

3. Vergleich der *in vivo*-Virulenz von enterohämorrhagischen *E. coli* und isogenen *stx*₂- und *recA*-Mutanten.

Neben der Konstruktion von isogenen *stx*₂-Mutanten (siehe Kapitel IV.2 und *stx*₂-Mutante TUV86-2 von Gunzer *et al.*, 1998) wurden für die Attenuierung von EHEC auch isogene *recA*-Mutanten und deren Komplementanten aus den Stämmen O157:H7 86-24 und EDL933 im Rahmen eines Projektes von Dr. I. Mühldorfer hergestellt und charakterisiert. Hierfür wurden 186 bp eines klonierten *E. coli* K-12 *recA*-Gens durch ein 1,4 kb *cat*-Gen (Cm^R) ersetzt und das mutierte *recA*-Gen durch einen Genaustausch in die entsprechenden *E. coli*-Wildstämme integriert. Diese Mutanten wurden auf ihre Stx₂-Produktion in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml MMC untersucht (Fuchs *et al.*, 1999). Bei dieser Antibiotikakonzentration wiesen die *recA*⁺ und *recA*⁻ *E. coli*-Stämme die gleichen Wachstumsraten auf. Alle *recA*⁻ Stämme zeigten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Mitomycin C sehr geringe Toxinproduktionsraten, die weit unterhalb von den Raten der *recA*⁺ Ausgangsstämme lagen. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen stieg die Toxinproduktion nur in den mit Mitomycin C behandelten *recA*⁺ Stämmen an (Tabelle 17) (Mühldorfer *et al.*, 1996). Zur Kontrolle wurde auch eine isogene *recA*-Mutante des uropathogenen, α-Hämolyysin-produzierenden *E. coli*-Stammes 536 und eine *recA*-Komplementante hergestellt (Fuchs *et al.*, 1999).

Diese Mutanten und Komplementanten wurden mit ihren Ausgangsstämmen von Prof. L. Emödy und M. Kerényi, University Medical School of Pécs, Ungarn, hinsichtlich ihrer Virulenz im Tiermodell verglichen. Als Tiermodell dienten sog. „Carworth Farm Lane Petter (CFLP) specific pathogen-free (SPF) mice“, denen die Teststämme sowohl intravenös (Modell für intravenöse Letalität) als auch intranasal (Lungentoxizitätsmodell) verabreicht wurden. Die Auswertung, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurde, ergab folgende Ergebnisse (s. Tabelle 17):

Tabelle 17: Untersuchungen zur *in vivo* Virulenz von isogenen *recA*⁺ und *recA*⁻ *E. coli*-Pathogenen in CFLP-SPF-Mäusen und Vergleich mit der Stx2-Produktion verschiedener EHEC-Derivate.

| <i>E. coli</i> -Stamm | RecA | Intravenöse Letalität tot/infiziert (%) | Lungen- toxizität tot/infiziert (%) | Stx2-Produktion (ng/ml) | |
|---|------|---|---|----------------------------|---------|
| | | | | ohne MMC | mit MMC |
| EHEC O157:H7 | | | | | |
| EDL933 | + | 20/20 (100) | 16/20 (80) | 486,7 | 6693,1 |
| EDL933r | - | 0/20 (0) | 3/20 (15) | 4,9 | 3,7 |
| EDL933r(pIM10) | + | 14/20 (70) | 10/10 (100) | 515,3 | 7893,2 |
| EDL933r(pUC18) | - | 0/20 (0) | 1/10 (10) | n.t. | n.t. |
| EHEC O157:H7 | | | | | |
| 86-24 | + | 20/20 (100) | 20/20 (100) | 369,3 | 6010,7 |
| 86-24r | - | 0/20 (0) | 3/20 (15) | 2,2 | 2,7 |
| 86-24r(pIM10) | + | 20/20 (100) | 10/10 (100) | 295,8 | 5692,3 |
| 86-24r(pUC18) | - | 1/20 (5) | 0/10 (0) | n.t. | n.t. |
| EHEC (<i>stx</i> ₂ ⁻) | | | | | |
| TUV86-2 | + | 0/20 (0) | 0/10 (0) | n.t. | n.t. |
| TUV86-2r | - | 0/20 (0) | 0/20 (0) | n.t. | n.t. |
| UPEC | | | | | |
| 536 | + | 20/20 (100) | 20/20 (100) | n.t. | n.t. |
| 536r | - | 20/20 (100) | 20/20 (100) | n.t. | n.t. |
| 536r(pIM10) | + | 20/20 (100) | 10/10 (100) | n.t. | n.t. |
| 536r(pUC18) | - | 20/20 (100) | 10/10 (100) | n.t. | n.t. |

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse aus dem Vergleich von *recA*⁺ und *recA*⁻ Derivaten der EHEC-Stämme O157:H7 EDL933 und 86-24, der Toxin-negativen EHEC-Mutante TUV86-2 sowie des UPEC-Stamms 536 im Mäusemodell (intravenöse Letalität und Lungentoxizität) sowie die Stx2-Produktion dieser Stämme dargestellt. Die Deletion von *recA* bewirkte in den toxinproduzierenden EHEC-Stämmen einen massiven Virulenzverlust und einen drastischen Rückgang der Stx2-Produktion. Die Menge an produziertem Toxin wurde im Kulturüberstand und im Periplasmaextrakt gemessen, die Gesamtmenge ist in ng/ml angegeben (Mittelwerte von n = 5). Die Mitomycin C (MMC)-Inkubation erfolgte mit 100 ng/ml.
n.t., nicht getestet.

Diese Untersuchungen ergaben, daß RecA keinen Einfluß ausübt auf die Virulenz des UPEC-Stamms 536, dessen Hämolyseproduktion sich von der seiner isogenen *recA*⁻ Mutante nicht unterschied (J. Hacker, pers. Mitteilung). Im Gegensatz dazu bewirkte die Einführung von *recA*-Mutationen in die Genome der EHEC-Stämme einen massiven oder totalen Virulenzverlust der entsprechenden Stämme, was mit der Stx2-Produktion der entsprechenden Stämme korrelierte. Die *trans*-Komplementation der *recA*⁻ EHEC-Mutanten erfolgte mit dem Plasmid pIM10, das ein *E. coli* K-12 *recA*-Gen in den Klonierungsvektor pUC18 kloniert enthält. Das Plasmid pIM10 restaurierte die Virulenz in fast allen Fällen, während die Anwesenheit des Kontrollplasmids pUC18 keine Auswirkung auf die Virulenz der Mutanten hatte. Auch die Stx2-Produktion der *recA*⁻ Mutanten wurde durch die Komplementation mit dem Plasmid pIM10 wiederhergestellt und war daraufhin wieder mit Mitomycin C induzierbar. Die *stx*₂-negative EHEC-Mutante TUV86-2 war sowohl in *recA*⁺ als auch in *recA*⁻ Zustand vollständig in seiner Virulenz gehemmt.

Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde der Einfluß von RecA auf die *in vivo*-Virulenz von EHEC und UPEC im Tiermodell bewertet. Die Deletion des *recA*-Gens in den EHEC-Stämmen O157:H7 EDL933 und 86-24 führte zu einem massiven Virulenzverlust dieser Stämme im Mäusemodell. Im Gegensatz dazu hatte die Deletion von *recA* im UPEC-Stamm 536 keinen Einfluß auf die Virulenz dieses Stammes.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß dieser Virulenzverlust auf eine drastische Verminderung der Stx2-Produktion in den EHEC-Stämmen zurückzuführen war, die durch einen starken Rückgang der Phagenfreisetzung als direkte Folge des Fehlens von RecA verursacht wurde. Dieser Effekt konnte durch ein *E. coli recA*-Gen komplementiert werden.