtatattggcggctcagattttcttcaataacgtttaaag  
gtattgcgggagatccccagttctctggcaatcggccggtactcattcctgcttgc  
aggatttaattccataactgtctcaaaagtaccataaactctcctgaatcaggagag  
cagattaccccctggttatgattcaggcgtgggtgtggatcactattgcaccgttcg  
taca

7.2. Sequenz des amplifizierten 986 bp-IS100-DNA-Fragmentes

**ccaacgaaagcatgaacaatccaggccccctcgatcget**  
 ggctcgaagagcagcagtcctatgctggcactgcctccggagaaaaagagtatgacgtgc  
 atcttgatgaaaatctgggtaacttcgacaaacacccccctcatcatccactctccatct  
 acgactcattctgcagaggagtggcgtgatgatggaactgcaacatcaacgactgatggc  
 gctcgcggcagttgcaactggaaagccttataagcgcagcgcctgcgctgtcacaaca  
 ggcagtagaccaggaatggagtatatggacttctggagcatctgctcatgaagaaaa  
 actggcacgtcatcaacgtaaacaggcgtatgatacccgatggcagcctcccggcggt  
 gaaaacgttcgaagagtatgacttcacattcgccaccggagcaccgcagaagcaactcca  
 gtcgttacgctcactcagctcatagaacgtaataaaaaatctgattactggggccatc  
 aggtgtggggaaaacccatctggcaatagcgtatgggctatgaagcagtcctgctcaggtat  
 caaagttcgttcacaacagcagcagatctattactcagttatctacggcacaacgtca  
 gggccgttataaaacgacgctcagcgtggagtaatggccccccgctgctcatcattga  
 tgaataggctatctgccgttcagtcaggaagaagcaaagctgttcttcaggtcatcgc  
 taaacgttacgaaaagagcgaatgatcctgacatccaatctgccgttcgggcagtgggga  
 tcaaacgttcgccggtgatgcagcactgacctcagcgtatgctggaccgtacttacaccac  
 tcatatgctgtcaaatcaaaggagaaagctatcgactcagacagaaacgaaaggccggg  
 gttatagcagaagctaatacct**gagtaaaacgggtgatcaat**

7.3. IS100-Kopien im *E. coli*-536-Genom (BLAST 2.0; blastn)

Kopie Nr.	Identitätsgrad nt	Gaps
1	1951/1958 (99 %)	3/1958
2	1951/1959 (99 %)	4/1959
3	1949/1956 (99 %)	3/1956
4	1948/1955 (99 %)	3/1955
5	1948/1955 (99 %)	3/1955
6	1948/1955 (99 %)	3/1955
7	1948/1956 (99 %)	3/1956
8	1941/1958 (99 %)	3/1958
9	1411/1418 (99 %)	1/1418
10	1184/1190 (99 %)	3/1190
11	766/768 (99 %)	0/768 (0 %)
12	688/693 (99 %)	0/693 (0 %)
13	160/161 (99 %)	0/161 (0 %)

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Drs. h. c. Jörg H. Hacker für die Themenstellung dieser Arbeit, sein großes Entgegenkommen bei der zeitlichen Gestaltung und für sein fortwährendes Interesse am Fortgang und an den Ergebnissen der Arbeit. Besonders freue ich mich darüber, daß er trotz seiner Berufung zum Präsidenten des Robert Koch-Institutes und der damit verbundenen vielfältigen Aufgaben und Termine die Zeit gefunden hat, die Betreuung dieser Arbeit bis zum Ende zu übernehmen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ulrich Dobrindt möchte ich überaus herzlich für die Ausarbeitung der detaillierten Fragestellungen dieser Arbeit danken. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite; besonders seine auf großer Erfahrung beruhenden praktischen experimentellen Hinweise, die Zeit, die er sich stets nahm und die Korrektur der schriftlichen Fassung dieser Arbeit trugen in entscheidendem Maße zu ihrem Gelingen bei.

Frau Barbara Plaschke möchte ich sehr herzlich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken und ihr alles Gute für ihre zukünftige Arbeit am Institut wünschen !

Frau Dr. rer. nat. Britta Janke stellte mir freundlicherweise für diese Arbeit zwei 'Southern Blots ' zur Verfügung. Hierfür vielen herzlichen Dank !

Die schöne Arbeitsatmosphäre und kollegiale Zusammenarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie ist ganz besonders hervorzuheben. Allen Kollegen und Mitarbeitern des Labors, die mir durch ihre langjährigen Erfahrungen auf diesem Forschungsgebiet wertvolle Tipps geben konnten, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die schwierige Phasen meines Lebens miterleben mußten und ohne deren fantastische und sehr großzügige Unterstützung in allen Phasen meines Lebens diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre. Ein herzliches Dankeschön !

## Tabellarischer Lebenslauf

Stand Mai 2010

**Name:** Astrid Christina Frank  
**Geburtsdatum:** 05. Januar 1977  
**Geburtsort:** Leiden / Niederlande  
**Staatsangehörigkeit:** deutsche  
**Muttersprache:** Deutsch  
**Fremdsprachen** Englisch, Französisch, Niederländisch

1983-1986 Besuch der Jahrgangsstufen 1-3 der Grundschule in Lisse / Niederlande;  
1986 / 1987 Besuch der vierten Grundschulklasse in Königstein / Ts.;  
1987-1996 Besuch des neusprachlichen St. Angela - Gymnasiums in Königstein/Ts.;  
1993 Halbjähriger Internatsaufenthalt in Banbury / Oxfordshire mit Besuch des regulären Unterrichtes (A-Level-Fächer Chemie, Physik, Mathematik), IGCSE-Prüfung im Fach Mathematik, Certificate of Attainment Graded Tests (Level 5)  
Nov. 1995 Studieneingangsprüfung Test für medizinische Studiengänge (TMS);  
Juni 1996 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife; Chemiepreis des Abiturjahrganges 1996;  
WS 1996/97 Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg;  
Feb. 2005 Approbation als Ärztin;  
Juni 2005 – Anstellung als Assistenzärztin an den Städtischen Kliniken Köln;  
Dez. 2006  
Jan. 2007 - Anstellung als Assistenzärztin am Universitätsklinikum Essen;  
Juni 2007  
Dez. 2007 - Visiting Fellow am National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
Nov. 2009 (NIAID) der National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA;  
  
Aktuell: Anstellung als Assistenzärztin am Universitätsklinikum Münster