

II. Einleitung

1. Enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Escherichia coli-Bakterien sind Bestandteil der normalen Darmflora von Menschen und Tieren. Mitunter treten jedoch Varianten auf, die durch den Erwerb bestimmter Pathogenitätsfaktoren die Fähigkeit entwickelt haben, in ihren Wirtsorganismen Krankheiten zu verursachen (Mühdorfer und Hacker, 1994). Man unterscheidet sechs verschiedene intestinal (enterohämorrhagische *E. coli*, EHEC; enteropathogene *E. coli*, EPEC, enterotoxische *E. coli*; ETEC, enteroinvasive *E. coli*, EIEC; enteroaggregative *E. coli*, EaggEC; diffus-adhärenente *E. coli*, DAEC) und zwei verschiedene extraintestinal pathogene *E. coli* (uropathogene *E. coli*, UPEC; Neugeborenen-Meningitis-*E. coli*, NBM), die sich durch die Ausprägung spezifischer Virulenzfaktoren und die von ihnen verursachten klinischen Manifestationen differenzieren lassen. (Ørskov und Ørskov, 1992).

Eine wichtige Gruppe unter den darmpathogenen *E. coli* stellen die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) dar, die zur Gruppe der über 100 Serogruppen umfassenden, häufig apathogenen Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC) gehören (Karmali, 1989). EHEC sind definiert als *E. coli*-Stämme, die hämorrhagische Kolitiden (hemorrhagic colitis, HC) und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen können, zusätzlich zur Produktion von Shiga-Toxinen sog. "attaching and effacing"-Läsionen (A/E-Läsionen) auf Darmepithelzellen bilden und ein 60 MDa-Plasmid besitzen (Levine, 1987, Levine und Edelman, 1984, Burland *et al.*, 1998). Die meisten pathogenen EHEC-Stämme gehören der Serogruppe O157:H7 an, aber auch Vertreter der Serogruppen O26:H11, O111:H⁻ und O157:H⁻ spielen eine wichtige Rolle in der Epidemiologie dieses Pathotyps (Griffin und Tauxe, 1991).

1.1 Krankheitsverlauf und Epidemiologie

Infektionen mit EHEC treten häufig als große Ausbrüche auf, können aber auch als sporadische Fälle in Erscheinung treten. Die infektiöse Dosis liegt sehr niedrig bei 10 - 100 CFU (Griffin *et al.*, 1994, Paton *et al.*, 1996). Zu Beginn einer Infektion kommt es nach einer Inkubationszeit von bis zu vier Tagen zum Ausbruch einer wäßrigen Diarrhö, die sich im Verlauf von ca. zwei Tagen zu einer hämorrhagischen Colitis mit blutigen Durchfällen und krampfartigen Bauchschmerzen entwickeln kann und bis zu zehn Tagen anhält (Riley, 1987,

Nataro und Kaper, 1998). Besonders bei Kindern und älteren Menschen kann es aufgrund eines geschwächten Immunsystems zur Entwicklung von extraintestinalen Komplikationen vom Typ einer thrombotischen Mikroangiopathie kommen. Hierbei treten eine Verminderung der Thrombozytenzahl sowie eine Schädigung von Arteriolen unter Bildung von Mikrothromben und eine hämolytische Anämie auf (Karmali, 1989, Roche Lexikon Medizin, 1991). Beim hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) können die mikroangiopathischen Schädigungen der Niere zu akutem Nierenversagen führen, was gemeinsam mit der hämolytischen Anämie einen lebensbedrohlichen Zustand bedeuten kann (Karmali *et al.*, 1985, Yoshioka *et al.*, 1999). Weiterhin können neurologische Symptome auftreten mit Lethargie, Kopfschmerzen, Krämpfen und Enzephalopathie (Tesh und O'Brien, 1991). Vor allem bei Erwachsenen kann es im Rahmen der thrombotischen Mikroangiopathie auch zur Ausprägung einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) kommen, wobei Kapillaren in Haut, Schleimhaut und Subcutis geschädigt werden, die Patienten häufig fiebern und ebenfalls an neurologischen Symptomen leiden (Karmali, 1989, Roche Lexikon Medizin, 1991; zusammengefaßt in Paton und Paton, 1998).

Das Reservoir für EHEC liegt in der Darmflora von Nutztieren, insbesondere Rindern, die häufig asymptomatische Träger dieser Keime sind. Infektionen werden durch die fäkale Kontamination von Nahrungsmitteln verursacht, was assoziiert mit öffentlichen Nahrungsmittelverteilern zu großen Ausbrüchen führen kann (Paton und Paton, 1998). Die Kontamination von Rindfleisch bei der Schlachtung und die darauffolgende Verarbeitung zu Hackfleisch stellt besonders häufig eine Infektionsquelle dar, weil durch den Hackprozeß die Bakterien gleichmäßig im Fleisch verteilt und durch unvollständiges Garen des Hackfleisches nicht abgetötet werden (Paton und Paton, 1998). Aus diesem Grund waren Hamburger häufig die Ursache von großen Ausbrüchen (Karmali, 1989, Griffin *et al.*, 1994). Weitere bedeutende Infektionsquellen sind fermentierte oder getrocknete Fleischprodukte, Rohmilch sowie Obst- und Gemüseprodukte, die in Kontakt mit Jauche gekommen sind (Paton und Paton, 1998, Massa *et al.*, 1999). Die Übertragung durch fäkal kontaminiertes Wasser sowie von Person zu Person spielen ebenfalls eine wichtige Rolle (Ackman *et al.*, 1997, Kurokawa *et al.*, 1999, Reida *et al.*, 1994, Heuvelink *et al.*, 1999). Seit kurzem werden außerdem Stubenfliegen als Überträger von EHEC diskutiert (Kobayashi *et al.*, 1999).

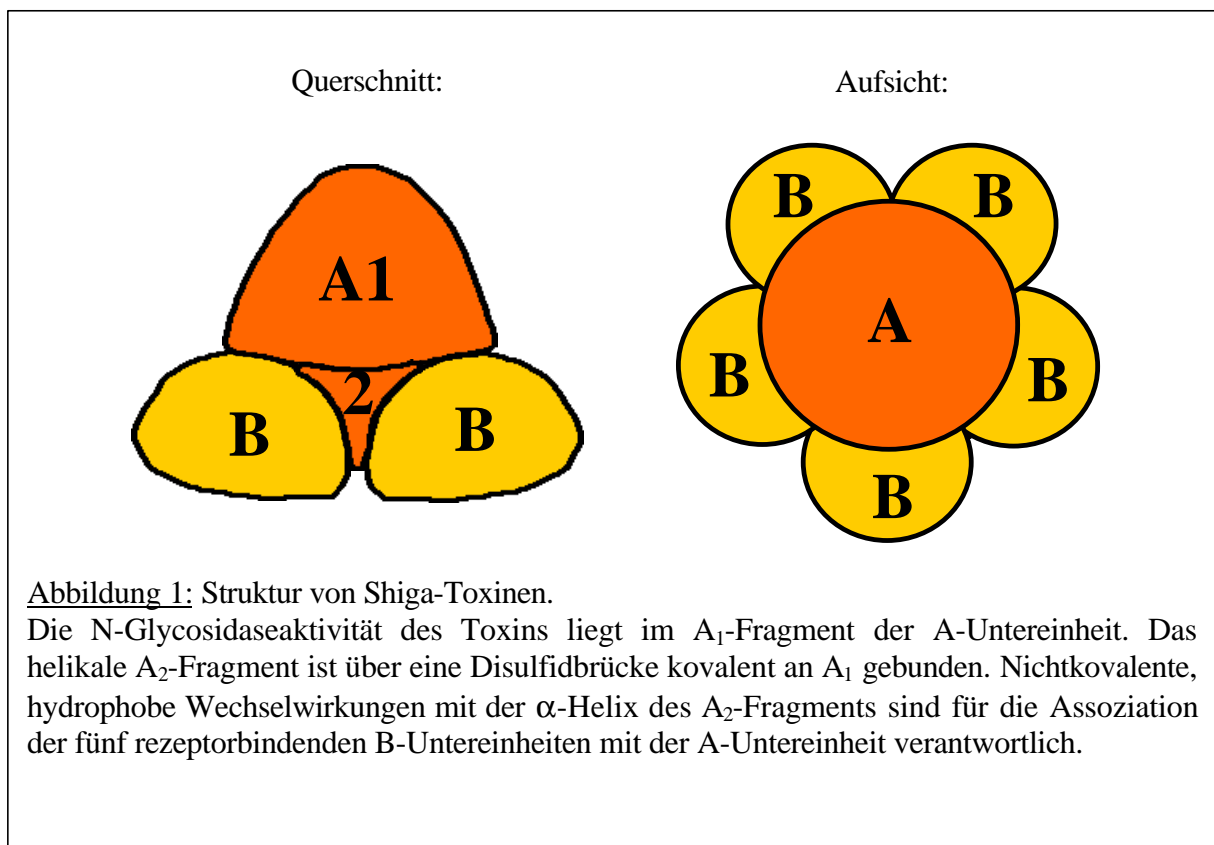
1.2 Shiga-Toxine

Die Produktion von Shiga-Toxinen (Stx) spielt neben der Bildung von A/E-Läsionen eine Hauptrolle in der Pathogenese von EHEC (Frankel *et al.*, 1998). Der Prototyp für die Familie der Shiga-Toxine ist das als erstes entdeckte Stx aus *Shigella dysenteriae* Typ 1 (Keusch *et al.* 1972, Keusch und Jacewicz, 1975, O'Brien *et al.*, 1980, Calderwood, 1996). Die später beschriebenen Shiga-Toxine aus *E. coli* (vormals Shiga-like Toxine, SLT oder Verotoxine, VT; O'Brien *et al.*, 1982, Calderwood, 1996) können in zwei serologisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: Stx1 ist zu fast 100 % identisch mit Stx aus *S. dysenteriae* und lässt sich mit Serum gegen Stx neutralisieren (O'Brien *et al.*, 1982, O'Brien und LaVeck, 1983). Stx2 ist mit anti-Stx-Serum nicht neutralisierbar und bildet eine serologisch eigenständige, heterogene Gruppe, der unterschiedliche Subtypen angehören: Stx2, Stx2c und Stx2e. Die Toxine können in einem Stamm einzeln oder in Kombination vorkommen (Scotland *et al.*, 1985, Strockbine *et al.*, 1986, Schmitt *et al.*, 1991, Marques *et al.*, 1987). Die biologischen Wirkungen der Shiga-Toxine umfassen zum einen ihre Zytotoxizität für empfindliche Zellen (z. B. Vero- und HeLa-Zellen), die auf ihrer Hemmung der Proteinbiosynthese beruht, und zum anderen ihre Enterotoxizität, die im "rabbit-ileal-loop"-Modell nachgewiesen wurde, sowie ihre Neurotoxizität, die mit einer Gliedmaßenlähmung und Todesfolge im Maus- und Kaninchenmodell einhergeht (Acheson *et al.*, 1991, Keusch *et al.*, 1972, Keusch und Jacewicz, 1975).

1.2.1 Bau und zelluläre Wirkungsweise der Shiga-Toxine

Shiga-Toxine gehören zur Klasse der AB₅-Proteintoxine. Sie sind aus je einer katalytisch aktiven A-Untereinheit und 5 B-Untereinheiten, die für die Bindung des Toxins an Zelloberflächenrezeptoren verantwortlich sind, aufgebaut und besitzen als Holotoxin ein Molekulargewicht von 70 kDa (O'Brien und Holmes, 1987). Die 32 kDa große A-Untereinheit wird durch proteolytische Spaltung aktiviert, die ein N-terminales 28 kDa A₁-Fragment und ein C-terminales 4 kDa A₂-Fragment ergibt, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die katalytische Aktivität des Toxins liegt dabei im A₁-Fragment (zusammengefasst in O'Brien *et al.*, 1992). Fünf jeweils 7,7 kDa schwere B-Untereinheiten assoziieren zu einem ringförmigen Homopentamer mit einer Pore in der zentralen Achse, die von α -Helices nach innen begrenzt wird. Die Bindung des Pentamers an die A-Untereinheit erfolgt über das helikale A₂-Fragment, das sich in diese zentrale Pore unter Ausprägung von

hydrophoben Wechselwirkungen einlagert (siehe Abbildung 1) (Stein *et al.*, 1992, Haddad und Jackson, 1993, Fraser *et al.*, 1994a, Jemal *et al.*, 1995, Richardson *et al.*, 1996). Die B-Untereinheiten binden an den Glycolipid-Zelloberflächenrezeptor Globotriaosylceramid (Gb₃), wobei unterschiedliche Toxintypen wahrscheinlich verschiedene Epitope des Gb₃-Oligosaccharids erkennen (Arab und Lingwood, 1996). Nur Stx2e bildet eine Ausnahme und bindet zusätzlich zu Gb₃ präferentiell an Globotetraosylceramid (Gb₄) (zusammengefaßt in Lingwood, 1996). Röntgenstrukturanalysen von Stx1B-Pentameren hatten gezeigt, daß die Rezeptorbindungsstelle in einem Spalt zwischen benachbarten Stx1B-Untereinheiten liegt, woran ein β -Faltblatt aus Aminosäuren beider Untereinheiten beteiligt ist (Stein *et al.*, 1992, Richardson *et al.*, 1997)



Gelangen Shiga-Toxine in einen Organismus, so binden sie über ihre B-Untereinheiten an die Glycolipid-Zelloberflächenrezeptoren und werden zusammen mit den Rezeptoren über sog. “coated pits”, die von Clathrin umhüllt sind, aufgenommen und in die Endosomen weitergeleitet (Sandvig und van Deurs, 1996, Sandvig *et al.*, 1989). Die diesen Prozeß einleitende frühe Signaltransduktion wird möglicherweise durch die Src-Kinase Yes vermittelt, dabei spielen Tyrosin-Phosphorylierungen eine wichtige Rolle (Katagiri *et al.*, 1999). Von den

Endosomen werden die Toxin-Rezeptor-Komplexe retrograd über das Trans-Golgi-Netzwerk und den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Reticulum (ER) und in die Kernhülle transportiert (Sandvig *et al.*, 1992, Sandvig *et al.*, 1994, Johannes und Goud, 1998). Für die Steuerung dieses Transports scheint die Fettsäurekettenlänge der jeweiligen toxingebundenen Gb₃-Isoformen eine wichtige Rolle zu spielen (Arab und Lingwood, 1998). Im ER erfolgt die Toxintranslokation ins Cytosol. Die Hauptkette der A-Untereinheit wird im ER durch die zelluläre Protease Furin in die A₁- und A₂-Fragmente gespalten (Garred *et al.*, 1995, Lea *et al.*, 1999). Die beide Fragmente verbindende Disulfidbrücke wird reduziert und das aktivierte A₁-Fragment über die ER-Membran ins Zytoplasma transportiert, woran eine C-terminale, hydrophobe, Signalsequenz-ähnliche Membrantranslokationsdomäne im A₁-Fragment beteiligt ist (Sandvig und van Deurs, 1996, Saleh *et al.*, 1996, Suhan und Hovde, 1998). Das A₁-Fragment ist eine hochspezifische N-Glycosidase, die an einer spezifischen Stelle ein Adenosin in der 28S rRNA der 60S Ribosomenuntereinheit depuriniert (Endo *et al.*, 1988, Saxena *et al.*, 1989). Dies führt zu einer Inhibition der Elongationsfaktor 1-abhängigen Aminoacyl-tRNA-Bindung an die Ribosomen, was eine Inhibition der Peptidkettenelongation und damit eine irreversible Ribosomeninaktivierung und den Zelltod zur Folge hat (Igarashi *et al.*, 1987, Ogasawara *et al.*, 1988). Kürzlich wurde auch eine Inhibition von prokaryotischen Ribosomen durch das aktive A₁-Fragment demonstriert (Skinner und Jackson, 1998, Suh *et al.*, 1998).

1.2.2 Die Rolle von Shiga-Toxinen in der Pathogenese

Betrachtet man das Geschehen während einer EHEC-Infektion auf der Ebene des Gesamtorganismus, so kommt es durch das im Darm produzierte Toxin zunächst zu einer Schädigung lokaler empfindlicher Darmepithelzellen wie den Gb₃-haltigen absorptiven Villus-Epithelzellen im Ileum (Mobassaleh *et al.*, 1988, Mobassaleh *et al.*, 1994).

Vor der Ausbildung systemischer Schäden muß das Toxin in den Blutkreislauf transloziert werden. Diese Translokation kann direkt über Läsionen in der Darmschleimhaut oder indirekt über Transcytose durch intakte Darmepithelzellen erfolgen (Paton und Paton, 1998, Acheson *et al.*, 1996, Hurley *et al.*, 1999). Nach Eintritt in den Blutstrom gelangt das Toxin in entfernten Geweben an Zellen mit geeigneten Rezeptoren, wobei die Rezeptorspezifität des Toxins und die Menge an exponiertem Rezeptor auf der Zielzelle einen entscheidenden Einfluß auf die Pathogenese haben (Lingwood, 1996). Beispielsweise bindet Stx1 in der Niere hauptsächlich an Tubulusepithel- und bei Kindern auch an

Glomerulusendothelzellen, parallel zur Verteilung von Gb₃ auf den entsprechenden Zellen (Lingwood, 1994, Uchida *et al.*, 1999a). Tubuläre Nekrose und die Zerstörung des Glomerulusendothels mit Kapillarverschluß führen zur Ausprägung des HUS (Takeda *et al.*, 1993, Richardson *et al.*, 1988). Auch die Endothelien von Blutgefäßen in Darm und Zentralnervensystem (ZNS) können durch eine derartige Intoxikation geschädigt werden (thrombotische Mikroangiopathie), was in verschiedenen Tiermodellen gezeigt wurde (Richardson *et al.*, 1992, Zoja *et al.*, 1992, Tashiro *et al.*, 1994, Ren *et al.*, 1999). Zusätzlich zur Mikroangiopathie können im ZNS Neuronen auch direkt durch die Toxinwirkung Schaden erleiden (Fujii *et al.*, 1996, Fujii *et al.*, 1994, Mizuguchi *et al.*, 1996).

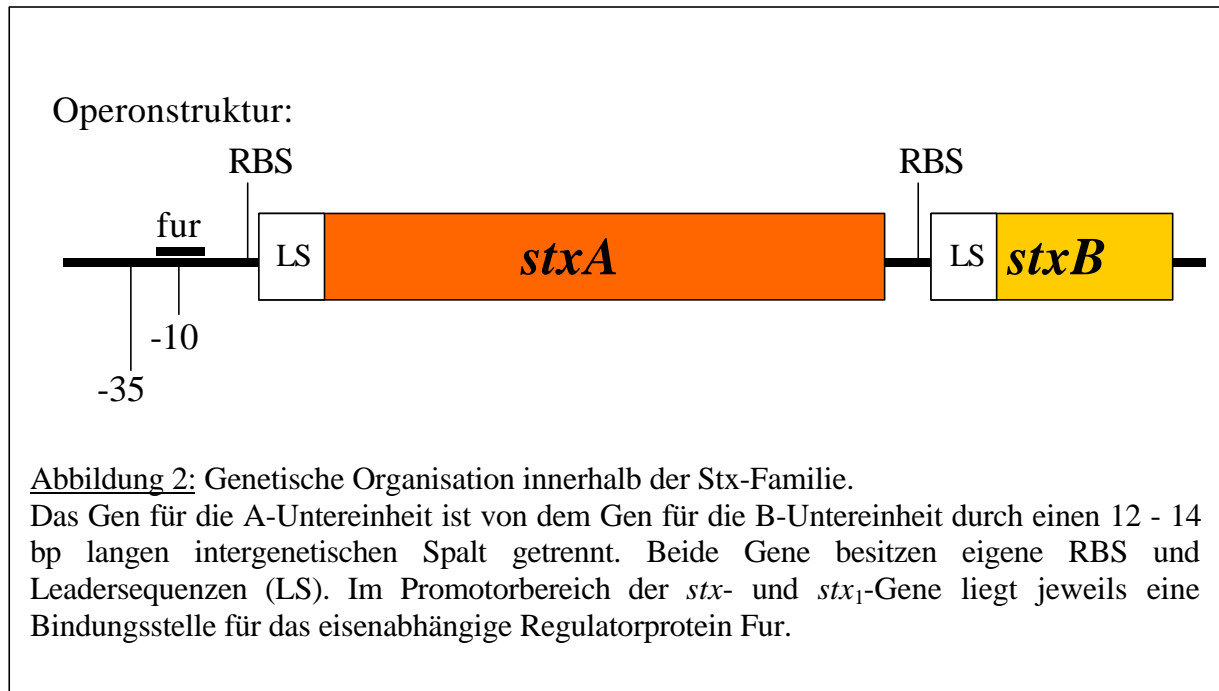
Auch die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen bei einer Intoxikation mit Shiga-Toxinen hat massive Auswirkungen auf die Ausprägung von toxinvermittelten Gewebeschädigungen (zusammengefaßt in Tesh, 1998). Durch die Freisetzung von TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α), LPS und IL-1 β (Interleukin 1 β) bei einer Infektion oder durch die Anwesenheit von Butyrat kann die Gb₃-Produktion in den an sich wenig sensitiven Endothelzellen großer Blutgefäße hochreguliert und damit deren Shiga-Toxin-Sensitivität gesteigert werden (Louise und Obrig, 1991, Kaye *et al.*, 1993, Louise und Obrig, 1992, van de Kar *et al.*, 1992). Auch die Toxinsensitivität mikrovaskularer Gehirndothelzellen kann durch TNF α , IL1 β und Butyrat erhöht werden (Ramegowda *et al.*, 1999). Dem TNF α könnte eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Shiga-Toxin-spezifischen Cytokinantwort und der damit verbundenen Gewebeschädigungen zukommen (Isogai *et al.*, 1998, Hughes *et al.*, 1998, Sakiri *et al.*, 1998). Die Pathophysiologie des STEC-induzierten HUS könnte generell auf ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Antwort des Wirts, das sich auf dem Cytokinniveau widerspiegelt, zurückzuführen sein (Litalien *et al.*, 1999).

Zur Ausprägung des HUS trägt möglicherweise auch toxinvermittelte Apoptose in verschiedenen Nierenzelltypen bei (Kiyokawa *et al.*, 1998, Karpman *et al.*, 1998). Weitere nichtrenale Zelltypen wie Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten und Astrozytomzellen können ebenfalls durch Shiga-Toxin-vermittelte Apoptose geschädigt werden (Uchida *et al.*, 1999b, Yoshida *et al.*, 1999, Nakagawa *et al.*, 1999, Menge *et al.*, 1999, Arab *et al.*, 1998). Die beim HUS auftretende Thrombozytopenie könnte zumindest zum Teil auf eine Bindung der Toxine an Thrombozyten zurückzuführen sein (Cooling *et al.*, 1998), und die Adsorption von Shiga-Toxinen an Erythrozyten ermöglicht wahrscheinlich einen Transport der Toxine in Gewebe mit hochaffinen Rezeptoren und könnte damit deren verstärkte Intoxikation zur Folge haben (Newburg *et al.*, 1993).

Weiterhin wirken die verschiedenen Shiga-Toxin-Typen an sich unterschiedlich stark toxisch, was sich in einer häufigeren Assoziation von Stx2-produzierenden EHEC mit schweren klinischen Symptomen im Vergleich zu Stx1- oder Stx1- und Stx2-Produzenten widerspiegelt (Kleanthous *et al.*, 1990, Ostroff *et al.*, 1989). So hat Stx2 im Mäusemodell eine 400fach niedrigere LD₅₀ als Stx1 (Tesh *et al.*, 1993), und auch auf mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem menschlichen Darm hat Stx2 eine stärkere toxische Wirkung als Stx1 (Jacewicz *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde gezeigt, daß Stx2 im Gegensatz zu Stx1 auch während der stationären Wachstumsphase auf hohem Niveau produziert wird (de Mena *et al.*, 1997). Innerhalb der Stx2-Unterfamilie gibt es außerdem Toxinvarianten, die durch die Inkubation mit Mukus aus dem Dünndarm der Maus oder aus dem Colon des Menschen in ihrer Toxizität aktivierbar sind (Melton-Celsa *et al.*, 1996).

1.2.3 Genetische Organisation und Regulation der Shiga-Toxine

Die Gene für alle Mitglieder der Stx-Familie sind in der gleichen Weise organisiert, nämlich als einzelne Transkriptionseinheiten mit je einem Gen für die A-Untereinheit gefolgt von einem Gen für die B-Untereinheit, die durch eine kurze intergenetische Sequenz voneinander getrennt sind (Abbildung 2). Die *stx*₁- und *stx*₂-Operons sind phagenkodiert, während *stx* und die *stx*₂-Varianten chromosomal auf defekten Bakteriophagen kodiert vorliegen (Paton und Paton, 1998, Mizutani *et al.*, 1999). Die Größen der nichtprozessierten Untereinheiten von Stx, Stx1 und Stx2 liegen bei 315, 315 und 318 Aminosäuren (AS) in den A-Untereinheiten und 89 AS in den B-Untereinheiten (zusammengefaßt in Paton und Paton, 1998). Beide Untereinheiten besitzen eine hydrophobe Leadersequenz charakteristisch für sezernierte Proteine, nach deren Abspaltung sich für die A-Untereinheiten von Stx, Stx1 und Stx2 Größen von 293, 293 und 296 AS und für die B-Untereinheiten Größen von 69 (Stx, Stx1) und 70 AS (Stx2) ergeben (Haddad *et al.*, 1993, Seidah *et al.*, 1986, de Grandis *et al.*, 1987, Perera *et al.*, 1991b). Vergleicht man die Sequenzen der verschiedenen Shiga-Toxingene miteinander, so fällt auf, daß *stx* und *stx*₁ fast zu 100 % homolog sind. *stx*₂ weist dazu je 56 % Identität in den Genen für die A- und die B-Untereinheit auf (Jackson *et al.*, 1987).



Im Promotorbereich vor dem Gen für die A-Untereinheit liegt in den *stx*- und *stx*₁-Operons eine sog. Fur-Box, eine 21 bp lange, symmetrische Region, an die das eisenabhängige Regulatorprotein Fur bindet und die bei *stx*₂ fehlt. Sie gewährleistet die Repression der Toxinproduktion bei Anwesenheit von Eisen (Calderwood und Mekalanos, 1987, de Grandis *et al.*, 1987, Kozlov *et al.*, 1988). Die 1:5-Stöchiometrie der beiden Untereinheiten wird bei Stx durch unterschiedlich starke Ribosomenbindungsstellen (RBS) vor beiden Genen gewährleistet, wobei fünf mal mehr B-Untereinheiten als A-Untereinheiten produziert werden (Habib und Jackson, 1993). Zusätzlich wurde die Anwesenheit eines eigenen aktiven, eisenunabhängigen Promotors für *stxB* in *Shigella dysenteriae* Typ 1 beschrieben, der zur relativen Überexpression der B-Untereinheit beitragen könnte (Habib und Jackson, 1992). Für *stx*₁ wurde 230 bp "downstream" von *stxB*₁ ein rho-unabhängiger Terminator beschrieben (de Grandis *et al.*, 1987). Die Reduktion der Wachstumstemperatur auf 30°C bewirkt einen Rückgang der Expression von Stx, nicht aber von Stx1 (Weinstein *et al.*, 1988b).

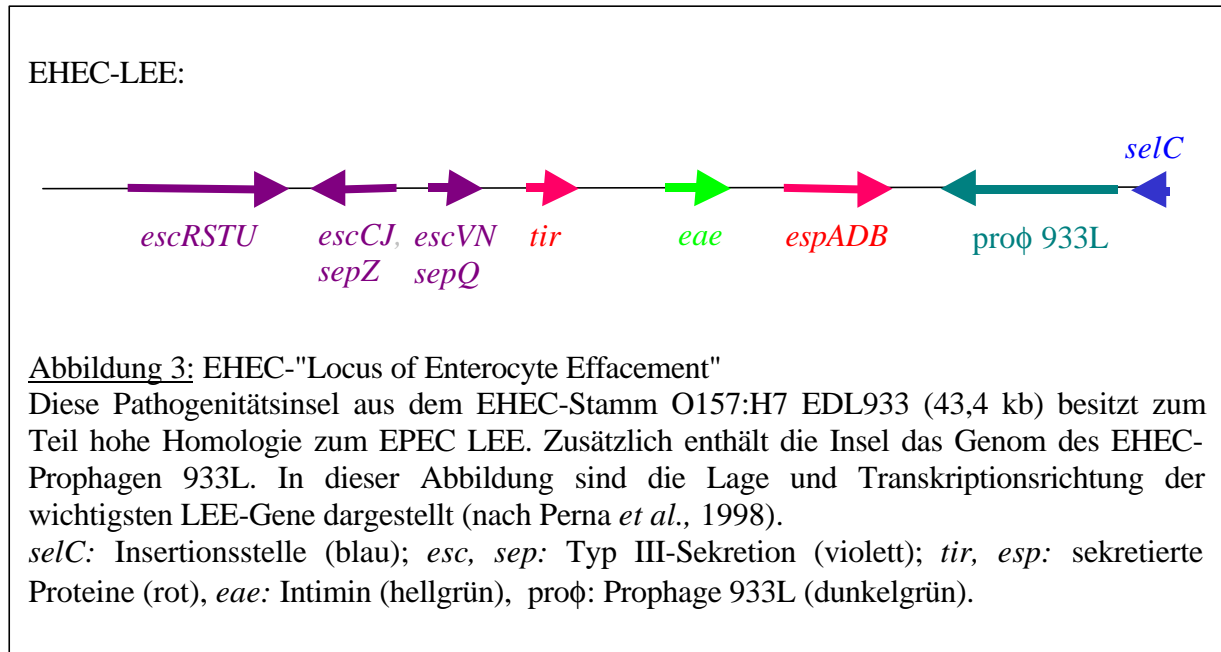
Im Gegensatz zu *stx/stx*₁ sind die identischen Promotoren von *stx*₂ und *stx*_{2e} 118 bp „upstream“ des Gens für die A-Untereinheit lokalisiert (Sung *et al.*, 1990). Sie werden konstitutiv mit einer den dereprimierten *stx/stx*₁-Promotoren vergleichbaren Intensität exprimiert und unterliegen keiner eisenabhängigen Regulation. Die Transkription erfolgt über den vor *stxA*₂ gelegenen einzigen Promotor. 274 bp "downstream" von *stxB*₂ wird ein rho-unabhängiger Terminator postuliert (Sung *et al.*, 1990).

Anhand eines Reportergens für *stx₂* in Form einer Transkriptionsfusion zwischen *stxA₂* und *phoA* wurde gezeigt, daß weder Eisen noch Osmolarität, pH-Wert, Sauerstoffdruck, Acetat oder verschiedene Kohlenstoffquellen einen Einfluß auf die Expression von *stx₂* haben (Mühldorfer *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu beeinflussen verschiedene zelluläre Proteine dessen Expression. So wurde nachgewiesen, daß die Deletion des histonähnlichen Proteins H-NS eine Derepression des Reportergens beim Absenken der Wachstumstemperatur auf 30°C bewirkt, während eine H-NS-unabhängige Repression bei 42°C erfolgt (Mühldorfer *et al.*, 1996). Auch das phagenkodierte, wildtypische *stx₂* liegt in Abwesenheit von H-NS bei 30 und 37°C in stärker dereprimierter Form vor als bei 42°C. Wie später näher ausgeführt wird, wurde auch eine phagenabhängige Regulation von *stx₂* beschrieben (Mühldorfer *et al.*, 1996). Weiterhin spielt die Protease RecA eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Bakteriophagen und damit indirekt auch für die Toxinproduktion (Mühldorfer *et al.*, 1996).

Neben den Shiga-Toxinen exprimieren EHEC eine Reihe weiterer Pathogenitätsfaktoren, die ebenfalls an ihrer Pathogenese beteiligt sind und im Folgenden näher erörtert werden.

1.3 Bildung von “attaching-and-effacing”-Läsionen

Bei der Bildung von “attaching and effacing”-Läsionen (A/E-Läsionen) durch EHEC kommt es ähnlich wie bei EPEC-Infektionen zur engen Adhärenz der Bakterien an Darmepithelzellen und zum lokalen Verlust von Mikrovilli, was mit Zytoskelett-Umstrukturierungen und der Bildung von Podesten, auf denen die Bakterien sitzen, einhergeht (Donnenberg *et al.*, 1993). Alle Gene für die an der Ausprägung dieser Läsionen beteiligten Faktoren sind in EHEC auf einer 43,4 kb großen Pathogenitätsinsel, dem sog. “locus of enterocyte effacement” (LEE), kodiert (siehe Abbildung 3) (Perna *et al.*, 1998, Pósfai *et al.*, 1997, McDaniel und Kaper, 1997).



Zu den wichtigsten Genen zählt zum einen das Gen *eae*, das für das bakterielle Oberflächenadhäsion Intimin kodiert, welches für die enge Wechselwirkung der Bakterienzelle mit der Wirtsepithelzelle verantwortlich ist (Yu und Kaper, 1992, Louie *et al.*, 1993). Zum anderen gehören dazu die Gene *esc* (*E. coli* secretion), *sep* (secretion of *E. coli* proteins), *cesD* (Chaperone für die Sekretion von EspD und -B) und *pas* (protein associated with secretion), die für Komponenten des EHEC-Typ III-Sekretionssystems kodieren. Dieses Sekretionssystem ist für den Transport der Pathogenitätsfaktoren EspA, EspB, EspD (*E. coli* secreted proteins) und Tir (translocated intimin receptor) aus der Bakterienzelle verantwortlich, die wiederum an Veränderungen der Signaltransduktionsprozesse in der Wirtszelle beteiligt sind (Nataro und Kaper, 1998, Frankel *et al.*, 1998, Kresse *et al.*, 1998).

Wie für EPEC und zum Teil auch für EHEC nachgewiesen wurde, bildet EspA dabei vorübergehend eine hohle, filamentöse Struktur auf der bakteriellen Oberfläche aus, die mit der Wirtszelle interagiert und über die die Translokation von EspB und Tir in die Wirtszelle erfolgt (Knutton *et al.*, 1998, Wolff *et al.*, 1998, Kenny *et al.*, 1997, Ebel *et al.*, 1998). EspB wird sowohl in die Wirtszellmembran eingebaut als auch ins Wirtszytosol transloziert und ist in den Proteintranslokationsprozeß involviert (Wolff *et al.*, 1998, Taylor *et al.*, 1998). Möglicherweise bildet es in der Wirtszellmembran eine Porenstruktur aus, durch die weitere Proteine direkt ins Zytosol eingeschleust werden können (Wolff *et al.*, 1998). Außerdem könnte es im Cytosol für die Umverteilung von Aktin verantwortlich sein (Taylor *et al.*, 1999). EspD ist in EHEC essentiell für die Bildung der EspA-Filamente und wird ebenfalls

in die Zielzellmembran integriert (Wachter *et al.*, 1999, Kresse *et al.*, 1999). Auch Tir (EspE), der translozierte Intiminrezeptor, wird in die Wirtszitoplasmamembran eingebaut, wird in EHEC aber im Gegensatz zu EPEC nicht Tyrosin-phosphoryliert (Kenny *et al.*, 1997, Deibel *et al.*, 1998, DeVinney *et al.*, 1999, Kenny, 1999). Das Bakterium bindet mit Hilfe seines äußeren Membranproteins Intimin an Tir (Hartland *et al.*, 1999) und bewirkt dadurch eine enge Adhärenz an die Wirtszelle. Tir dient hierbei möglicherweise als eine Art Brücke zwischen Wirtszytoskelett und Bakterium, wobei es die Akkumulation polymerisierten Aktins und vielleicht auch anderer Zytoskelettproteine unterhalb der adhärennten Bakterienzellen induziert (Frankel *et al.*, 1998, Kenny, 1999, Liu *et al.*, 1999). Bei dieser lokalen Zytoskelettumstrukturierung vesikuliert die Zytoplasmamembran, die Bürstensaummikrovilli gehen verloren und es kommt zur Podestbildung. Hierfür ist die Induktion hoch lokalisierter Kalzium-unabhängiger Signaltransduktionsprozesse durch die sezernierten *E. coli*-Proteine verantwortlich, die Serin- und Tyrosin-spezifische Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen zellulärer Proteine und damit die typischen Zytoskelettstrukturveränderungen zur Folge haben (Bain *et al.*, 1998, zusammengefaßt in Frankel *et al.*, 1998).

Die *espA*-, *B*- und *D*-Gene sind Teil eines Operons. Die Expression dieser Gene erfolgt in der frühen logarithmischen Phase nach Kontakt der Bakterien mit Eukaryotenzellen und wird in eng adhärennten Bakterien wieder ausgeschaltet. Stimulierend auf ihre Expression wirken Ca^{++} , Mg^{++} sowie HEPES und hohe Osmolarität. Die Temperatur und Supercoiling (H-NS) beeinflussen diesen Prozeß ebenfalls (Beltrametti *et al.*, 1999). Neueste Untersuchungen zeigen, daß die Expression aller LEE-kodierten Operons auch durch das sog. "Quorum sensing", vermittelt durch *luxS*, reguliert wird (Sperandio *et al.*, 1999).

1.4 Weitere charakteristische EHEC-Virulenzfaktoren

Ein weiterer, für EHEC charakteristischer Virulenzfaktor ist das sog. Enterohämolysin. Die kodierenden Gene *ehxCABD* sind auf dem 60 MDa-Virulenzplasmid lokalisiert und kommen sehr häufig in HUS-assozierten Stämmen vor (Schmidt *et al.*, 1994, Bauer und Welch, 1996, Schmidt und Karch, 1996). Es gehört zur Familie der porenbildenden RTX-Toxine und ist zu ca. 60 % dem *E. coli* α -Hämolysin homolog (Schmidt *et al.*, 1995, Schmidt *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum α -Hämolysin wird das 107 kDa große Enterohämolysin EHEC-HlyA nicht effizient sezerniert und ist demnach nur zur Bildung von kleinen, trüben Hämolysehöfen auf

Schafblutagar in der Lage (Schmidt *et al.*, 1995, Beutin *et al.*, 1989). Die Rolle von Enterohämolysin in der EHEC-Pathogenese ist noch nicht geklärt, es könnte jedoch eventuell durch die Lyse von Erythrozyten einen Beitrag zum Eisenerwerb leisten (Law und Kelly, 1995). Außerdem wird über eine mögliche Beteiligung an der Modulation von Entzündungsprozessen im Zusammenhang mit einer Schädigung von Epithelzellen und über eine synergistische Wirkung zusammen mit Stx und LPS spekuliert (Paton und Paton, 1998). Die Rolle zweier weiterer vermuteter phagenkodierter Hämolsine ist bislang unklar (Stroehrer *et al.* 1993, Beutin *et al.*, 1993).

Neben Enterohämolysin werden häufig zwei weitere Proteine sezerniert, die möglicherweise zur EHEC-Virulenz beitragen. Zum einen handelt es sich um ein Homolog zum hitzestabilen Enterotoxin EAST1 aus EAggEC (Savarino *et al.*, 1996, Paton und Paton, 1998), und zum anderen um die extrazelluläre Serinprotease EspP, die 70 % Homologie zum EPEC EspC-Protein und zu IgA1-Proteasen besitzt. EspP besitzt eine zytotoxische Wirkung und könnte an der hämorrhagischen Erkrankung beteiligt sein (Brunner *et al.*, 1997, Djafari *et al.*, 1997).

Weiterhin besitzen EHEC unterschiedliche Strategien, um im Wirt komplexiertes Eisen für sich zu verwerten. So produzieren sie wie alle anderen *E. coli*-Stämme ein Katecholsiderophorsystem, woran die Gene für die Synthese von Enterobaktin (*ent*) und für ein Fe-Enterobaktin-Aufnahmesystem (*fep*) beteiligt sind (Earhart, 1996, Torres und Payne, 1997). In O157:H7-Stämmen kommt es weiterhin zur Produktion eines auch in *Shigella dysenteriae* Typ I verbreiteten Häminaufnahmesystems, das von den *chu*-Genen (*E. coli* *hemin uptake*) chromosomal kodiert wird. ChuA ist ein Fur-reguliertes äußeres Membranprotein und dient als Häminrezeptor, wobei sowohl Hämoglobin als auch Hämin verwertet werden können (Torres und Payne, 1997, Law und Kelly, 1995). In nicht-O157-EHEC-Stämmen findet sich auch häufig die für *Yersinia*-Stämme beschriebene Pathogenitätsinsel HPI, auf der die Gene für das Siderophor Yersiniabactin und den Pesticinrezeptor FyuA lokalisiert sind (Karch *et al.*, 1999).

Für die Kolonisation des Gastrointestinaltrakts spielt während der Magenpassage zunächst die Säureresistenz der Organismen eine wichtige Rolle (Goodson und Rowbury, 1989, Leyer *et al.*, 1995, Gordon und Small, 1993, Waterman und Small, 1996, Horii *et al.*, 1998, Jordan *et al.*, 1999, Datta und Benjamin, 1999). Die Besiedlung des Darms wird durch Adhäsine vermittelt, wobei neben dem Hauptadhäsin Intimin noch weitere Adhäsine diskutiert werden, deren Signifikanz jedoch unklar ist. So wurde beschrieben, daß plasmidkodierte EHEC-typische Fimbrien mit einer 16 kDa Hauptuntereinheit eine Adhärenz an Henle 407-Zellen bewirken können (Karch *et al.*, 1987, Fratamico *et al.*, 1993, Toth *et al.*, 1990).

Kürzlich wurden *E. coli* F17-homologe Fimbrien in EHEC-Stämmen mit einer Hauptuntereinheit von 21 kDa beschrieben, deren Relevanz für die Adhärenz jedoch noch unklar ist (Maneval *et al.*, 1997). Auch äußere Membranproteine (OMPs) können Adhärenz an intestinale Kulturzellen vermitteln, wie beispielsweise ein 94 kDa großes OMP, das für die Adhärenz an HEp-2-Zellen verantwortlich und nicht identisch mit Intimin ist (Sherman *et al.*, 1991). Außerdem wurde für ein 8 kDa OMP eine Beteiligung an der Adhärenz an Henle 407-Zellen nachgewiesen (Zhao *et al.*, 1996), und das OMP Iha (*Vibrio cholerae* IrgA-homolog adhesin) vermittelt nachweislich Adhärenz von EHEC an HeLa-Zellen (Tarr, 1995, Tarr *et al.*, 2000). Das EHEC-Lipopolysaccharid (LPS) verstärkt analog dem LPS anderer Serotypen zwar die Zytotoxizität der Bakterien auf Vaskularendothelzellen, hat jedoch keinen Einfluß auf die Adhärenz der Bakterien (Nataro und Kaper, 1998, Bilge *et al.*, 1996, Cockerill *et al.*, 1996, Shimizu *et al.*, 1999). Auch die Anwesenheit von Flagellen scheint die Adhärenz nicht zu beeinflussen (Sherman *et al.*, 1988).

Alle in diesem Kapitel beschriebenen EHEC-Pathogenitätsfaktoren leisten jeder für sich einen bestimmten, charakteristischen Beitrag zur Gesamtvirulenz der pathogenen Stämme. Durch die gezielte Deletion der einzelnen Faktoren besteht somit die Möglichkeit, einen pathogenen EHEC-Stamm in seiner Virulenz gezielt zu beeinträchtigen. Diese Methodik wird bereits generell bei der Attenuierung von Krankheitserregern für die Entwicklung von Lebendimpfstoffen praktiziert.

2. Konstruktion von bakteriellen Lebendvakzinen

2.1 Prinzip von Attenuierung und Fremdantigenpräsentation

Lebendvakzine basieren in der Regel auf lebenden attenuierten, d. h. durch genetische Veränderungen in ihrer Virulenz abgeschwächten Pathogenen (Mekalanos, 1994, Del Giudice *et al.*, 1998). Sie haben gegenüber den konventionellen Vakzintypen, die auf der Basis von chemisch oder durch Hitze inaktivierten Erregern oder deren Bestandteilen beruhen (Gregoriadis *et al.*, 1999, Ahmad und Chapnick, 1999, Rappuoli, 1997, Del Giudice und Rappuoli, 1999), in Bezug auf Herstellung und Immunogenität enorme Vorteile (Mekalanos, 1994, Del Giudice *et al.*, 1998). Sie vermehren sich während der Immunisierung, wobei ihre typischen Antigene auf eine dem natürlichen Prozeß sehr ähnlicheren Art und Weise präsentiert und prozessiert werden. Außerdem können bei Verwendung attenuierter mukosaler Erreger wie

Salmonellen (Kraehenbühl und Neutra, 1992, Phalipon und Sansonetti, 1998, Sirard *et al.*, 1999) entsprechende mukosale Immunantworten erzielt werden. Schließlich ermöglicht es die rekombinante DNA-Technologie heute, pathogene Stämme gezielt zu attenuieren und mit zusätzlichen Fremdantigenen zu versehen, was das Immunisierungspotential dieser Vakzine erweitert (Mekalanos, 1994, Schödel und Curtiss, 1995, Sirard *et al.*, 1999).

Bei der Herstellung rekombinanter Lebendvakzine ist die Sicherheit der resultierenden Stämme zu gewährleisten. So muß man das Risiko vermeiden, daß genetisch attenuierte Stämme zu pathogenen Erregern revertieren. Zudem kann die Virulenz eines Lebendvakzins abhängig vom Wirt sein, schwere Nebeneffekte können beispielsweise in immunsupprimierten Individuen oder Kindern auftreten. Ferner ist eine unerwünschte Übertragung von genetischem Material auf die Umweltmikroflora (Antibiotikaresistenzen, unbekannte Virulenzfaktoren) zu vermeiden. Um die Sicherheit von Lebendvakzinen zu verbessern, sollten Mutationen in die Stämme eingeführt werden, die die Möglichkeit einer Persistenz dieser Stämme in der Umwelt minimieren (Mekalanos, 1994). Aus diesem Grund wurden sog. "Suizid-Systeme" entwickelt, die das Überleben rekombinanter Lebendvakzine in der Umwelt zu verhindern sollen (z. B. "host killing", Klemm *et al.*, 1995, Endonukleasen, Ahrenholtz *et al.*, 1994, induzierbare Phagenlysisgene, Tedin *et al.*, 1995)

Die Sicherheit der potentiellen Lebendvakzinstämme wird auch durch eine gezielte Attenuierung maximiert (Lindberg, 1998, Mrsny, 1998). Die gezielte Attenuierung kann zum einen über die Ausschaltung bestimmter Stoffwechselfgene geschehen (Auxotrophie), was eine verminderte Lebensfähigkeit dieser Stämme zur Folge hat. Dadurch reduziert sich ihre Fähigkeit, einen Wirt effizient zu besiedeln, und damit auch ihre Virulenz. Am intensivsten wurde die Attenuierung von *Salmonella typhimurium* durch Mutationen in Genen für den Aminosäure- (*aro*, *asd*; Hoiseth und Stocker, 1981, Dougan *et al.*, 1988, Galan *et al.*, 1990) und den Purinmetabolismus (*purADEL*, *carAB*, *deoA*; McFarland und Stocker, 1987, Conner *et al.*, 1998, O'Callaghan *et al.*, 1988) sowie in weiteren Genen untersucht (*htrA*; Chatfield *et al.*, 1992, Lowe *et al.*, 1999; Dunstan *et al.*, 1998, Bowe *et al.*, 1998, Valentine *et al.*, 1998, Kaniga *et al.*, 1998). Eine Attenuierung kann zum anderen über das gezielte "Ausschalten" von Virulenzfaktoren in pathogenen Stämmen erreicht werden (Bowe *et al.*, 1998, Medina *et al.*, 1999) Für eine effiziente, sichere Attenuierung eines Vakzinestamms ist es notwendig, mindestens zwei genetisch nicht gekoppelte Mutationen in den Stamm einzuführen, um die Möglichkeit einer zufälligen Reversion zum Wildtyp auszuschließen.

Um die Immunantwort gegen Lebendvakzinstämme zu verstärken und eine gleichzeitige Immunisierung gegen mehrere unterschiedliche Krankheitserreger zu ermöglichen, werden in den attenuierten Stämmen häufig zusätzlich Strukturgene für Virulenzfaktoren anderer pathogener Mikroorganismen exprimiert. In attenuierten *S. typhimurium*-Stämmen ist dies beispielsweise geschehen mit den Genen für die Produktion bakterieller oder viraler Proteine (Gomez-Duarte *et al.*, 1999, Nayak *et al.*, 1998, Ascón *et al.*, 1998, Schriefer *et al.*, 1999, Covone *et al.*, 1998, Ward *et al.*, 1999, Smerdou *et al.*, 1996, Valentine *et al.*, 1996, Karem *et al.*, 1997, Steger *et al.*, 1999, Djavani *et al.*, 2000). Um eine effiziente Präsentation der Fremddantigene gegenüber dem Immunsystem des geimpften Organismus zu gewährleisten, können die gewünschten Epitope in Zelloberflächen-assoziierte Strukturen der Impfstämme eingebaut (Stocker, 1990, Westerlund-Wikström *et al.*, 1997, Hedegard und Klemm, 1989, Yakhchali und Manning, 1997, Wang *et al.*, 1999) oder den zelleigenen Transportsystemen zugänglich gemacht werden (Gentshev *et al.*, 1996 und 1997, Rüssmann *et al.*, 1998).

An Hand derselben Methoden wurden neben Salmonellen weitere darmpathogene Bakterien auf analoge Weise attenuiert und für die Präsentation von Fremddantigenen gentechnisch verändert, wie beispielsweise *Shigella flexneri* und *Vibrio cholerae*.

2.2 Möglichkeiten der Attenuierung durch das Ausschalten von Regulatorgenen

Zusätzlich zur Attenuierung von Pathogenen durch die Einführung von Auxotrophie und durch die Deletion von Pathogenitätsfaktoren besteht die Möglichkeit der Attenuierung durch das Ausschalten von regulatorisch wirksamen Elementen (Harel und Martin, 1999). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß durch die Deletion eines einzigen Regulatorgens multiple Faktoren innerhalb eines Organismus betroffen werden können, was von einer generellen Beeinträchtigung der Vitalität bis zur spezifischen Stilllegung ganzer Virulenzgenregulationskaskaden reichen kann. Regulatoren können auch zusätzlich zur Deletion spezifischer Virulenzgene ausgeschaltet werden, was den zukünftigen Vakzinstämmen zusätzliche Stabilität in Bezug auf die Reversion zum Wildtyp verleiht.

Für eine effiziente Attenuierung können zum einen Regulatorgene ausgeschaltet werden, deren Auswirkungen sich auf weite Bereiche des Stoffwechsels erstrecken und deren Deletion einen generellen Vitalitätsverlust des Organismus, gekoppelt mit einem Verlust der Virulenz, bewirken (*cya*, *crp*; Zhang *et al.*, 1999, Kennedy *et al.*, 1999, Roland *et al.*, 1999, Peighambari und Gyles, 1998; Maltose-Regulon in *V. cholerae*, Lång *et al.*, 1994).

Weiterhin könnten Regulatoren deletiert werden, die Regulationskaskaden steuern, welche speziell die Expression von Virulenzfaktoren aktivieren. Diese gehören oftmals zu den Familien der Virulenzgenaktivatoren mit Homologie zu den Regulatorproteinen AraC oder LysR, die sequenzspezifisch an Promotoren binden und die Transkription der „downstream“ gelegenen Gene aktivieren (Finlay und Falkow, 1997; VirF in *Yersinia* und *Shigella*, Wattiau und Cornelis, 1994, Sakai *et al.*, 1988; ToxT und IrgB in *V. cholerae*, Higgins und DiRita, 1996, Goldberg *et al.*, 1991; PerA in EPEC, Gomez-Duarte und Kaper, 1995, Mellies *et al.*, 1999; SpvR in *Salmonella*, Caldwell und Gulig, 1991; Fur, Litwin und Calderwood, 1993, Vasil und Ochsner, 1999).

Auch zwei-Komponenten-Systeme können als globale Regulatoren die Expression von Virulenzfaktoren steuern. Hierbei kommt es bei der Stimulation eines Sensorproteins durch extrazelluläre Signale zu dessen Autophosphorylierung und daraufhin zur Phosphorylierung eines Regulatorproteins, das wiederum als positiver oder negativer Transkriptionsregulator wirksam wird (Finlay und Falkow, 1997; BvgA/BvgS in *Bordetella pertussis*, Uhl und Miller, 1996; ToxR/ToxS in *V. cholerae*, DiRita, 1992; PhoP/PhoQ in *Salmonella*, Garcia Vescovi *et al.*, 1994; EnvZ/OmpR in *Salmonella* und *E. coli*, Forst und Roberts, 1994).

Eine weitere wichtige Gruppe von regulatorisch wirksamen Proteinen sind Faktoren, die auf den supercoiling-Status der DNA in der Zelle als Antwort auf Umweltveränderungen einwirken (Finlay und Falkow, 1997). Durch die Veränderung des supercoiling kann beispielsweise die Transkriptionsaktivität von Promotoren, auch die von Virulenzgenen, beeinflusst werden. Zur Gruppe dieser topologischen Effektoren gehören neben Gyrase und den Topoisomerasen sogenannte "Architekturproteine" des Genoms, wie die Histon-ähnlichen DNA-bindenden Proteine H-NS, YmoH und VirR (Tobe *et al.*, 1993, Falconi *et al.*, 1998, White-Ziegler *et al.*, 1998, Donato und Kawula, 1999, Cornelis, 1993, Hromockji *et al.*, 1992) sowie HU, IHF (integration host factor) und FIS (factor for inversion stimulation) (Dorman, 1995).

Schließlich können Organismen für die Regulation der Virulenzgentranskription auch alternative Sigmafaktoren einsetzen, die als Antwort auf verschiedene Umweltveränderungen entsprechend induziert werden. Diese veranlassen dann die Transkription bestimmter Gengruppen, u. a. von Virulenzgenen (Finlay und Falkow, 1997; RpoH: reguliert ToxT in *V. cholerae*, Parsot und Mekalanos, 1990; RpoS: reguliert SpvR in *Salmonella*, Fang *et al.*, 1992, Guiney *et al.*, 1995, Dove *et al.*, 1997; RpoN und AlgU in *Pseudomonas aeruginosa*, Schurr *et al.*, 1995).

Auch die Anwesenheit bestimmter tRNAs übt einen regulatorischen Einfluß auf die Expression von Virulenzfaktoren verschiedener Pathogene aus. Die Deletion der Gene *leuX* und *selC*, die für die selteneren tRNAs tRNA₅^{Leu} und tRNA^{Sec} kodieren, führt zu einem massiven Virulenzverlust im UPEC-Stamm 536, der mit dem Verlust der Expression zahlreicher Virulenzfaktoren einhergeht (Ritter *et al.*, 1995), wie in einem späteren Kapitel dieser Arbeit noch genauer beschrieben wird. Auch in anderen Organismen kann die Anwesenheit von tRNAs oder von in ihre Synthese und Modifikation involvierten Gene die Expression von Virulenzfaktoren beeinflussen (*vacC* in *S. typhimurium* und *Shigella flexneri*, , Conner *et al.*, 1998, Durand *et al.*, 1994; *poxA* in *S. typhimurium*, Kaniga *et al.*, 1998; *fimU* in *Salmonella enteritidis*, Clouthier *et al.*, 1998; *tyrT* in *S. flexneri*, Hromockyi *et al.*, 1992; *miaA* in *Shigella flexneri* und *Agrobacterium tumefaciens*, Durand *et al.*, 1997, Gray *et al.*, 1992).

Regulatoren bieten demnach viele Ansatzpunkte, über die die Attenuierung eines virulenten Stammes zum Zweck der Konstruktion von Lebendvakzinen geschehen kann. Einige der geschilderten Regulatordeletionen kommen bereits für die Konstruktion von Lebendvakzinen aus *S. typhimurium* zum Einsatz (*cya*, *crp*, Curtiss und Kelly, 1987, Zhang *et al.*, 1999; *phoP/Q*, Galan und Curtiss, 1989, Miller *et al.*, 1989 und 1990, García Véscovi *et al.*, 1996, DiPetrillo *et al.*, 1999; *OmpR*, Dorman *et al.*, 1989; *sirA*, Ahmer *et al.*, 1999; *slyA*, Buchmeier *et al.*, 1997; *rpoS*, Coynault *et al.*, 1996, Coynault und Norel, 1999). Für die Konstruktion von Vakzinen muß neben einer effizienten Attenuierung jedoch auch darauf geachtet werden, daß die Stämme in den zu vakzinierenden Organismen noch immunogen sind, da eine mögliche Überattenuierung diese zwar apathogen macht, sie dann aber nicht mehr in der Lage sind, eine Immunantwort zu induzieren, wie die Untersuchung einer *rpoE*-Mutante von *S. typhimurium* gezeigt hat (Humphreys *et al.*, 1999).

2.3 Entwicklung von Impfstoffen gegen EHEC

Eine Entwicklung von Impfstoffen gegen EHEC wäre erstrebenswert, weil die Behandlung von EHEC-Infektionen mit gewissen Antibiotika den Verlauf der Enteritis nicht verbessert, sondern im Gegenteil, die Gefahr für ein HUS erhöht, da diese Antibiotika Toxin-konvertierende Phagen induzieren. (Acheson und Donohue-Rolfe, 1989, Finlay und Falkow, 1989, Matsushiro *et al.*, 1999, Neill, 1998, Pavia *et al.*, 1990, Proulx *et al.*, 1992). Für eine Immunisierung kämen sowohl Menschen zur direkten Prävention der Infektion in Frage als auch Rinder, in denen eine Verhinderung der Kolonisierung auch die Übertragung der Erreger in die

Nahrungskette unterbinden würde (Levine, 1998).

Zahlreiche Studien, die die Entwicklung von Impfstoffen aus Einzelkomponenten von EHEC vorantreiben, sind zur Zeit im Gange. Hierzu gehört die Konstruktion von Vakzinen, in denen der Polysaccharidanteil von O157- oder von O111-LPS an Trägerproteine, unter anderem an StxB1, gekoppelt wird, und die in der Lage sind, bakterizide Serumimmunantworten auszulösen (Konadu *et al.*, 1994, 1998a, 1998b und 1999, Conlan *et al.*, 1999, Gupta *et al.*, 1995). Aber auch an Vakzinen gegen das Toxin, sei es als Toxoid oder als Konjugat mit Liposomen, wird gearbeitet (Keusch *et al.*, 1998, Fukuda *et al.*, 1998). Als Vakzinantigen könnte auch allein die gereinigte B-Untereinheit des Toxins verwendet werden, da diese nicht toxisch ist und eine Immunantwort gegen sie die Wirkung des Holotoxins verhindert (Mullett *et al.*, 1994). Ebenso könnte für die Immunisierung ein durch ortsspezifische Mutagenese genetisch detoxifiziertes Toxin (Toxoid) zum Einsatz kommen, das von sich aus nicht revertieren kann und trotzdem beide Untereinheiten enthält (Keusch *et al.*, 1998).

Neben der Entwicklung dieser zellfreien Vakzine wird auch an der Entwicklung von Lebendimpfstoffen gegen EHEC gearbeitet. Auch hier spielt die Induktion der Synthese protektiver Antikörper gegen Toxin eine herausragende Rolle. In Konzepten mit attenuierten *Salmonella typhimurium*-, *Shigella flexneri*- und *Vibrio cholerae*-Stämmen als Träger für EHEC-spezifische Antigene wurde in den meisten Fällen die nichttoxische B-Untereinheit des Toxins oder kurze Bereiche daraus in den Stämmen auf unterschiedliche Weise exprimiert. In *S. typhimurium* und *S. flexneri* wurden Fusionsproteine aus Stx1B-Peptiden und dem äußeren Membranprotein LamB direkt im Stamm exprimiert (Su *et al.*, 1992b, Ryd *et al.*, 1992) oder mit HlyA fusioniert und sezerniert (Su *et al.*, 1992a, Tzschaschel *et al.*, 1996). Erfolgreiche Immunisierungen wurden auch mit attenuierten *V. cholerae*-Stämmen, die komplettes Stx1B produzieren, durchgeführt (Butterton *et al.*, 1993, Acheson *et al.*, 1996b, Taylor *et al.*, 1994). Die Immunantworten in all diesen Fällen waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Expression von O111-LPS in einem *S. typhimurium*-Vakzinstamm induzierte bei einer Immunisierung von Mäusen die Produktion von Antikörpern (Wang *et al.*, 1999). Auch die Verwendung der apathogenen *Salmonella landau*, die natürlicherweise das O157-Antigen exprimiert, zur Immunisierung von Mäusen hatte die Produktion hoher Titer O157-spezifischer Antikörper zur Folge (Conlan *et al.*, 1999). Weitere Antigene, die in attenuierte Trägerstämme eingeführt werden könnten, sind die in die Darmkolonisation involvierten sezernierten Proteine und Intimin (Butterton und Calderwood, 1998).

Eine weitere Möglichkeit für die Konstruktion von Vakzinen gegen EHEC wäre, pathogene EHEC-Stämme zu attenuieren. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere mögliche Strategien für eine EHEC-Attenuierung verfolgt.

3. Zielsetzung der Arbeit

Shiga-Toxine sind in der EHEC-Pathogenese wahrscheinlich vor allem für die Ausprägung extraintestinaler Komplikationen verantwortlich, es ist jedoch weiterhin unklar, welchen Anteil sie an der Entwicklung von Durchfall haben. Ebenso ist die Rolle des Toxins im Krankheitsverlauf beim Menschen noch nicht aufgeklärt. Um diese Sachverhalte genauer erforschen zu können, sollte aus dem Stx₂-produzierenden EHEC-Stamm O157:H7 86-24 eine isogene Toxinmutante hergestellt werden. Da der Schweinegastrointestinaltrakt dem menschlichen sehr ähnlich ist, sollte diese Mutante mit dem Wildstamm in gnotobiotischen Schweinen verglichen und pathologische Veränderungen histologisch untersucht werden. Die Toxinmutante sollte weiterhin als Ausgangsstamm für die Entwicklung eines Lebendimpfstoffs gegen O157:H7-Stämme dienen. Außerdem sollte ein immunogenes, aber enzymatisch inaktives Fusionsprotein aus A- und B-Untereinheit des Toxins konstruiert werden, das auf die Induktion einer protektiven Immunantwort getestet werden sollte.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, genauere Einblicke in die Regulation von EHEC-Pathogenitätsfaktoren zu erlangen. Die Grundlage hierfür bildeten Untersuchungen von Mühldorfer *et al.* (1996). In diesen wurde gezeigt, daß die Expression von phagenkodierten Stx₂-Genen (*stx₂*) durch eine Induktion der Phagen drastisch erhöht wird. Dieser Effekt konnte auf zwei Wirkmechanismen zurückgeführt werden: Einerseits kommt es beim Übergang des Phagen aus dem lysogenen in den lytischen Vermehrungszyklus zu einer Kopienzahlerhöhung des Phagen-genoms einschließlich des *stx₂*-Genclusters, was zu einer Steigerung der Stx₂-Produktion führt (Mühldorfer *et al.*, 1996). Dieser Prozeß ist nachweislich abhängig von der Protease RecA (Mühldorfer *et al.*, 1996). In einem weiteren Projekt dieser Arbeit sollte daher die Fragestellung verfolgt werden, welchen Einfluß die Deletion des *recA*-Gens auf die Toxinproduktion und Gesamtpathogenität von EHEC-Stämmen hat.

Andererseits wurde von Mühldorfer *et al.* (1996) festgestellt, daß die Induktion des Bakteriophagen auch die Expression eines plasmidkodierten *stx₂*-Reportergens massiv steigern kann, wobei die Expression des Reportergens die Produktion von Stx₂ reflektiert. So wurde

gezeigt, daß es beispielsweise im *E. coli* K-12 Stamm C600(933W/pADR-28), der den lysogenen Stx2-konvertierenden Phagen 933W und ein plasmidkodiertes *stx*₂-Reporter gen enthält, nach Induktion des Phagen mit MMC zu einer ca. 40fachen Expressionssteigerung des *stx*₂-Reporter gens kommt (Mühldorfer *et. al.*, 1996). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß durch Phageninduktion die Stx2-Produktion auch dann hochreguliert werden kann, wenn das Toxin gen nicht auf dem Phagen kodiert vorliegt. Es wurde ein transaktiver, diffusibler, phagenkodierter Faktor postuliert, der entweder eine regulatorische Wirkung auf das *stx*₂-Operon direkt oder auf weitere regulationsvermittelnde Faktoren ausübt (Mühldorfer *et. al.*, 1996). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, diesen postulierten phagenkodierten Toxinregulator zu isolieren und zu charakterisieren, um abschätzen zu können, ob seine Deletion für eine Attenuierung von EHEC in Betracht zu ziehen ist.

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit hatte den regulatorischen Einfluß, der von tRNAs auf die Expression von Pathogenitätsfaktoren ausgeübt wird, zum Inhalt. Ein möglicher Mechanismus, über den tRNAs einen Einfluß auf die Genexpression ausüben können, ist die Kontrolle der Translationseffizienz über die Verfügbarkeit von sog. Isoakzeptor-tRNAs. Arbeiten im uropathogenen *E. coli*-Stamm 536 zeigten, daß auch Pathogenitätsfaktoren von dieser Art von Einflußnahme betroffen sind (Blum *et al.*, 1994, Ritter *et al.*, 1995 und 1997, Dobrindt, 1999). Die Deletion des tRNA-Gens *leuX* führt in diesem Stamm zu signifikanten Veränderungen in der Expression von spezifischen Virulenzfaktoren, was zur Attenuierung des Stammes führt (Ritter *et al.*, 1995). Hiervon betroffen sind die Expression von Flagellen, die Synthese von Enterobaktin, die Expression von Typ 1-Fimbrien, die Serumresistenz sowie die *in vivo*-Virulenz und die Motilität des Stammes. Im vorliegenden Projekt sollte untersucht werden, ob es in EHEC tRNA-abhängige Mechanismen der Regulation von Virulenzfaktoren gibt, die denen in UPEC ähneln. Das Ziel dieses Projekts war, das *leuX*-Gen, das für die tRNA_{5^{Leu}} kodiert, im Stx2-produzierenden EHEC-Stamm O157:H7 86-24 auszuschalten und den resultierenden Mutantenstamm in seiner Fähigkeit zur Expression von verschiedenen Pathogenitätsfaktoren und in seiner Virulenz im Tiermodell zu testen. Auf diese Weise sollte zum einen untersucht werden, ob sich *leuX* analog zu den Ergebnissen in UPEC auch in EHEC für die Attenuierung virulenter Stämme eignet. Zum anderen sollte die Hypothese von tRNAs als generelle Virulenzregulatoren in pathogenen *E. coli* überprüft werden.