

Modulation der Genexpression von *Escherichia coli* O157:H7 durch Norfloxacin

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Sylvia Herold
Diplom Lebensmittelchemikerin
geboren am 02.06.1977 in Bautzen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schmidt
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Henle
Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch

Eingereicht am: 6. Juli 2005
Tag der Disputation: 18. November 2005

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2002 bis März 2005 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Herbert Schmidt angefertigt. Finanziell unterstützt wurde diese Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1407 (DFG Schm 1360/1-2 und Schm 1360/1-3).

*Der Wissende ist noch nicht so weit
wie der Forschende,
der Forschende ist noch nicht so weit
wie der heiter Erkennende.*

(Konfuzius)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY	V
A EINLEITUNG	1
A 1 FUNKTIONELLE GENOMANALYSE.....	1
A 2 DNA-MICROARRAYTECHNOLOGIE.....	1
A 2.1 Herstellung der DNA-Microarrays	3
A 2.2 Markierung der Nukleinsäuren	4
A 2.3 Detektion und Auswertung der Microarrays.....	5
A 2.4 Anwendung der Microarraytechnologie	6
A 2.5 <i>E. coli</i> O157 Array.....	7
A 3 ENTEROHÄMORRHAGISCHE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
A 3.1 Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>	10
A 3.1.1 Reservoir der Shiga Toxin-produzierenden <i>E. coli</i>	10
A 3.1.2 Infektionsdosis und Ausscheidungsdauer	11
A 3.1.3 Übertragung der STEC	11
A 3.1.4 Krankheitsbilder und Therapie von STEC-Infektionen	13
A 3.1.5 Diagnostik von STEC-Infektionen	15
A 3.1.6 Pathogenitätsfaktoren der STEC	16
A 3.1.6.1 Shiga Toxine und Shiga Toxin-konvertierende Bakteriophagen	16
A 3.1.6.2 "Attaching and Effacing" (A/E)-Läsionen.....	21
A 3.1.6.3 Weitere Virulenzfaktoren.....	22
A 3.1.6.4 Enterohämolysin.....	24
A 3.1.6.5 Serin Protease und Katalase-Peroxidase	24
A 3.1.6.6 "Clostridium difficile-like" Toxin und Zink-Metalloprotease.....	25
A 3.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Stamm EDL933	25
B ZIELSETZUNG	27
C MATERIAL UND METHODEN	28
C 1 MATERIAL	28
C 1.1 Verwendete Enzyme.....	28
C 1.2 DNA/RNA Größenstandards	28
C 1.3 Farbstoffe.....	28
C 1.4 Desoxynukleotidtriphosphate.....	28
C 1.5 Antibiotika	28
C 1.6 Puffer und Medien.....	29
C 1.6.1 Nährmedien und Puffer	29
C 1.6.2 Puffer für Plaquehybridisierung.....	30
C 1.7 Microarray und Microarray-Scanner	31
C 1.8 EDV	31
C 1.9 Oligonukleotidprimer	31
C 2 METHODEN	33
C 2.1 Bakterielle Arbeitsmethoden.....	33
C 2.1.1 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	33

INHALTSVERZEICHNIS

C 2.1.2	Lagerung und Kultivierung von <i>E. coli</i>	33
C 2.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Lebendkeimzahl.....	34
C 2.1.4	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	34
C 2.1.5	Wachstumskurve von <i>E. coli</i> EDL933	35
C 2.1.6	Induktionsexperimente mit dem <i>E. coli</i> O157:H7 Stamm EDL933	35
C 2.1.7	Freisetzung von Phagen	36
C 2.1.8	Isolierung von Phagen-DNA	36
C 2.1.9	Restriktion von Phagen-DNA	37
C 2.2	Gramfärbung und Elektronenmikroskopie	37
C 2.2.1	Gramfärbung	37
C 2.2.2	Rasterelektronenmikroskopie	38
C 2.3	Polymerasekettenreaktion.....	38
C 2.4	Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese.....	39
C 2.5	Denaturierende Gelelektrophorese	39
C 2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
C 2.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
C 2.8	RNA-Methoden	41
C 2.8.1	Umgang mit RNA und RNasen	41
C 2.8.2	Gesamt-RNA Isolierung	42
C 2.8.3	Gesamt-RNA Aufreinigung	42
C 2.8.4	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	43
C 2.9	Hybridisierung, Scannen und Analyse des 0157-Arrays.....	44
C 2.10	Real-Time PCR	46
C 2.10.1	Erstellung der Standardkurven	46
C 2.10.2	Quantifizierung der cDNA	47
C 2.11	Isolierung genomischer DNA	47
C 2.12	Southern Blot.....	48
C 2.12.1	Sondenherstellung.....	48
C 2.12.2	Dot-Blothybridisierung	48
C 2.12.3	Plaquehybridisierung.....	49
C 2.12.4	Waschen und Detektion.....	49
C 2.13	Freisetzung von Shiga Toxin.....	50
D	ERGEBNISSE.....	51
D 1	EFFEKTE VON NORFLOXACIN AUF <i>E. COLI</i> O157:H7	51
D 1.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	51
D 1.2	Induktion von <i>E. coli</i> O157:H7 EDL933 mit verschiedenen Norfloxacinkonzentrationen	52
D 1.3	Induktionsexperiment mit 200 ng/ml Norfloxacin	53
D 1.3.1	Optische Dichte, Lebendkeimzahl, Phagentiter und Stx-Produktion	53
D 1.3.2	Gramfärbung und Rasterelektronenmikroskopie	56
D 1.3.3	Plaquehybridisierung.....	58
D 1.4	Wachstumskurve nach Induktion mit 200 ng/ml Norfloxacin von <i>E. coli</i> O157:H7 Stamm EDL933r	60
D 2	GENEXPRESSIONSANALYSE VON <i>E. COLI</i> O157:H7.....	62
D 2.1	Optimierung der RNA-Isolierung	62

INHALTSVERZEICHNIS

D 2.2	Experimentelles Design der Transkriptomanalysen.....	64
D 2.3	Markierung und Hybridisierung der Gesamt-RNA	66
D 2.4	Auswertung und Reproduzierbarkeit der Mikroarrayversuche.....	67
D 2.5	Genexpressionsanalyse nach Induktion mit 200 ng/ml Norfloxacin	71
D 2.5.1	Genregulation der Prophagen BP-933W und CP-933V	73
D 2.5.2	Hochregulierte Gene nicht <i>stx</i> -kodierender Phagen.....	81
D 2.5.3	Analyse weiterer hochregulierter Gene von EDL933	83
D 2.5.4	Analyse der für <i>E. coli</i> O157:H7 Stamm RIMD0509952 spezifischen Gene.....	86
D 2.5.5	Weitere hochregulierte, nicht-phagenkodierte Gene.....	89
D 2.5.6	Deregulierte Gene	90
D 2.5.7	RT Real-Time PCR zur Quantifizierung von mRNA.....	97
D 2.5.7.1	Erstellen der Standardkurven	98
D 2.5.8	Expressionsraten ausgewählter Gene	99
D 2.5.8.1	Untersuchungen zur Deletion des <i>lomW</i> -Gens in <i>E. coli</i> O157:H7 Stamm EDL933.....	100
E	DISKUSSION	102
F	LITERATURVERZEICHNIS.....	118
ANHANG	139

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
AE	Absorptionseinheit
A/E Läsionen	„Attaching and Effacing“ Läsionen
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	copy DNA
cRNA	copy RNA
cy2	Cyanine-2
cy3	Cyanine-3
cy5	Cyanine-5
dATP	Desoxyadenosin-5´-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5´-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5´-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5´-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidin-5´-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linkend Immunosorbentassay
g	Gramm
G	Guanin
HC	hämorrhagische Colitis
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
I _{cut}	„Intensity cut“ (engl.), Intensitätsausschlusswert
Kb	Kilobasen
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
Kbp	Kilobasenpaare
LC	LightCycler
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml	Milliliter
MOPS	3-N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PBE	Plaque-bildende Einheiten
PCR	Polymerasekettenreaktion
rcf	„relative centrifugal force“ (engl.), relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“ (engl.), Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SDS	Natrium-(Sodium)-Dodecylsulfat
SSC	Lösung aus Natriumcitrat und Natriumchlorid (Sodium citrate, Sodium chloride) in destilliertem Wasser
ssDNA	Einzelstrang DNA (single strand)
Std	Standardabweichung
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga Toxin (Protein)
stx	Shiga Toxin-Gen
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tiff	Tagged image file format (engl.)
UV	Ultraviolett
V	Volt

Zusammenfassung

Shiga Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) sind wichtige Erreger von Lebensmittelinfektionen und gelten als Hauptverursacher für die Ausbildung einer hämorrhagischen Colitis und dem lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischem Syndrom. Als Hauptvirulenzfaktor und wichtigstes Charakteristikum der STEC wird die Fähigkeit angesehen, Shiga Toxine (Stx) zu produzieren. Die genetische Information für deren Produktion ist im Genom lambdoider Prophagen kodiert. Eine Antibiotikatherapie bei STEC-assoziierten Infektionen wird sehr kontrovers diskutiert, da sowohl die Produktion der Stx als auch die Freisetzung der Bakteriophagen *in vitro* durch antibiotisch wirkende Substanzen stimuliert werden kann.

Der enterohämorrhagische *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 beherbergt insgesamt 18 lambdoide Prophagen und prophagenähnliche Elemente, darunter den Stx1-kodierenden Phagen CP-933V und den Stx2-kodierenden Phagen BP-933W.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Gyrasehemmers Norfloxacin auf das Gesamttranskriptom von EDL933 mit Hilfe der DNA-Microarraytechnologie und unter Verwendung des MWG *E. coli* O157 Arrays umfassend zu untersuchen und insbesondere die Expression der Prophagengene zu analysieren. Hierfür wurde der *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 mit 200 ng/ml Norfloxacin inkubiert, Gesamt-RNA isoliert und diese mittels reverser Transkription in cDNA synthetisiert, wobei ein Einbau von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden erfolgte. Diese cDNA wurde mit den auf dem *E. coli* O157 Array befindlichen Oligonukleotiden hybridisiert. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten ermöglicht eine Analyse der Genexpression. Infolge der Induktion von EDL933 mit 200 ng/ml Norfloxacin zeigten 118 Spots eine Hochregulation und 122 eine Deregulation von Genen an. Bei genauerer Betrachtung resultierte auf Grund der Inkubation mit Norfloxacin eine erhöhte Expression von 52 Genen der Stx-kodierenden Phagen CP-933V und BP-933W. Insbesondere erfolgte eine erhöhte Regulation von Genen der späten Region des BP-933W. Das *stxA*₂-Gen wurde dabei im Vergleich zur nicht-induzierten Kultur 158-fach stärker exprimiert. Im Falle des Stx1-Phagen wiesen nur einige Gene der frühen Region eine gesteigerte Genaktivität auf. Auffallend war die Hochregulation einzelner Gene der nicht Stx-kodierenden Phagen. Gene des Primärstoffwechsels, u. a. Gene der Aminosäurebiosynthese, des Energiehaushaltes und der Zellteilung zeigten eine verminderte Genaktivität nach Induktion. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verwendete Konzentration von Norfloxacin große Auswirkungen auf das Gesamttranskriptom des untersuchten Stammes haben und insbesondere die Genexpression von zehn im Genom des EDL933 befindlichen Prophagen erhöht wurde.

Die durch die Microarrayversuche erhaltenen Expressionsraten wurden durch Quantifizierung der cDNA mittels RT Real-Time PCR Untersuchungen überprüft. Zusammenfassend ist festzustellen, dass Norfloxacin neben der antibiotischen Wirkung in der hier verwendeten geringen Konzentration multiple Effekte auf *E. coli* O157:H7 ausübt und die Auswirkungen in Zukunft noch detaillierter untersucht werden müssen.

Die DNA-Microarraytechnologie und der kommerziell erhältliche *E. coli* O157 Array ermöglichen diese umfassende Analyse des Transkriptionsprofils. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Technologie für Untersuchungen der Genexpression von *E. coli* O157 etabliert und validiert werden.

Summary

Infection with Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) is a serious cause of bloody diarrhea and sporadic cases and outbreaks of food-related diseases such as hemorrhagic colitis and the hemolytic uremic syndrome (HUS) worldwide. The use of antibiotics in therapy of STEC-associated diseases has been discussed controversially. Release of phage-encoded Shiga toxins is the major virulence factor of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The genome of the EHEC strain *E. coli* O157:H7 EDL933 contains 18 prophages or prophage elements, including the Stx1- and Stx2-encoding phages CP-933V and BP-933W. Stx-production and Stx-prophage induction can be stimulated by certain antibiotics, e.g. mitomycinC or UV light.

The aim of this study was to investigate the influence of a low concentration of the gyrase inhibitor norfloxacin on the whole transcriptome of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 and particularly on the gene expression of prophages using the DNA-microarray technology and the commercial available MWG *E. coli* O157 Array. To determine this, *E. coli* O157:H7 cultures were incubated with 200 ng/ml norfloxacin.

Total RNA was isolated and labelled with fluorescence dyes during reverse transcription. Following this, the labelled cDNA was hybridized with the commercial *E. coli* O157 Arrays and the fluorescence intensities were measured, analysed and evaluated with appropriate software.

Results of this study have indicated that a low concentration of norfloxacin have profound effects on the transcriptome of *E. coli* O157:H7. Under the conditions applied (200 ng/ml norfloxacin) and an incubation time of 120 minutes, 118 spots indicated a transcriptional upregulation and 122 spots a transcriptional downregulation of *E. coli* O157:H7 genes present on the array. In detail, 85 spots could be ascribed to EDL933 phage genes. Fifty-two of them could be assigned to the Shiga toxin encoding phages CP-933V and BP-933W, the others belonged to the non-Stx encoding phages or prophage elements existing in the EDL933 genome. Conspicuous, genes present in the late region of the BP-933W prophage were induced most strongly, up to 158-fold in the case of *stxA*₂. Only some genes present in the early region of the Stx1 encoding phage CP-933V were induced upon induction with norfloxacin. Notably, only some genes of the non-Stx phages of EDL933 appeared to be induced after induction. The additional upregulated genes were related to recombination and stress functions and to *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 genes. The majority of downregulated genes belonging to primary metabolism, such as amino acid biosynthesis, cell division and energy metabolism. In conclusion, an induction of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 with

200 ng/ml norfloxacin has profound effects on the transcriptome of *E. coli* O157:H7, in particular on the global gene expression of more than ten prophages.

The DNA-microarray technology and especially the *E. coli* O157 Array offer a modern tool for analysis of transcription profiles of the serious pathogen EHEC O157 in response to stress, e.g. antibiotics. In the context of this work, the DNA-microarraytechnology could be established and validated to provide the opportunity for further studies about the global effects on the whole transcriptome of *E. coli* O157.

Einleitung

A decorative graphic consisting of a thin horizontal line and a thick vertical bar. The horizontal line is light blue and spans across the page. The vertical bar is a darker blue and is positioned on the right side of the page, intersecting the horizontal line.

A Einleitung

A 1 Funktionelle Genomanalyse

Ein Genom stellt die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus dar. Durch die rasante Entwicklung in der Molekulargenetik, insbesondere der Sequenzierung, konnten bisher 218 Genome von Mikroorganismen sequenziert werden [NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>]. Die Analyse der Genomstruktur von Typstämmen und deren Varianten ist Gegenstand vieler molekulargenetischer Studien. Da der Aufbau eines Genoms wenig über dessen Funktion und die Interaktion der Gene miteinander aussagt, ist nicht nur die Sequenzinformation von Interesse, sondern vielmehr das Zusammenwirken der gesamten genetischen Information. Die Analyse der Funktion aller Gene bzw. der Genregulation unter variierenden Umweltbedingungen wird als funktionelle Genomanalyse („functional genomics“) bezeichnet. Das „zentrale Dogma der Molekularbiologie“ besagt, dass die genetische Information eines Organismus, ausgehend von DNA, zuerst in mRNA transkribiert und anschließend in Protein translatiert wird. Abhängig vom Entwicklungsstatus der Zelle, von Alter und Umwelteinflüssen wird ein unterschiedlicher Genpool zu mRNA transkribiert, da nicht jedes Gen unter den gegebenen Bedingungen exprimiert wird. Die Gesamtheit an gebildeter mRNA unter bestimmten Bedingungen wird als Transkriptom, und deren Untersuchung als Transkriptomanalyse („Transcriptomics“) bezeichnet [Joos *et al.*, 2003]. Auf Grund der gleichzeitigen Quantifizierung von mRNA-Molekülen können Aussagen über die Genaktivität getroffen werden. Die in den letzten Jahren entwickelte und stetig verbesserte Microarraytechnologie bietet vielfältige Möglichkeiten, funktionale Genomanalysen von pathogenen Mikroorganismen und von Wirtszellen zu erstellen.

A 2 DNA-Microarraytechnologie

Unter dem Begriff der Microarraytechnologie wird die miniaturisierte Anordnung von Nukleinsäuren, Proteinen oder Polysacchariden auf einer planaren Festkörperoberfläche verstanden. In der Regel handelt es sich bei den Oberflächen um beschichtete Glasoberflächen oder Nylon/Nitrocellulose-Membranen [Müller und Röder, 2004; Southern, 2001]. Die Grundlage der DNA-Microarrays beruht auf dem gleichen Prinzip wie das des Northern- oder Southern Blots. Zwei zueinander komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen. Markierte DNA- oder RNA-Moleküle hybridisieren entsprechend mit komplementärer DNA, welche an einer definierten Stelle auf einer Matrix immobilisiert vorliegt. Je nach Beschaffenheit der im-

mobilisierten Nukleinsäure unterscheidet man zwischen Oligonukleotidarrays und DNA- bzw. PCR-Microarrays. Bei den Oligonukleotidarrays handelt es sich um kurze einzelsträngige aufgebrachte DNA-Fragmente. Für Expressionsanalysen werden Oligonukleotidarrays mit Längen von 25-70 bp verwendet. Jedes Gen kann so durch ein Oligonukleotid dargestellt werden. Für „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP)-Analysen werden bevorzugt Arrays mit Oligonukleotiden zwischen 20-25 bp eingesetzt. Voraussetzung für beide Arrays ist eine detaillierte Sequenzinformation des untersuchten Organismus. Ist dessen Sequenz nicht vollständig bekannt, können PCR-Produkte oder isolierte DNA-Fragmente (100-1000 bp) als immobilisierte Nukleinsäure fungieren (A 2.1) [Müller und Röder, 2004; Southern, 2001; Schena *et al.*, 1998].

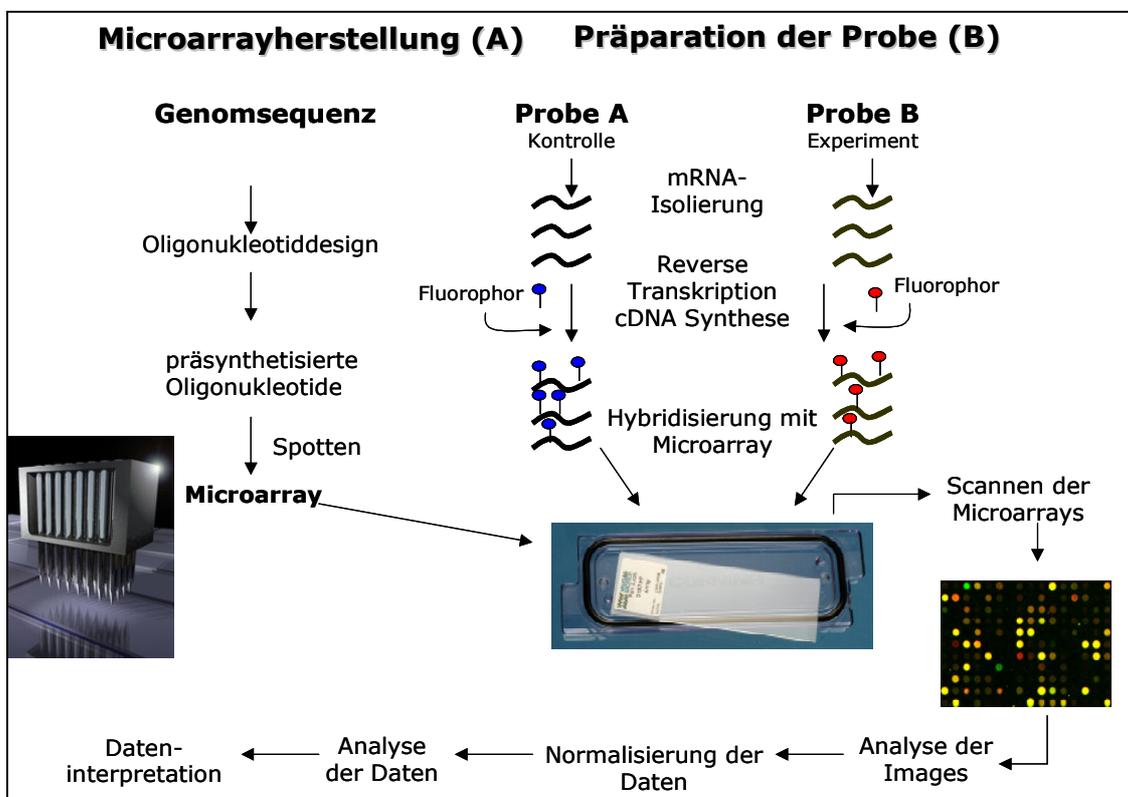


Abbildung A 1: Schematische Darstellung einer Microarrayherstellung (A) und eines Microarrayexperimentes (B).

Die Abbildung A 1 zeigt schematisch den Ablauf eines Microarrayexperimentes mit Arrayherstellung und Probenaufarbeitung. Um Expressionsprofile von Bakterien oder einer gegebenen Zelllinie zu analysieren, wird mRNA isoliert, gereinigt und in einem cDNA-Syntheseschritt mit Fluorophoren markiert. Diese markierte cDNA beider Proben wird vereinigt und mit den auf dem Microarray befindlichen DNA-Sequenzen hybridisiert (Abbildung A 1 (B)). Die Auswertung der Microarrays erfolgt nach dem Scannen des Arrays unter Verwendung spezieller Auswertungssoftware. Die einzelnen Schritte

der Arrayherstellung und das Prinzip der Markierung der Nukleinsäuren werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

A 2.1 Herstellung der DNA-Microarrays

Derzeit stehen unterschiedliche Systeme zur Herstellung von DNA-Microarrays zur Verfügung. Zum einen kann die Herstellung durch Synthese der Oligonukleotide direkt auf dem Träger („On chip“) erfolgen und zum anderen durch Immobilisierung („Microspotting“) von vorab synthetisierter DNA. Die herkömmlichste „On chip“ Synthese ist die photolithographische Festphasensynthese. Auf den Glasträger aufgebraute photolabile Schutzgruppen dienen als Startpunkt für die gerichtete Oligonukleotidsynthese. Durch die Verwendung einer Reihe von verschiedenen photolithographischen Masken wird die ortsgebundene Synthese auf dem Glasträger ermöglicht. Durch direkte Bestrahlung werden die photolabilen Schutzgruppen an bestimmten Positionen entfernt, bei denen beispielsweise das Oligonukleotid mit einem Adenin beginnt. Der Glasträger wird im Anschluss mit Adenin geflutet, wobei Adenin an den ungeschützten Positionen auf dem Glasträger bindet. Um eine unkontrollierte Synthese zu verhindern, verfügt Adenin ebenfalls über Schutzgruppen. Die Entfernung der Schutzgruppen erfolgt erneut durch den Einsatz photolithographischer Masken. Diese Prozedur wird für alle Positionen der gewünschten Oligonukleotide wiederholt. Die Länge der Oligonukleotide ist durch die aufwändige Prozedur auf ca. 20-30 Nukleotide begrenzt [Müller und Röder, 2004; Schulze and Downward, 2001; Southern, 2001; Lipshutz *et al.*, 1999; Schena *et al.*, 1998]. Ein weiteres Verfahren für die Oligonukleotid-Festphasensynthese ist die Injekt-Technologie. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt durch sequentielle Applikation der einzelnen Phosphoramidite der Basen (A, G, C, T) an den gewünschten Microarray-Koordinaten (Spots) [Müller und Röder, 2004]. Bei der Deponierung vorgefertigter Oligonukleotide wird, je nach Länge der zu immobilisierenden Oligonukleotide, die Glasoberfläche gezielt modifiziert. Die Immobilisierung größerer DNA-Moleküle (>25 bp) kann unter Verwendung Aminomodifizierter bzw. Poly-L-Lysin-behandelter Glasoberflächen erfolgen. Auf Grund elektrostatischer Interaktionen zwischen den positiv geladenen Aminogruppen und den negativ geladenen Gruppen des DNA-Phosphatrückgrats erfolgt die Bindung der Oligonukleotide auf dem Microarray. Die kovalente Bindung zwischen dem Träger und kürzeren Oligonukleotiden wird durch das Anfügen einer Aminogruppe am 5´-Ende des Oligonukleotids ermöglicht. Über diese Aminomodifikation kann das Oligonukleotid an Aldehyd-modifizierte Oberflächen durch Bildung einer Schiff´schen Base (Iminbindung) gekoppelt werden [Southern, 2001; Lipshutz *et al.*, 1999; Schena *et al.*, 1998]. Das Aufbringen dieser Oligonukleotide erfolgt durch computergesteuerte Roboter

(Microarrayspotter), die in der Lage sind, sehr geringe Volumina mit hoher Präzision auf definierte Positionen der Biochipoberfläche zu transferieren. Das mechanische „Contact Microspotting“ wird grundsätzlich in drei verschiedene Methoden eingeteilt. Beim „Solid-Pin-System“ werden die Stahl-Spotter-Nadeln (Pin) in die Lösung der Makromoleküle eingetaucht und die Flüssigkeit anschließend auf den Array gespottet. Bei dem „Splitted-Pin-System“ ist die Spotter-Nadel mit einem Spalt versehen. Durch Adhäsion können unterschiedliche Volumina der Makromoleküllösung in den Spalt aufgenommen werden, wodurch ein mehrmaliges Spotten ermöglicht wird. Je nach Auflagefläche der Nadel können die erhaltenen Spottdurchmesser zwischen 30 und 200 µm variieren. Das „Ring and Pin“ Spotten (Pin) beruht darauf, dass nach Bildung eines Flüssigkeitsfilms durch Eintauchen einer Öse in die Makromoleküllösung die Nadel durch diesen Film gestoßen wird, die Flüssigkeit durch die Nadel aufgenommen und somit auf den Array überführt werden kann. Als alternative Spottingmethode zum mechanischen Aufspotten findet die „Piezo-Dispenser-Technologie“ (Nanospotting) Anwendung, bei der Makromoleküle in Form von Tropfen aus einem Schlauch gepresst und auf den Array aufgespritzt (dispensiert) werden [Müller und Röder, 2004; Schulze and Downward, 2001; Southern, 2001; Lipshutz *et al.*, 1999; Schena *et al.*, 1998]. Bei allen beschriebenen Spottingmethoden wird die genaue Deponierungsposition jedes einzelnen Spots durch spezifische Raster, den sogenannten „Grids“, definiert.

A 2.2 Markierung der Nukleinsäuren

Die Markierung der DNA erfolgt während der cDNA-Synthese aus mRNA oder Gesamt-RNA unter Einbau von markierten Nukleotiden. Mögliche Markierungsstrategien sind die Radioaktiv-, Fluoreszenz- oder Haptenmarkierung. Nach radioaktiver Markierung können keine Expressionsanalysen durchgeführt werden, da pro Microarray nur eine Probe hybridisiert werden kann. Die Markierung mittels Haptenen (Biotin oder Digoxigenin) findet zumeist bei der sekundären Markierung Anwendung. Bei der Fluoreszenzmarkierung werden Nukleotide, die mit Cyanin-Farbstoffen, z.B. cy2, cy3, cy5 markiert sind in bestimmten Verhältnissen mit nicht-markierten Nukleotiden für die cDNA-Synthese eingesetzt. Nachteilig hierbei sind die unterschiedlichen Einbau-effizienzen der markierten Nukleotide, da auf Grund der Kopplung der Fluorophore sich deren chemische Struktur und räumliche Ausdehnung verändert. Dieser Aspekt kann zum einen durch längere Belichtungszeiten des jeweiligen Kanals (cy3: 550 nm, cy5: 649 nm) und zum anderen durch eine entgegengesetzte Markierung und einem anschließenden Vergleich der beiden Microarrayexperimente ausgeglichen werden. Eine weitere Markierungsstrategie stellt der Einbau von Amino-Allyl-Derivaten dar. Die Amino-Allylnukleotide können in einem zweiten Schritt mit Succinimidyl-Ester der ent-

sprechenden Farbstoffe gekoppelt werden, wodurch eine kovalente Amidbindung zwischen Fluorophor und den zu markierenden Nukleinsäuren entsteht. Für Markierungen von RNA besteht zum einen die Möglichkeit der direkten Markierung durch chemische Kopplung von Haptenen an die RNA und zum anderen der Einbau markierter Nukleotide während der Synthese von copy-RNA (cRNA) [Müller und Röder, 2004, Schulze and Downward, 2001; Southern, 2001; Duggan *et al.*, 1999; Southern, 2001].

A 2.3 Detektion und Auswertung der Microarrays

Um die in der Microarraytechnologie verwendeten Fluorophore zu detektieren, bedarf es deren Anregung durch starke Lichtquellen, wie z. B. durch Laser („Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“). Der durch Exzitationsfilter, Lasersplitter und eine optische Linse geleitete, gebündelte und fokussierte Laserstrahl wird auf jeden aufgebrauchten DNA-Punkt (Spot) des Arrays gelenkt. Die Fluorophore absorbieren dieses Laserlicht (cy3: 550 nm, cy5: 649 nm) und emittieren längerwelliges Licht (cy3: 570 nm, cy5: 670 nm), welches wiederum durch eine optische Linse und den Lasersplitter geleitet und durch einen Umlenkspiegel über Emissionsfilter sowie eine Detektorlinse in den Photomultiplier-Tube (PMT) geleitet wird. In dem PMT erfolgt eine Umwandlung des elektromagnetischen Lichtes in ein analoges, elektrisch verstärktes Signal. Das analog verstärkte Stromsignal gelangt vom PMT in den „Analog-to-Digital-Konverter“ und wird hier in ein digitales Signal umgewandelt. Dadurch entsteht ein digitales Abbild des Arrays. Um mehrere Fluorophore, z. B. cy3 und cy5, zu detektieren, werden mehrere Laser, Filter und PMT's mit spezifischen Wellenlängen verwendet. Der Microarrayscanner liefert somit nach dem Scannvorgang die Fluoreszenzintensitäten der beiden Kanäle und generiert die Primärinformation (Rohdaten) des gesamten Arrays in Form einer Bilddatei („Tiff-File“). Die Hybridisierungssignale (Fluoreszenzintensität) einzelner Gene können auf Grund unterschiedlicher Expressionsstärken variieren, d.h. auf einem Array müssen sowohl sehr schwache als auch sehr starke Signale detektiert werden. Werden nur die Spots mit schwachen Signalen fokussiert, befinden sich die Spots mit den stärkeren Signalen bereits im Bereich der Sättigung und eine quantitative Auswertung ist nicht mehr möglich. Werden hingegen nur die Spots mit starken Signalen detektiert, ist die Intensität der Spots mit den schwachen Signalen nicht größer als die des Hintergrundes. Daraus resultiert eine Mehrfachmessung der Microarrays mit kürzeren Belichtungszeiten für stärkere Spots und längeren Belichtungszeiten für schwächere Spots [Müller und Röder, 2004]. Um die Rohdaten optimal auszuwerten, werden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit dem ursprünglichen Spot-Muster (Grid) verknüpft. Verschiedene Firmen bieten

hierfür entsprechende Auswertungssoftware („Tracking Software“ oder „txt-File“) an, in denen die Struktur und Zuordnung der Spots in Reihen und Spalten sowie Anzahl, Durchmesser der Spots und Abstand zueinander angegeben sind, um ein Grid erzeugen zu können. Ein wichtiger Teil bei der Auswertung der Arraydaten ist die Spoterkennung. Das tatsächliche Signal muss von seinem Hintergrund klar getrennt werden, um dadurch eine genaue Analyse zu ermöglichen. Deshalb wird für jeden Spot ein Bereich (Kreis) definiert, der den eigentlichen Spotdurchmesser repräsentiert. Die Angaben für die Spotdurchmesser sind ebenfalls in der Auswertungssoftware enthalten. Nach dem Vorgang der Spoterkennung werden nur die Signale, die sich innerhalb der Kreise befinden, als Signal (Spot) und die, die sich außerhalb befinden, als Hintergrund interpretiert. Der Hintergrundwert sollte so gering wie möglich sein, um ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis („Signal-to-noise ratio“= SNR) zu erhalten [Müller und Röder, 2004]. Nachdem für jeden Spot die Signalintensitäten ermittelt wurden, kann die Analyse der Arraydaten bezüglich der jeweiligen Fragestellung unter Verwendung kommerziell erhältlicher Software erfolgen.

A 2.4 Anwendung der Microarraytechnologie

Mit Hilfe der Microarraytechnologie ist es u. a. möglich, parallel und gleichzeitig in nur einem Experiment das Expressionsprofil tausender Gene zu detektieren und zu analysieren. Diese fokussierte, differentielle Expressionsanalyse beschreibt wahrscheinlich die gebräuchlichste Form der Microarrayexperimente. Die gleichzeitige Quantifizierung von mRNA-Transkripten ermöglicht detaillierte Einblicke und Erkenntnisse über die Regulation von Genexpressionen in zellulären Prozessen [Snyder *et al.*, 2004; Joos *et al.*, 2003; Grifantini *et al.*, 2002]. Durch die Arraytechnologie kann das Verständnis über Signalnetzwerke innerhalb der Zelle sowie die molekulare Basis und Klassifizierung von Krankheiten erweitert werden. Die Verwendung von Microarrays erlaubt ferner eine Identifizierung von Variationen in der genomischen DNA, wie Insertionen, Punktmutationen oder Deletionen sowie eine Untersuchung von Einzelnucleotidaustauschen (Single Nucleotide Polymorphism) in bestimmten Gen-Orten [Bryant *et al.*, 2004; Grimm *et al.*, 2004]. Ein weiterer wichtiger Ansatz sind die Untersuchungen zur Interaktion zwischen Wirtszelle und pathogenem Organismus. Vor und nach einer Infektion werden differentielle Expressionsanalysen sowohl von der Wirtszelle als auch von dem Erreger analysiert [Dahan *et al.*, 2004; Grifantini *et al.*, 2002; Cummings and Relman, 2000]. Die DNA-Microarraytechnologie findet ebenfalls Anwendung in der Diagnostik, insbesondere bei der Analyse von DNA-Bestandteilen z. B. von Virulenzfaktoren, der Identifizierung neuer pathogener Organismen und der Evolution von Mikroorganismen [Grimm *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Dobrindt *et al.*,

2003; Wang *et al.*, 2002; Chizhikov *et al.*, 2001]. Mit Hilfe von Proteinchips können beispielsweise Protein-DNA-Interaktionen oder auch Bindungsdomänen von Antikörpern genauer charakterisiert werden. Die genannten Anwendungen der Microarraytechnologie zeigen nur ein kleines Spektrum auf. Die fortwährende Weiterentwicklung der Microarrays und der Arraytechnologie offeriert immer mehr experimentelle Möglichkeiten, auf die im Weiteren aber nicht genauer eingegangen werden soll.

A 2.5 *E. coli* O157 Array

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde der kommerziell erhältliche *E. coli* O157 Array der Firma MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg) verwendet. Für das Design und die Synthese von den, auf dem Array befindlichen Oligonukleotiden wurden die vollständig sequenzierten Genome von *E. coli* K-12 Stamm MG1655, *E. coli* O157:H7 Stamm RIMD0509952 und *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 zu Grunde gelegt. Diese Stämme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Einige Gene kommen gleichzeitig in allen drei Stämmen vor, andere nur in zwei oder einem Stamm. Aus der Gesamtheit der Gene der drei Stämme wurde deshalb die Schnittmenge gebildet. Die Zusammensetzung und das Oligonukleotid-design des Arrays sind in Abbildung A 2 dargestellt. Die auf dem Array befindlichen Oligonukleotide repräsentieren den Genpool von *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 und *E. coli* O157:H7 EDL933. Der O157 Array setzt sich aus 6176 50-mer Oligonukleotiden zusammen, welche spezifisch für 4288 Gene des *E. coli* K-12 Stamms MG1655, 5358 Gene des *E. coli* O157:H7 Stamms RIMD0509952 und 5336 Gene des *E. coli* O157:H7 Referenzstamms EDL933 sind. Dabei stellen 3768 Oligonukleotide all die Gene dar, die in allen drei Stämmen vorkommen, 1182 Oligonukleotide repräsentieren die Gene, die nur bei EDL933 und RIMD0509952, 48 Oligonukleotide die Gene, die nur bei K-12 und RIMD0509952 und 51 Oligonukleotide die Gene, die nur in K-12 und EDL933 vorkommen (Abbildung A 2). Weitere 578 Oligonukleotide sind charakteristisch für die Gene, die nur in *E. coli* K-12 existieren, 237 Oligonukleotide für die Gene, die nur in *E. coli* EDL933 und weitere 312 Oligonukleotide für die Gene die nur in *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 vorhanden sind. Die immobilisierten Oligonukleotide sind somit spezifisch für die offenen Leserahmen (open reading frames) für alle 3 Stämme gleichzeitig, für 2 Stämme oder nur für einen Stamm. Die Abkürzung Z (*E. coli* O157:H7 Stamm EDL933), Ecs (*E. coli* O157:H7 Stamm RIMD0509952) und B (*E. coli* K-12 Stamm MG1655) beschreiben die für den jeweiligen Stamm eindeutigen Oligonukleotide (Abbildung A 2).

Des Weiteren sind auf dem *E. coli* O157 Array 92 DNA-Spots doppelt immobilisiert („replicated spots“, Replica). Diese Spots fungieren als Positivkontrollen. In Folge einer

Hybridisierung müssen sowohl der jeweilige Spot als auch sein dazugehöriger „Replica-Spot“ ein positives Hybridisierungssignal aufweisen.

Ferner befinden sich auf dem O157 Array 68 Oligonukleotide, die charakteristisch für Gene von *Arabidopsis thaliana* sind. Diese immobilisierten Oligonukleotide fungieren als Negativkontrollen, da markierte *E. coli* cDNA an diese Spots nicht binden. In der Summe ergibt sich eine Gesamtspotanzahl von 6336 auf dem O157 Array.

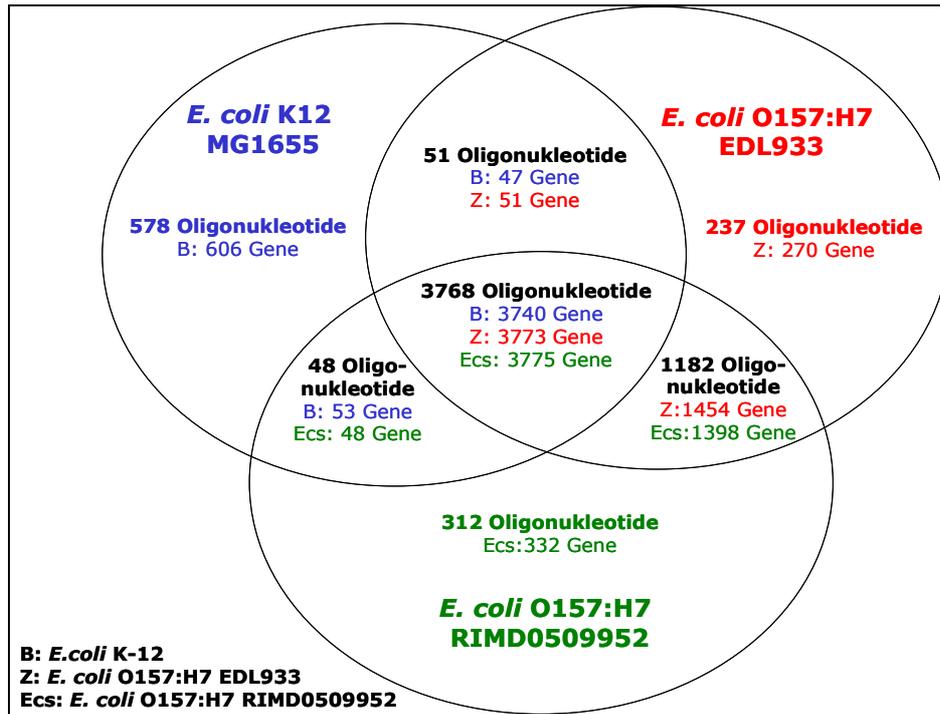


Abbildung A 2: Zusammensetzung des *E. coli* O157 Arrays aus den Genen der drei Stämme *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und *E. coli* O157:H7 RIMD0509952. Die Schnittmenge der Gene, die in allen drei Stämme vorkommen, werden durch 3768 Oligonukleotide dargestellt. Einundfünfzig Oligonukleotide stellen Gene von *E. coli* MG1655 und EDL933, 1182 Oligonukleotide von EDL933 und RIMD0509952 und 48 Oligonukleotide von MG1655 und RIMD0509952 dar. Die verbleibenden Oligonukleotide repräsentieren Gene, die nur in einem der drei Stämme vorkommen.

A 3 Enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Die Identifizierung der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) als pathogene *E. coli* resultiert aus epidemiologischen Beobachtungen von zwei Ausbrüchen in Amerika im Jahre 1982. Infolge des Verzehrs von Hamburgerfleisch beschrieben Riley *et al.* [1983] charakteristische gastrointestinale Erkrankungen mit massiven abdominalen Schmerzen und wässriger bis blutiger Diarrhoe. Dieses als hämorrhagische Colitis (HC) bezeichnete Krankheitsbild wurde durch *E. coli* O157:H7, ein bis dahin selten nachgewiesener Serotyp, hervorgerufen. Isoliert wurde *E. coli* O157:H7 sowohl aus dem Stuhl der Patienten als auch aus dem Hackfleisch.

Die Einteilung von *E. coli* erfolgt auf Grund ihrer unterschiedlichen serologischen Spezifität. Basis für die Einordnung sind die in der Außenmembran von *E. coli* verankerten Lipopolysaccharide (LPS) mit ihren O-spezifischen Seitenketten. Diese O-spezifischen Seitenketten bestehen aus einer Kette sich wiederholender Oligosaccharideinheiten und unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, ihrer Sequenz und der Art ihrer Bildung. Derzeit sind 181 verschiedene Serovare von *E. coli* bekannt [Scheutz *et al.*, 2004].

Bereits 1982 assoziierten Karmali *et al.* [1983b] das hämolytisch-urämische Syndrom mit einem aus Stuhlproben isolierten Zytotoxin bzw. einem Zytotoxin-produzierenden *E. coli* Stamm. Da dieses Toxin dem von *Shigella dysenteriae* Typ I produzierten Toxin sehr ähnlich war und einen zytopathischen Effekt auf Vero-Zellen („African green monkey kidney cell“) ausübte, wurden die von *E. coli* produzierten Zytotoxine als Shiga-like Toxine (Stx) oder synonym als Verozytotoxin bezeichnet [O'Brien *et al.*, 1983a; O'Brien *et al.*, 1982; O'Brien and LaVeck, 1983]. O'Brien *et al.* [1983b] zeigten, dass viele mit einer Diarrhoe assoziierten Erkrankungen auf *E. coli* Stämme mit der Fähigkeit zur Bildung von Shiga-like Toxinen zurückzuführen waren. Des Weiteren postulierten O'Brien *et al.* [1983a], dass es sich bei dem Shiga-like Toxin und Verotoxin um ein und das selbe Toxin handelte und auch der von Riley *et al.* [1983] isolierte *E. coli* O157:H7 in der Lage war, Shiga Toxin zu produzieren.

Sowohl die Nomenklatur Verozytotoxin-produzierende *E. coli* (VTEC) als auch Shiga Toxin- (Shiga-like Toxin) produzierende *E. coli* (STEC) bezeichnen die *E. coli* Stämme, die ein oder mehrere Shiga Toxine produzieren.

Karmali *et al.* [1983a; 1983b] führten auf, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Auftreten des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) und einer Infektion mit STEC besteht. In weiteren Studien wurde dargelegt, dass allein die Fähigkeit zur Bildung von Shiga Toxinen nicht in jedem Falle ausreicht, um Erkrankungen beim Menschen auszulösen. Die Entwicklung von Krankheitsbildern erfordert mehrere Patho-

genitätsfaktoren. Dieser Sachverhalt führte zu einer neuen Definition darmpathogener *E. coli*. EHEC umfassen alle die humanpathogenen *E. coli*, die ein HC oder ein HUS verursachen, Shiga Toxine exprimieren, A/E-Läsionen an Epithelzellen ausbilden und das 60-MDa Plasmid, welches das EHEC-Hämolyisin kodiert, besitzen (A 3.1.6.4). Die EHEC bilden somit eine Untergruppe der STEC [Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998]. Zunehmende Bedeutung als Erreger des HUS und der HC gewinnen immer häufiger non-O157 STEC der Serogruppen O26-, O103-, O111-, O113- und O145 [Karch *et al.*, 1999a; Griffin and Tauxe, 1991; Schmidt *et al.*, 1999b]. In einer 2004 veröffentlichten Studie des Robert Koch Institutes (RKI) konnten 15% der aus Patienten isolierten STEC der Serogruppe O157 zugeordnet werden. Hingegen gehörten 21% der STEC der Serogruppe O103 und 11% der Serogruppe O26 an [Robert Koch Institut, 2004].

A 3.1 Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli*

A 3.1.1 Reservoir der Shiga Toxin-produzierenden *E. coli*

Landwirtschaftliche Nutztiere, insbesondere Rinder gelten als Hauptreservoir der STEC [Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998; Orskov *et al.*, 1987]. Anhand von epidemiologischen Bestandsaufnahmen wird deutlich, dass STEC ebenso im Gastrointestinaltrakt von Schafen, Ziegen [Zschock *et al.*, 2000], Schweinen [Leung *et al.*, 2001] und Hunden [Sancak *et al.*, 2004] vorkommen und darüber hinaus auch bei Tauben [Morabito *et al.*, 2001], Möwen [Makino *et al.*, 2000], Kaninchen [Garcia and Fox, 2003], Staren und Ratten [Nielsen *et al.*, 2004] gefunden wurden. Kolonisationsraten mit *stx*-positiven *E. coli* Stämmen von bis zu 60%, meist jedoch zwischen 10-25%, wurden in Rinderherden beschrieben [Nataro and Kaper, 1998]. In der Regel erfolgt die Kolonisation von STEC bei landwirtschaftlichen Nutztieren ohne erkennbare Krankheitsbilder. Einige STEC sind jedoch in der Lage, bei Kälbern Diarrhoe auszulösen [Paton and Paton, 1998]. Infektion mit *stx*_{2e}-produzierenden *E. coli* Stämmen (A 3.1.6.1) können bei Schweinen zu einer Ödemkrankheit führen, die sich mit Ödembildungen im Bereich von Augen, Darm und Bauchraum manifestiert und von Lähmungserscheinungen und Krämpfen gefolgt wird [Paton and Paton, 1998].

Das Vorkommen von STEC in Nahrungsmitteln, vor allem tierischer Herkunft, und deren Herstellung stehen in einem engen Zusammenhang. Während des Schlachtvorganges und der weiteren Verarbeitung der Fleischerzeugnisse besteht die Gefahr, dass das Nahrungsmittel mit tierischen Exkrementen bzw. Darminhalten des Tieres verunreinigt werden und dies zu Kontaminationen mit STEC führen kann. In einer kanadischen Untersuchung wurden zwischen 4-16% der untersuchten Fleischproben (lokale

Herkunft und importierte Ware) STEC-positiv bewertet und in einer in Palästina (Israel) durchgeführten Studie wurden in 44 von 300 (14,7%) untersuchten unverarbeiteten Rindfleischproben STEC identifiziert. Dem Serotyp O157 konnten 27,3% der STEC zugeordnet werden; bei 70,5% der STEC wurden sowohl *stx*₁ als auch *stx*₂ (A 3.1.6.1) gefunden [Adwan and Adwan, 2004]. Samadpour *et al.* [1994] identifizierten non-O157 STEC in Rindfleisch (23%), Schweinefleisch (4%), Lammfleisch (48%), Kalbsfleisch (63%), Hühnerfleisch (12%) und Putenfleisch (7%).

A 3.1.2 Infektionsdosis und Ausscheidungsdauer

Anhand von Untersuchungen der STEC-Ausbrüche wird die Infektionsdosis bei STEC-Infektionen, ähnlich wie bei Infektionen mit Shigellen, als sehr gering eingestuft. Zwischen 100 und 200 Organismen reichen wahrscheinlich aus, um eine Infektion mit EHEC auszulösen [Nataro and Kaper, 1998]. In einer Studie von Tilden, *et al.* [1996] wird eine Infektionsdosis von weniger als 50 *E. coli* O157:H7 Bakterien nach Verzehr von STEC-kontaminierter Salami diskutiert.

Die Dauer der Ausscheidung von STEC im Stuhl der Patienten variiert stark. Bei 66% der mit STEC infizierten Patienten konnten 7 Tage nach Beginn der Diarrhoe ohne Antibiotikatherapie keine STEC mehr nachgewiesen werden [Nataro and Kaper, 1998]. In weiteren Berichten wird eine Ausscheidungsdauer zwischen 2 und 62 Tagen bei dem Krankheitsbild einer hämorrhagischen Colitis bzw. 5-124 Tage bei dem Vollbild eines HUS angegeben [Nataro and Kaper, 1998; Karch *et al.*, 1995]. Die mittlere Ausscheidungsdauer wird mit 21 Tagen bei Patienten mit einem ausgeprägtem HUS und 13 Tage bei Patienten mit Durchfällen und HC aufgeführt [Karch *et al.*, 1995].

A 3.1.3 Übertragung der STEC

Drei wesentliche Infektionswege mit STEC lassen sich auf Grund von epidemiologischen Studien und Ausbrüchen beschreiben. Ausgehend von den Untersuchungen zum Vorkommen von STEC in Fleischrohzeugnissen erfolgt die Hauptübertragung durch STEC kontaminierte Nahrungsmittel. Ebenso kann eine Übertragung von STEC durch Mensch-Mensch- und Tier-Mensch-Kontakt erfolgen. Die Mehrzahl von Ausbrüchen mit STEC O157 ist auf den Verzehr von Nahrungsmitteln bovinen Ursprungs, insbesondere von Rinderhack, Hamburgern und unzureichend gegartem Rindfleisch zurückzuführen [Kassenborg *et al.*, 2004; Slutsker *et al.*, 1998]. Beschrieben wurden ebenso Ausbrüche mit STEC nach Verzehr von Rohmilchkäse bzw. Käsebruch [Altekruse *et al.*, 1998], Rohmilch [Liptakova *et al.*, 2004] und Salami [MacDonald *et al.*, 2004]. Massa *et al.* [1999] zeigten, dass EHEC trotz Lagerung bei 4°C in Rohmilch überleben bzw. sich die KBE/ml im Verlauf von 17 Tagen sogar erhöhen kann.

STEC Übertragungen können durch Nahrungsmittel nicht-boviner Herkunft erfolgen, z. B. durch den Verzehr von Ziegenrohmlch [McIntyre *et al.*, 2002] und Hirschfleisch [Keene *et al.*, 1997]. Auf Grund möglicher fäkaler Kontaminationen während des Anbaus, der Lagerung und des Verarbeitungsprozesses besteht ebenso die Möglichkeit einer Übertragung von STEC durch rohes Obst und Gemüse. Ausbrüche wurden nach Verzehr von rohem Salat (Blattsalat) [Ackers *et al.*, 1998], Rettichsprossen [Michino *et al.*, 1999], Alfalfasprossen [Mohle-Boetani *et al.*, 2001; Breuer *et al.*, 2001] und frisch gepresstem, nicht pasteurisierten Apfelsaft [Besser *et al.*, 1993] beschrieben.

In einer Reihe von Studien wurde ferner die Aufnahme von Trinkwasser, das Baden in nicht-chlorierten Schwimmbädern und in Frischwasserseen als Risikofaktor für eine Infektion mit STEC aufgeführt. Grund hierfür sind fäkale Verunreinigungen der Badegewässer durch Exkremate von Menschen, Rindern oder Wild [Feldman *et al.*, 2002; Slutsker *et al.*, 1998; Brewster *et al.*, 1994; Keene *et al.*, 1994; Swerdlow *et al.*, 1992]. Bei niedrigen Temperaturen können *E. coli* O157:H7 mehrere Wochen in Gewässern persistieren [Wang and Doyle, 1998].

Die Eigenschaft, sich an niedrige pH-Werte anzupassen ermöglicht es ihnen, in vielen sauren Lebensmitteln zu überleben [Paton and Paton, 1998]. Auf Grund der niedrigen Infektionsdosis besteht ferner die Möglichkeit der Übertragung einer STEC-Infektion durch Mensch-Mensch- bzw. Tier-Mensch-Kontakt. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt meist durch mangelnde Hygiene, zum einen direkt durch Händekontakt, oder aber auch indirekt durch verschmutztes Badewasser (Schwimmbäder). In dem 2004 erschienenen Epidemiologischen Bulletin des RKI wurde das Spielen im Sandkasten und eine mögliche Übertragung von STEC durch Schmierinfektionen bei Personen jünger als 9 Jahre diskutiert [Robert Koch Institut, 2004]. Ebenso sind STEC-Ausbrüche durch Schmierinfektionen in Kindertagesstätten, Pflegeheimen, Krankenhäusern und in Familien beschrieben worden [Hiruta *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 1997; Karch *et al.*, 1995; Belongia *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1987]. Immer mehr an Bedeutung gewinnt die Übertragung von STEC durch den Tier-Mensch-Kontakt. Einige der dokumentierten Fälle beruhen auf den Besuchen von Streichelzoos bzw. Bauernhöfen und dem damit verbundenen Tierkontakt sowie einer unzureichenden Hygiene [Heuvelink *et al.*, 2002]. Für Kinder unter 3 Jahren ist laut der 2004 veröffentlichten Studie des RKI der direkte Kontakt mit Wiederkäuern der größte Risikofaktor für eine STEC Erkrankung [Robert Koch Institut, 2004].

Rangel *et al.* [2005] führten in ihrer Zusammenstellung aller in den USA von 1982-2002 durch die „Centers of Disease Control and Prevention“ (CDC) dokumentierten *E. coli* O157 Ausbrüche (350 Ausbrüche) auf, dass kontaminierte Nahrungsmittel in 52% der Ausbrüche die Ursache für eine Infektion mit *E. coli* O157 darstellen. In die-

ser Studie wurde jedoch auch deutlich, dass die Infektion mit *E. coli* O157 durch Tierkontakt und Schmierinfektionen immer mehr an Bedeutung gewinnt. Demnach erfolgte in 14% der Ausbrüche eine Übertragung durch Schmierinfektionen und in 3% durch Tierkontakt. Eine Infektion durch kontaminiertes Badewasser bzw. Trinkwasser konnte in 6% bzw. 3% der Ausbrüche verzeichnet werden [Rangel *et al.*, 2005].

Ausgehend von den Übertragungswegen und dem Reservoir der STEC müssen grundsätzlich strikte Hygienevorschriften bezüglich der Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Nahrungsmitteln vom Hersteller bis hin zum Endverbraucher eingehalten werden. Den Nahrungsmittelbetrieben obliegt eine Einschränkung jeglicher Infektionsrisiken durch betriebsinterne Regelungen auf der Basis eines HACCP-Konzepts (Hazard Analysis Critical Control Point Concept) als vorbeugendes Sicherheitssystem. Durch das betriebliche Eigenkontrollsystem und die Einhaltung von produktspezifischen Hygienevorschriften durch den Hersteller sowie Betriebskontrollen und Probenahmen durch die amtliche Lebensmittelüberwachung soll gewährleistet werden, dass das Infektionsrisiko minimiert wird.

Schwangere, Säuglinge, Kleinkinder und ältere Menschen, die durch EHEC-Infektionen besonders gefährdet sind, sollten Lebensmittel tierischer Herkunft nicht roh verzehren. Lagerungsvorschriften und Garzeiten von Lebensmitteln müssen strikt eingehalten werden. Verdacht und Erkrankung an HUS sowie nachgewiesene Ausscheidungen von EHEC sind nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes in Deutschland meldepflichtig.

A 3.1.4 Krankheitsbilder und Therapie von STEC-Infektionen

Bei Erwachsenen verlaufen EHEC-Infektionen in 80% der Fälle als wässrige Durchfallerkrankung. Hingegen können bei Kleinkindern, Säuglingen, alten Menschen und Abwehrgeschwächten lebensbedrohliche Krankheitsbilder nach einer Infektion mit STEC beobachtet werden. Die Inkubationszeit beträgt in Abhängigkeit von der Infektionsdosis ca. ein bis drei Tage, kann aber auch bis zu acht Tage umfassen. Die Erkrankung beginnt mit wässrigem Durchfall, der sich im weiteren Verlauf bei einem Teil der Patienten (etwa 20%) zu einer blutig-wässrigen Colitis (hämorrhagische Colitis, HC) mit Begleitsymptomen wie Bauchschmerzen und insbesondere bei Kindern, mit Fieber, Übelkeit und Erbrechen weiterentwickeln kann. Als wohl wichtigste extraintestinale, lebensbedrohliche Komplikation kann sich vor allem bei Kindern unter sechs Jahren und älteren Menschen in ca. 5-10% der Fälle ein hämolytisch-urämisches Syndrom ausbilden. Charakteristisch für dieses Krankheitsbild sind Thrombozytopenie, hämolytische Anämien und akutes Nierenversagen. Die Letalität bei HUS-Erkrankungen ist besonders im Kindesalter mit 1-5% relativ hoch. Bei Überlebenden kann das HUS zu einem terminalen Nierenversagen führen und eine Dialysepflichtig-

keit bis hin zur Nierentransplantation zur Folge haben. Die ebenfalls durch EHEC verursachte thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), bei der eine neurologische Manifestation im Vordergrund steht, tritt fast nur im Erwachsenenalter auf. Das Krankheitsbild der TTP ist ähnlich dem des HUS, ferner werden Hautblutungen und neurologische Veränderungen beobachtet [Karmali *et al.*, 2004; Thorpe, 2004; Karch *et al.*, 2000; Robert Koch Institut, 1999; Griffin and Tauxe, 1991; Karmali, 2004].

In einer Reihe von *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von *E. coli* O157 mit speziellen Antibiotika eine erhöhte Stx-Produktion bewirkt [Kimmitt *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Matsushiro *et al.*, 1999; Yoh *et al.*, 1999; Walterspiel *et al.*, 1992]. Wong *et al.* [2000] zeigten in ihrer Studie, dass eine Antibiotikatherapie bei Kleinkinder mit einer EHEC-Infektion ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung des HUS zur Folge hat. In weiteren Studien wurde ebenfalls aufgeführt, dass eine Antibiotiktherapie bei Patienten mit einer EHEC-Infektion keine verbesserten Heilungschancen erwirkte, vielmehr wurde in einigen Fällen beobachtet, dass sich die Krankheitssymptome verschlimmerten [Bell *et al.*, 1997; Dundas *et al.*, 2001]. Die Mechanismen, weshalb eine Antibiotikatherapie eine Ausbildung des HUS fördert, sind noch unklar. Die *in vitro* Versuche zeigten, dass Antibiotika eine Phageninduktion bedingt, ferner die Bakterienzellen lysiert werden sowie eine erhöhte Stx-Produktion hervorgerufen wird [Kimmitt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Matsushiro *et al.*, 1999; Yoh *et al.*, 1999]. Beim gastroenteritischen Verlauf einer EHEC-Infektion wird eine antibiotische Therapie deshalb nach wie vor kritisch diskutiert, da durch Gabe von Antibiotika extraintestinalen Komplikationen hervorrufen werden könnten und somit sich das Risiko für die Ausbildung eines HUS erhöhen könnte [Tarr *et al.*, 2005; Kimmitt *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000].

Neue therapeutische Ansätze sind auf die Inhibition der Aufnahme und Translokation der Stx im Darm ausgerichtet; unter anderem durch den Einsatz des Rezeptors Globotriaosylceramid (Gb3), der wahrscheinlich die höchste Affinität zu Stx hat. Ziel dabei ist es, frühzeitig die Toxine im Gastrointestinaltrakt zu binden und auszuscheiden. Die Ergebnisse einer randomisierten doppelblinden, placebokontrollierten Studie in Kanada und den Vereinigten Staaten zeigten jedoch, dass durch orale Gabe des Stx-bindenden Wirkstoffs SYNSORB Pk die Schwere der Erkrankung bei Patienten mit einer HUS assoziierten Diarrhoe nicht verringert wurde [Thorpe, 2004; Tzipori *et al.*, 2004; Trachtman *et al.*, 2003]. Shiga Toxin-neutralisierende monoklonale Antikörper wurden in einer Reihe von Tierversuchen erfolgreich getestet. Ob Antikörper auch beim Menschen für therapeutische Zwecke eingesetzt werden können, ist noch nicht ausreichend untersucht [Thorpe, 2004; Tzipori *et al.*, 2004]. Die Behandlung von EHEC-

Infektionen kann somit nur symptomatisch erfolgen und beinhaltet in erster Linie die Gabe von Flüssigkeit und Elektrolyten.

A 3.1.5 Diagnostik von STEC-Infektionen

In der frühen Phase einer Infektion können STEC einen Anteil von bis zu 90% der aeroben Darmflora im Stuhl einnehmen. Nach dem Eintreten der postinfektiösen Syndrome HUS und HC, wenige Tage nach Beginn oder kurz nach Besserung der Durchfälle, verringert sich der STEC-Anteil [Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998]. Aus diesem Grund werden an die Diagnostik hohe Anforderungen hinsichtlich der Sensitivität gestellt. Der Schwerpunkt wird auf die Untersuchung und Detektion der Shiga Toxine ausgerichtet. Das Methodenspektrum für den Nachweis von STEC umfasst u. a. den Zellkultur-Zytotoxizitätstest, bei dem der zytopathische Effekt der Stx auf Verozellen untersucht wird und die direkte Detektion von Stx1 und Stx2 (A 3.1.6.1) mittels monoklonaler oder polyklonaler Antikörper über ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Ferner können die *stx*-Gene mittels Polymerasekettenreaktion aus Einzelkolonien oder Stuhlproben detektiert oder mittels Kolonienhybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden nachgewiesen werden. Serologische Nachweisverfahren, z. B. mittels ELISA, von Stx- und LPS-Antikörpern im Serum der Patienten werden empfohlen, da ein Nachweis von EHEC im Stuhl von bereits an HUS erkrankten Patienten in 30% der Fälle nicht mehr möglich ist [Karch *et al.*, 2000; Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998].

Im Rahmen einer Primärdiagnostik hat der Arbeitskreis „EHEC“ des RKI und das Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung) einen Stufenplan als diagnostisch erprobtes Untersuchungsverfahren empfohlen [Fruth *et al.*, 2000]. Die Stuhlprobe wird hierfür einem einfachen Screeningverfahren zum Nachweis der STEC unterzogen, wobei der Nachweis der Toxine auf einer 18-stündigen selektiven Anreicherung der EHEC bei 37°C in einem kommerziell erhältlichen Kulturmedium und einem anschließenden ELISA aus diesem Kulturüberstand basiert. Beim Vorliegen eines ELISA-positiven Befundes wird eine Bestätigung mittels PCR und die Isolierung, Charakterisierung und Differenzierung des Erregers empfohlen. Die sich anschließenden Feintypisierungen hinsichtlich Virulenzeigenschaften, Antibiotika-Resistenztestung und Serotyp der EHEC-Isolate obliegt den zuständigen nationalen Referenzzentren. Ein standardisiertes Nachweisverfahren und eine Isolierung von STEC aus Lebensmitteln (Hackfleisch) wird durch §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes geregelt. Nach einer Voranreicherung, Anreicherung und Probenaufarbeitung mit anschließender PCR, erfolgt im Falle eines positiven PCR-Resultates eine Isolation der STEC durch DNA-Hybridisierung so-

wie eine Charakterisierung der Isolate durch PCR und Restriktion der Amplifikate [Amtliche Sammlung §35 Methode: 2002].

A 3.1.6 Pathogenitätsfaktoren der STEC

A 3.1.6.1 Shiga Toxine und Shiga Toxin-konvertierende Bakteriophagen

Der Hauptvirulenzfaktor und das wichtigste Charakteristikum der STEC ist die Fähigkeit, Shiga Toxine (Stx) zu produzieren. Bei den Stx handelt es sich um eine Gruppe von potenten bakteriellen Zytotoxinen, die für schwerwiegende Krankheitssymptome bei Menschen und Tieren mit einer STEC Infektion verantwortlich sind. Die Gruppe der Stx unterteilt sich in zwei serologisch unterschiedliche Toxin-Gruppen, die als Stx1 und Stx2 bezeichnet werden [O'Brien and Holmes, 1987]. Zu der heterogenen Stx2-Gruppe zählen neben dem klassischen Stx2 die Varianten Stx2c [Schmitt *et al.*, 1991], Stx2c2 [Jelacic *et al.*, 2003], Stx2d [Melton-Celsa *et al.*, 1996], Stx2e [Weinstein *et al.*, 1988], Stx2f [Schmidt *et al.*, 2000] und Stx2g [Leung *et al.*, 2003]. Die Gruppe der Stx1 galt lange Zeit als hochkonserviert. Zhang *et al.* [2002] identifizierten jedoch 2002 eine Stx1-Variante (Stx1c) und Burk *et al.* [2003] eine Stx1d-Variante.

Der fundamentale Aufbau der Toxine ist für Stx1 und Stx2 gleich. Shiga Toxine setzen sich aus einer A-Untereinheit (32 KDa), die wiederum aus 2 kleinen über Disulfidbrücken verknüpften Untereinheiten (A_1 28 KDa und A_2 4 KDa) besteht, und 5 B-Untereinheiten (je 7,7 KDa) zusammen. Die A_1 -Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum und die A_2 -Untereinheit gewährleistet die Bindung an die 5 B-Untereinheiten. Die B-Untereinheiten formen einen pentamerischen Ring, der die A-Untereinheit am C-Terminus umzirkelt. Die B-Untereinheit bindet das Toxin spezifisch an die auf der Zelloberfläche der eukaryontischen Zellen befindlichen Glykolipidrezeptoren (Gb3, Globotriaosylzeraamid). Gb3 ist der Hauptrezeptor der Stx; nur die Toxin-Variante *stx*_{2e} bevorzugt die Bindung an den Gb4-Rezeptor. Nach der Rezeptorbindung erfolgt die Endozytose und der Transport des Holotoxins zum Golgi-Apparat und weiter zum endoplasmatischen Retikulum. Während dieser Phase erfolgt eine Spaltung der A-Untereinheit durch eine membrangebundene Protease in die katalytische aktive A_1 -Untereinheit und A_2 -Untereinheit. Die freiwerdende A_1 -Untereinheit fungiert als rRNA *N*-Glykosidase und spaltet die *N*-glykosidische Bindung der eukaryontischen 28S rRNA der 60S ribosomalen Untereinheit [Endo *et al.*, 1988]. Infolgedessen wird die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die ribosomale 60S-Untereinheit unterbunden und eine Elongation der Peptidkette verhindert. Dies führt unweigerlich zur irreversiblen Hemmung der Proteinbiosynthese und letztlich zum Tod der eukaryontischen Zelle.

Nach der Produktion der Stx im Darm erfolgt deren Transport in intakter Form in den Blutkreislauf. Dieser Mechanismus ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach Te Loo *et al.* [2001] bindet das Toxin im Blutkreislauf an polymorphkernige Leukozyten und wird durch diese in die einzelnen Organe, u. a. in die Niere transportiert. Die Zerstörung der Endothelzellen ist das Hauptmerkmal der Pathogenese des HUS und wird durch die direkte Bindung von Stx an die Gb3-Rezeptoren der Endothelzellen vermittelt [Karmali, 2004; Louise and Obrig, 1995]. Wenngleich die Endothelzellen das Hauptziel der Stx sind, werden auch noch weitere biologische Effekte durch die Interaktion der Toxine mit anderen Zelltypen, wie Tubuluszellen und Mesangiumzellen der Nieren sowie Monozyten beobachtet [Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998; Louise and Obrig, 1995]. Bei Patienten mit HUS steigt im Blut der Anteil an proinflammatorischen Zytokinen, besonders des Tumornekrosefaktors- α und des Interleukins-1 β (IL-1 β) infolge der direkten Wirkung des Toxins an den Monozyten [van Setten *et al.*, 1996]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zytokine die Expression der Gb3-Rezeptoren induzieren und so einen Einfluss auf die Aktion und Wirkung von Stx an den Endothelzellen haben [van de Kar *et al.*, 1992]. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass Zytokine im Krankheitsprozess eine Funktion ausüben. Um den direkten Einfluss dieser Mediatoren auf die Pathogenese der STEC-Infektion zu klären, bedarf es noch weiterführender Studien [Karmali, 2004; Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton, 1998].

Sowohl Eigenschaften des Patienten wie Alter, Immunstatus, die Art und Weise der Entzündungsantworten und genetische Faktoren als auch Infektionsdosis, Toxin-Typ und weitere chromosomal- oder Plasmid-assoziierte Virulenzfaktoren können einen Einfluss auf den Verlauf einer STEC-Infektion haben [Honda, 1999; Griffin and Tauxe, 1991]. Anhand epidemiologischer Daten wurde gezeigt, dass Stx2-produzierende Isolate schwerwiegendere Krankheitssymptome auslösen, als Stämme, die Stx1 allein oder in Kombination mit Stx2 produzieren [Friedrich *et al.*, 2002; Boerlin *et al.*, 1999; Ostroff *et al.*, 1989].

Untersuchungen ergaben bereits 1983, dass die genetische Information für die Produktion der Stx sowohl bei *E. coli* O157 als auch bei *E. coli* O26 und *E. coli* O128 im Genom temperenter, lambdoider Prophagen kodiert ist [O'Brien *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1983]. Diese Stx-Bakteriophagen trugen Doppelstrang-DNA (dsDNA) als genetische Information und hatten eine für lambdoide Phagen typische Morphologie mit einer Kopf-Schwanz-Struktur. Sie bestanden aus rundlichen bis länglichen, hexagonal geformten Köpfen und nicht-kontraktilen, flexiblen Schwänzen. Die Länge der Stx-Phagenköpfe variierte zwischen 74 und 117 nm und die der Phagenschwänze zwischen 28 und 177 nm [Rietra *et al.*, 1989; O'Brien *et al.*, 1984].

Ähnlich dem Phagen Lambda (λ) beinhalten Stx-Phagen die transkriptionellen Einheiten für Replikation, Morphogenese und Lyse, welche in Folge der Phageninduktion unter der Kontrolle von Phagenpromotoren, Phagenrepressoren und transkriptionellen Terminatoren koordiniert exprimiert werden. Lambdaoide Phagen sind temperente Phagen und können nach dem Eindringen in die Wirtszelle zwei verschiedene Wege einschlagen. Während des lytischen Infektionszyklus erfolgt eine Phagenproduktion mit anschließender Lyse der Wirtszelle und dem Freiwerden von infektiösen Phagenpartikeln. Zum anderen kann eine Lysogenisierung erfolgen, wobei die Phagen-DNA in das Wirtschromosom integriert wird. Dieser für Lambda beschriebene lysogene Lebenszyklus ist auch ein Merkmal der Stx-Phagen. Den ersten Schritt des Infektionsprozesses der Stx-Phagen stellt die Adsorption an die Wirtszelle dar. Die Schwanzfasern des Phagen treten dabei in Kontakt mit Komponenten der Zelloberfläche. Abhängig von der Zielzelle kann es sich bei diesen Rezeptoren um Pilli, Lipopolysaccharide, Flagellen oder andere Oberflächenstrukturen handeln. Nach erfolgreicher Adsorption an die Bakterienzelle und Injektion der Phagen-DNA erfolgt eine Integration der Virus-DNA in das Bakterienchromosom. Dieses Stadium wird als Lysogenie, der in diesem (lysogenen) Stadium befindliche Bakteriophage als Prophage bezeichnet. Die integrierte Phagen-DNA wird wie ein Bestandteil der bakteriellen DNA an die Tochterzellen weitergegeben. Dies geschieht so lange, bis ein, den lytischen Zyklus aktivierendes Phagen-Repressorprotein inaktiviert wird. Bei dem Phagenrepressorprotein CI handelt es sich um das Produkt des *cI*-Gens [Jacob and Monod, 1961]. Der Phagenrepressor verhindert die Transkription von den für den lytischen Infektionszyklus benötigten Genen. Nach Inaktivierung des Phagenrepressors erfolgt die Transkription des Transkriptionsantiterminators N und infolgedessen die Transkription der Gene für die Replikation und Excision sowie des Antiterminators Q. Im Anschluss daran werden die späten Phagengene exprimiert. Negative Umweltreize (UV-Strahlung, Antibiotika) können dazu führen, dass der lytische Zyklus durch Inaktivierung des Repressors einsetzt. Im Verlauf der späten Transkription werden mit Hilfe des phagenkodierten Antiterminators Q die Gene der Phagen-Strukturproteine exprimiert. Des Weiteren erfolgt eine Zusammensetzung der Phagenpartikel und deren Freisetzung durch die enzymatische Lyse der Bakterienzelle [Wagner and Waldor, 2002; Campbell, 1994].

Strukturanalysen der *stx*-flankierenden Regionen in dem Stx2-Phagen 933W und dem Stx1-Phagen H-19B haben gezeigt, dass die *stx*-Gene zwischen dem Antiterminator Q (strangabwärts) und der Lysekassette, bestehend aus den Genen *S* und *R* lokalisiert sind [Karch *et al.*, 1999b; Neely and Friedman, 1998].

Unkmeir und Schmidt [2000] konnten mittels PCR der flankierenden Bereiche der *stx*-Gene und deren Sequenzanalysen zeigen, dass *stx* grundsätzlich in der gleichen

Region des Prophagengenomes lokalisiert sind, dieser Bereich selbst jedoch sehr heterogen ist. Weitere Analysen der 5'-flankierenden Region von *stx* zeigten, dass bei STEC O157 und non O157 unmittelbar vor dem *stx*₂-Gen ein Gen für eine seltene Iso-leucin-tRNA (*ileX*) lokalisiert ist, hingegen bei *stx*₁-positiven Stämmen dieses Gen nicht detektiert werden konnte [Schmidt *et al.*, 1997]. Nach weiteren Sequenzinformationen wurden insgesamt drei seltene tRNA-Gene unmittelbar vor dem *stx*₂-Gen identifiziert [Plunkett, III *et al.*, 1999]. Sowohl *stx*₂ als auch *stx*₁ befinden sich stromabwärts von dem späten Promotor p_{R'} und dem späten Terminator t_{R'} in der späten Region [Karch *et al.*, 1999b; Neely and Friedman, 1998]. Die Position der *stx*-Gene strangabwärts von p_{R'} und t_{R'} weisen auf die Expression dieser Gene unter Kontrolle des Antiterminators Q hin [Karch *et al.*, 1999b]. Zwischen Phagenzyklus und Expression der Stx besteht ein enger Zusammenhang [Wagner *et al.*, 2002; Neely and Friedman, 1998; Mühldorfer *et al.*, 1996]. Neely und Friedman [1998] zeigten, dass bei dem Stx1-Phagen H-19B der Transkriptionsaktivator Q einen direkten Einfluss auf die Expression der späten Lysegene und Stx1 ausübt.

Stx-Phagen bilden eine sehr heterogene Gruppe lambdoider Bakteriophagen. Da Stx-Phagen mosaikartig aus einzelnen verschiedenen genetischen Einheiten bestehen, unterscheidet sich ihre Genomsequenz hinsichtlich Größe und Zusammensetzung [Muniesa *et al.*, 2004; Johansen *et al.*, 2001; Unkmeir and Schmidt, 2000; Campbell, 1994]. Obgleich die fundamentale Struktur mit essentiellen Genen für die frühe, verzögert frühe und späte Transkription in allen intakten Stx-Phagen vorhanden ist, unterscheiden sich die Phagengenome jedoch in ihren übrigen Genzusammensetzungen wesentlich. Sequenzvergleiche einzelner Geneinheiten oder ganzer Genome von Stx-Phagen zeigen, dass sie sowohl Gene von Stx-Phagen als auch Gene von Phagen, die keine Stx bilden, besitzen. Der im EDL933 inserierte Phage BP-933W hat z. B. die mit Virulenzeigenschaft assoziierten Gene *lom*, *bor*, *stx*₂, *stk* und *yjhS* wahrscheinlich von andere Phagen erworben [Plunkett, III *et al.*, 1999].

Shiga Toxin-Produzenten wurden nicht nur in verschiedenen Serogruppen von *E. coli* [Karch *et al.*, 1999a; Schmidt *et al.*, 1999b; Griffin and Tauxe, 1991] sondern auch in *Shigella sonnei* [Strauch *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1993], *Citrobacter freundii* [Tschäpe *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1993] und *Enterobacter cloacae* [Paton and Paton, 1998] gefunden. Die Weitergabe von *stx*-Genen durch Phagen spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung Stx-produzierender Bakterien und neuer STEC-Serotypen. Strauch *et al.* [2001] konnten z. B. die Transduktion eines Stx1-Phagen von *S. sonnei* u. a. in *S. boydii*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* sowie in *E. coli* K-12 und *E. coli* HB101 zeigen. Acheson *et al.* [1998] führten im Intestinaltrakt von Mäusen Transduktionsexperimente mit einer Mutante des Stx1-Phagen H-19B durch, welche

statt *stx*₁ ein Gen für die Ampicillinresistenz kodiert. Nach gleichzeitiger Applikation von *E. coli* Wirtsstämmen (Rezipient) und dem Donorstamm wurden die Stuhlproben der Mäuse auf das Vorhandensein möglicher Transduktanten untersucht. Die Transduktionseffizienzen des Stx1-Phagen in die Wirtszellen lag *in vivo* zwischen 10⁻³ und 10⁻⁵. Schmidt *et al.* [1999a] konnten zeigen, dass die eine Chloramphenicolresistenz tragende Phagenmutante Φ 3538 (Δ *stx*₂::*cat*) in das Genom von enteropathogenen *E. coli*, enteroinvasiven *E. coli*, STEC, enterotoxischen *E. coli* und enteroaggregativen *E. coli* integrierte. Infolgedessen exprimierten diese lysogenen Stämme eine Resistenz gegen Chloramphenicol und bildeten infektiöse Phagenpartikel. Die Untersuchungen deuten an, dass Stx-Phagen für die Ausbildung der sehr heterogenen Gruppe der STEC von großer Bedeutung sind, da sie ihre genetische Information durch horizontalen Gentransfer auf andere Stämme übertragen können [Schmidt, 2001]. Die Integration des Phagen-genoms in das Wirtschromosom erfolgt bei Bakteriophagen von *E. coli* über Rekombinationsmechanismen. Stx-Phagen integrieren ihre DNA in bestimmte Stellen des Bakteriengenoms. Diese als Insertionsstellen bezeichneten Bereiche befinden sich innerhalb von chromosomalen Genen oder grenzen an diese an. Die beiden Stx2-Phagen 933W aus *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und VT-2 Sakai integrieren ihre DNA in das Gen *wrbA*, welches das Tryptophanrepressor-Bindeprotein (WrbA) kodiert [Makino *et al.*, 1999; Plunkett, III *et al.*, 1999]. Ferner konnte *wrbA* in einer Reihe von *stx*₁- und *stx*₂-positiven jedoch nicht in *stx*₁-negativen/*stx*₂-positiven Stämmen als Integrationsort identifiziert werden [Shaikh and Tarr, 2003]. Diese Tatsache belegt, dass Stx2-Phagen nicht nur *wrbA* als Integrationsstelle benutzen. Ohnishi *et al.* [2002] zeigten, dass das Gen *sbcB* in *E. coli* O157:H7 Stämmen als weitere Integrationsstelle für Stx2-Phagen fungieren kann. Für die in *E. coli* O157:H7 vorkommenden Stx1-Phagen VT1-Sakai und CP-933V konnte als Integrationsort *yehV* identifiziert werden [Perna *et al.*, 2001; Yokoyama *et al.*, 2000].

Antibiotisch wirkende Substanzen, wie Cotrimoxazol, Trimethoprim und Ciprofloxacin, können bei einigen STEC eine vermehrte Freisetzung von Stx bewirken [Zhang *et al.*, 2000; Grif *et al.*, 1998; Walterspiel *et al.*, 1992]. Norfloxacin und subinhibitorische Konzentrationen von Olaquinox und Carbadox sowie Antibiotika, die die SOS-Antwort der STEC beeinflussen, stimulieren simultan die Freisetzung von infektiösen Phagenpartikeln und Stx [Kimmit *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2000; Matsushiro *et al.*, 1999; Yoh *et al.*, 1999]. Des Weiteren wurden induzierende Effekte auf die Stx-Freisetzung durch H₂O₂, Neutrophile [Wagner *et al.*, 2001], UV-Bestrahlung und Norepinephrine [Lyte *et al.*, 1996] beschrieben. Die Freisetzung von Stx1, jedoch nicht von Stx2, kann durch eisenarmes Medium induziert werden [Wagner *et al.*, 2002]. Stx-Phagen stellen aus der heutigen Sicht der Forschung mobile genetische Elemente dar, die in der Re-

gulation und dem horizontalen Gentransfer der *stx*-Gene involviert sind. Sowohl Stx-Phagen und nicht-*stx*-konvertierenden Phagen sind an der Ausbildung der genetischen Variabilität der STEC beteiligt.

A 3.1.6.2 "Attaching and Effacing" (A/E)-Läsionen

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von EHEC O157 und anderen EHEC-Serogruppen ist die Fähigkeit zur Ausbildung von "Attaching and Effacing" (A/E)-Läsionen an Darmepithelzellen [Sherman *et al.*, 1988]. Die genetischen Informationen hierfür liegt auf einer chromosomal kodierten 43 Kb großen Pathogenitätsinsel (PAI), bezeichnet als „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE). Pathogenitätsinseln sind spezifische DNA-Bereiche mit mehreren Genen, die für verschiedene Virulenzmerkmale kodieren und so die Virulenz eines Bakteriums steigern. Pathogenitätsinseln sind in der Regel bei apathogenen Vertretern der gleichen Spezies nicht vorhanden [Hacker *et al.*, 1997]. Der LEE ist ein wichtiger Virulenzfaktor der enteropathogenen *E. coli* und einiger EHEC, da er die Fähigkeit zur Kolonisation an den eukaryontischen Zellen des Intestinaltraktes vermittelt. Kennzeichnend für eine A/E-Läsion ist die Adhärenz zwischen Bakterienzelle und Enterozyten durch Interaktion von bakteriellen Fimbrienadhäsinen mit Oberflächenrezeptoren der Enterozyten, einer damit einhergehenden Oberflächenveränderung und der Verlust der Microvilli. Die Zerstörung der Darmwand nach erfolgter Anheftung der Bakterien und der Ausbildung von A/E-Läsionen erhöht die Permeabilität der Darmzellwand und ermöglicht die Aufnahme des Toxins aus dem Intestinaltrakt in den Blutkreislauf. Erstmals wurde der LEE in dem EPEC Stamm E2348/69 identifiziert und konnte zudem noch in EHEC, *Citrobacter rodentium* sowie anderen *E. coli* nachgewiesen werden [McDaniel *et al.*, 1995]. Der GC-Gehalt des LEE ist im Vergleich zum restlichen *E. coli* Chromosom wesentlich geringer, was darauf hindeutet, dass der LEE über horizontalen Gentransfer erworben wurde [Frankel *et al.*, 1998]. Mit einer Größe von 35,6 Kb ist der LEE der EPEC kleiner als der LEE der EHEC. Der Ort der Insertion ist in EPEC und EHEC das Selenocystein-tRNA-Gen (*se/C*) [Elliott *et al.*, 1998; McDaniel *et al.*, 1995]. Der LEE der EPEC ist 35 Kb groß und besteht aus 41 Genen, die in der Mehrzahl wichtig für die Expression des Typ III Sekretionsystems sind.

Die Gene sind in die 5 polycistronischen Operons, LEE1, LEE2, LEE3, *tir* und LEE4 eingeteilt [McDaniel *et al.*, 1995], welche für die Komponenten des Typ III Sekretionsystems, die Esp Proteine, die durch dieses System sekretiert werden, das große äußere Membranprotein Intimin und die Translokationsrezeptoren Tir, CesT und Ler kodieren.

Die 41 Gene im EPEC-LEE sind auch in der gleichen Reihenfolge in *E. coli* O157:H7

vorhanden [Perna *et al.*, 2001]. Der LEE der EHEC besteht allerdings aus 54 Genen. Die zusätzlichen 13 Gene befinden sich stromabwärts des *se/C*-Gens und entstammen einem 7,5 Kb großen kryptischen Prophagen (Phage 933L) der P4-Familie [Perna *et al.*, 2001]. Die beiden LEE-Regionen der Stämme sind untereinander sehr ähnlich. Im Mittelwert beträgt die Sequenzidentität 93,9%.

Das Gen *eae* kodiert für das große äußere Membranprotein Intimin (97 KDa), welches ein wichtiger EHEC Adhärenzfaktor ist. Das Gen *tir* kodiert den Intiminrezeptor Tir, der durch das Bakterium sekretiert und in die Zellmembran der Enterocyten der Wirtszelle inseriert wird. Stromabwärts von *eae* befinden sich die *esp*-Gene, die für die Sekretionsproteine (Esp) kodieren. Diese induzieren die Signaltransduktion der Epithelzellen und führen zur Ausbildung der A/E-Läsionen. Die Expression der *esp*-Gene wird durch Wachstum in Zellkulturmedium und durch Bedingungen, die ähnlich denen im Intestinaltrakt sind, induziert. Stromaufwärts von *eae* und *tir* liegen Gene, die für ein Typ III Sekretionssystem kodieren und an der extrazellulären Sekretion der Esp Proteine beteiligt sind.

EspA ist indirekt an der Signaltransduktion der Wirtszelle beteiligt. Es fungiert als Strukturprotein und Hauptkomponente von Filamenten, die an der Bakterienoberfläche lokalisiert sind und mit der Wirtszelle während der ersten Phase der Ausbildung der A/E-Läsion interagieren. Als Teil des Translokationsapparates ermöglicht EspA die Injektion von EspB und Tir in die Wirtszelle.

EspD scheint ebenfalls an der Ausbildung der Filamente beteiligt zu sein und ermöglicht, gemeinsam mit EspA und EspB, den direkten Transfer der Effektormoleküle in die Wirtszelle [Chen and Frankel, 2005; Sonnenberg and Whittam, 2001; Frankel *et al.*, 1998; Nataro and Kaper, 1998]. Nach Übertragung des Tir Proteins in die Wirtszelle erfolgt dessen Insertion in die Membran. Der Intimin-Rezeptor Tir bewirkt eine Veränderung des Zytoskeletts der Wirtszelle und eine Ausbildung der podestartigen Sockel [Kenny, 2002]. Physiologische Veränderungen nach Injektion der Effektorproteine in die Wirtszelle, wie Freisetzung von Calcium- und Inosit-triphosphat und die Aktivierung der Enzyme Phospholipase C und Proteinkinase C, werden ebenfalls beobachtet [Frankel *et al.*, 1998].

A 3.1.6.3 Weitere Virulenzfaktoren

Intimin-negative Stämme sind ebenfalls in der Lage, blutige Durchfälle und ein HUS zu verursachen. Daher werden weitere Virulenzfaktoren bei der Kolonisation von STEC vermutet. Tarr *et al.* [2000] identifizierten in *E. coli* O157:H7 und anderen EHEC das *iha*-Gen, welches für ein, an der Adhäsion beteiligtes äußeres Membranprotein kodiert und die Ausbildung eines Adhäsionsphänotyps bei nicht-adhärenenten *E. coli* vermittelt.

In einem LEE-negativen STEC der Serogruppe O113 konnten Paton *et al.* [2001] auf einem Megaplasmid ein Gen identifizieren, welches das Autoagglutinationsadhäsins Saa („STEC autogglutination adhesin“) kodiert. Dieses auf der Zelloberfläche lokalisierte äußere Membranprotein vermittelt *in vitro* die Adhäsion an HEp-2 Zellen und könnte so eine Bedeutung bei der Pathogenese von Infektionen mit LEE-negativen STEC haben [Paton *et al.*, 2001]. Nicholls *et al.* [2000] identifizierten ein Gen („EHEC factor for adherence“, Efa1), welcher *in vitro* für eine ausgeprägte Adhäsion eines klinischen EHEC-Isolates (O111) eines HUS-Patienten an Epithelzellen verantwortlich war. Das Fehlen von Efa1 in apathogenen Stämmen geht mit dem Verlust der Adhäsionsfähigkeit, Hämagglutination und Autoaggregation einher. Stevens *et al.* [2002] zeigten, dass Efa1 für eine effiziente Kolonisation von STEC der Serogruppen O5 und O111 im Intestinaltrakt von Kälbern benötigt wird. Efa1 hat eine hohe Sequenzidentität zu dem ebenfalls an der Adhäsion von EHEC beteiligten plasmidkodierten ToxB (A 3.1.6.6). Torres *et al.* [2002] identifizierten ein chromosomales Operon (*lpfABCC'DE*), bestehend aus 6 offenen Leserahmen, welches eine starke Ähnlichkeit mit dem Operon für LP („long polar“) Fimbrien von *Salmonella enteritica* aufweist. Das Resultat der Übertragung der *lpf* Gene in *E. coli* K-12 ist die Ausbildung von Fimbrien und eine gesteigerte Zelladhäsion. Die Autoren vermuteten eine Beteiligung der LP-Fimbrien an der Interaktion von *E. coli* O157:H7 mit Epithelzellen durch die Ausbildung von Mikrokolonien [Torres *et al.*, 2002].

Brunder *et al.* [2001] fanden in Sorbitol-fermentierenden (SF) *E. coli* O157:H- ein Operon, bestehend aus 6 Genen, welches eine Mannose-resistente Hämagglutination und die Expression von Fimbrien vermittelt. Diese Gene (*sfpA/H/C/D/J/G*) liegen auf dem Plasmid pSFO157 und wurden nur in EHEC O157:H- identifiziert. Stämme mit Mutationen im Bereich von *sfpG* bilden unvollständige Fimbrien aus. Die Autoren vermuteten, dass SfpG als Adhäsins fungiert, wodurch die Bindung an Erythrozyten vermittelt und zudem der korrekte Zusammenbau der Fimbrien angeregt wird.

Auch Torres und Kaper [2003] und Tatsuno *et al.* [2000] vermuteten, dass die Ausbildung des adhären Phänotyps durch mehrere genetische Elemente von EHEC kontrolliert wird. Das äußere Membranprotein OmpA fungiert als Adhäsins in *E. coli* O157:H7 und bedingt *in vitro* eine Adhäsion an HeLa-Zellen [Torres and Kaper, 2003].

In einer Studie von Toma *et al.* [2004] wurde in 91% der untersuchten STEC (127/139) *iha* identifiziert und stellt damit derzeit das verbreitetste STEC-Adhäsins dar. Als immer häufiger vorkommendes Adhäsins in allen Serogruppen scheint Iha zwar ein bedeutsamer, wahrscheinlich aber nicht ausreichender Faktor für eine Infektion beim Menschen zu sein. Als zweithäufigstes Adhäsins wurde *lpfA* identifiziert (73%). Eine Korrelation zwischen identifiziertem Adhäsins und Isolationsquelle (Nahrungsmittel,

Mensch, Tier) konnte nicht abgeleitet werden, hingegen wurde ein Zusammenhang zwischen Serotyp des Isolates und Adhäsionsfaktor festgestellt [Toma *et al.*, 2004].

A 3.1.6.4 Enterohämolysin

In *E. coli* O157:H7 wurde ein hochkonserviertes Plasmid mit einer Größe von ca. 93 Kb, bezeichnet als pO157, identifiziert [Schmidt *et al.*, 1994a]. Das Plasmid kodiert eine Reihe von weiteren Virulenzfaktoren, deren Gene durch Insertionselemente in pO157 flankiert werden. Die mosaikartige Struktur der Geneinheiten von pO157 entstand wahrscheinlich als Folge von Rekombinationsprozessen [Brunner and Karch, 2000]. Die mit einer extraintestinalen Krankheit assoziierten *E. coli* Stämme sind in der Lage, Erythrozyten zu lysieren (Hämolyse) [Cavalieri *et al.*, 1984]. Je nach Pathogruppe der *E. coli* werden verschiedene Hämolysetypen beschrieben [Beutin, 1991]. Das für den enterohämolytischen Phänotyp verantwortliche Enterohämolysin (EHEC-Hly) ist auf dem pO157 kodiert und wird in *E. coli* der Serogruppen O157, O26 und O111 gefunden [Schmidt *et al.*, 1995]. Der enterohämolytische Phänotyp der Stämme mit EHEC-Hly wird durch die Entstehung von kleinen trüben Zonen (Höfe) auf Blutplatten mit gewaschenen Erythrozyten charakterisiert [Schmidt *et al.*, 1994a]. Enterohämolysin wird durch seine Eigenschaft, in Lipidmembranen Kanäle auszubilden, als porenbildendes Zytolysin eingestuft [Schmidt *et al.*, 1996]. Die Rolle des EHEC-Hly in der Pathogenese von STEC ist bisher noch nicht ausreichend geklärt. Die Tatsache, dass EHEC-*hly* Gene in STEC vorkommen, jedoch nicht in *stx*-negativen Stämmen, deutet auf eine Korrelation von *Stx* und Enterohämolysin hin. In 16 von insgesamt 18 STEC-Isolaten von Patienten mit HUS und nur in vier von 18 Isolaten bei Patienten mit einer Diarrhoe konnte das EHEC-Hly nachgewiesen werden. Der klinische Verlauf einer STEC-Infektion kann durch die Fähigkeit der STEC, Enterohämolysin zu produzieren, beeinflusst werden [Schmidt *et al.*, 1995].

A 3.1.6.5 Serin Protease und Katalase-Peroxidase

Ein weiterer plasmidkodierter (pO157) Virulenzfaktor ist die in die Gruppe der Autotransporterproteine eingeordnete extrazelluläre Serin Protease EspP. Da EspP den humanen Gerinnungsfaktor V spalten kann, kann dies *in vivo* zu einer verzögerten Blutgerinnung führen und die Ausbildung der für STEC typischen hämolytischen Colitis verstärken [Brunner *et al.*, 1997]. Die Hypothese, dass EspP die Pathogenese von Infektionen beeinflusst, wird durch den Aspekt gestärkt, dass Patienten mit einer STEC Infektion Antikörper gegen diese Protease im Serum enthalten.

Das Gen für die Katalase-Peroxidase KatP ist ebenfalls auf dem pO157-Plasmid kodiert und stellt einen weiteren Virulenzfaktor der EHEC dar [Brunner *et al.*, 1996]. KatP akkumuliert im periplasmatischen Raum der STEC. Durch die Katalase-vermittelte Entgif-

tung zytotoxischer Oxidantien könnte die Bakterienzelle geschützt und dadurch die Ansiedlung im Darm begünstigt werden.

Sowohl das *katP*-Gen als auch das *espP*-Gen wurden zwar in *E. coli* O157:H7, jedoch nicht in Sorbitol fermentierenden *E. coli* O157:H- gefunden, was darauf hinweist, dass KatP und EspP nicht essentiell für die Pathogenese von STEC sind [Brunner *et al.*, 1999].

A 3.1.6.6 "Clostridium difficile-like" Toxin und Zink-Metalloprotease

Einen weiteren Virulenzfaktor stellt das auf pO157 kodierte "Clostridium difficile-like" Toxin ToxB dar. Dieses zytoplasmatische Protein beeinflusst die Produktion und Sekretion der Proteine EspA, EspB und Tir, welche für eine bakterielle Anheftung an eukaryontische Zellen benötigt werden. ToxB trägt deshalb zur vollständigen Expression der Adhärenz an die Epithelzellen bei [Tatsuno *et al.*, 2001]. Lathem *et al.* [2002] beschrieben mit der Metallprotease StcE einen weiteren plasmidkodierten (pO157) Virulenzfaktor. StcE („secreted protease of C1 Esterase inhibitor from EHEC“) gehört zu der Familie der Serin-Protease-Inhibitoren und vermittelt die spezifische Spaltung des C1-Esterase Inhibitors (C1-INH) in 60-65 KDa große Fragmente. Die Sekretion von StcE erfolgt unter Beteiligung des *etp*-Typ II Sekretionssystems. Als Bestandteil einer Virulenzeinheit könnte StcE in der Pathogenität von STEC O157 involviert sein. Im Stuhl von Patienten mit einer *E. coli* O157:H7 Infektion konnten StcE Antigene detektiert werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von StcE an der Pathogenese von EHEC-Infektionen hin. Die Spaltung von C1-INH fördert die Bildung lokaler Entzündungen und Koagulationen, gefolgt von Gewebszerstörung und Ödembildung in der Dünndarmschleimhaut. Durch EHEC-Infektion entstandene Verletzungen im Darm können einem Vorhandensein von StcE und dem damit einhergehenden Verlust von C1-INH zugeschrieben werden.

A 3.2 *Escherichia coli* O157:H7 Stamm EDL933

Der 1982 aus Hackfleisch isolierte *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wurde von Perna *et al.* [2001] sequenziert und mit der genetischen Information von *E. coli* K-12 Stamm MG1655 verglichen. Der Sequenzvergleich der beiden Stämme ergab eine konservierte Sequenz von 422 Kbp, die den fundamentalen Hintergrund beider Stämme widerspiegelt. Mit einer Größe von 552,8 Kbp kodiert der *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 5416 Gene, zu denen unter anderem Virulenzfaktoren, neue metabolische Funktionen und Prophagengene gehören. Im Vergleich zum Wildtypstamm K-12 besitzt EDL933 O157-spezifische DNA-Sequenzen (1,34 Mbp), die nicht im K-12 vorkommen und als O-Inseln bezeichnet werden. Geschätzte 26% der EDL933 Gene (1387/5416) befinden sich in den 177 O-Inseln.

Circa 561 Genen (etwa 40%) der O-Inseln können Funktionen zugeordnet werden und 338 EDL933 Gene befinden sich in Clustern, die mit Phagen assoziiert werden und wahrscheinlich Phagengenomen entstammen. Die dominierende Rolle der Phagen in *E. coli* O157:H7 wird durch ihren hohen Anteil deutlich. Insgesamt besitzt EDL933 18 lambdaoide Prophagen und prophagenähnliche Elemente, darunter den Stx1 (Stx1)-kodierenden Phagen CP-933V und den Shiga Toxin 2 (Stx2)-kodierenden Phagen BP-933W. Die Prophagengröße im Genom von EDL933 variiert von 7,5 Kb (CP-933L) bis 61,6 Kb (BP-933W). Nur der *stx*₂-konvertierende Prophage BP-933W ist in der Lage, infektiöse Phagenpartikel zu bilden. Die übrigen im EDL933 vorkommenden Phagen sind kryptische Phagen (cryptic prophage, CP), die unvollständig sind und deshalb keine infektiösen Phagenpartikel bilden können [Perna *et al.*, 2001; Plunkett, III *et al.*, 1999]. 33% der O-Inseln (59/177) enthalten Gene mit unbekanntem Funktionen. Neun große O-Inseln kodieren vermutlich Virulenzfaktoren, unter anderem für ein RTX-Toxin (OI#28), für Transportsysteme, für ein Typ III Sekretionssystem (OI#152) und für den LEE-Locus („Locus of enterocyte effacement“, OI#148). Kleinere O-Inseln sind ebenfalls mit Virulenzfunktionen assoziiert, wie zum Beispiel Gene für die Fimbrienbiosynthese und ein Eisenaufnahmesystem [Schmidt and Hensel, 2004]. Einige Gencluster spielen keine direkte Rolle für die Virulenz, vermitteln dem Bakterium jedoch spezielle Eigenschaften, um unter verschiedenen Umweltbedingungen zu überleben (Telluritresistenz oder Glutamatfermentation). Des Weiteren sind im ED933 K-12 spezifische DNA-Sequenzen enthalten. Diese 234 K-Inseln entsprechen 0,53 Mbp. Durch Sequenzvergleiche und der Erstellung phylogenetischer Stammbäume konnte festgestellt werden, dass *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und *E. coli* K-12 vermutlich von einem gemeinsamen Vorfahren vor mehr als 4,5 Millionen Jahren abstammen. Aus diesem Vorläufer heraus entwickelte sich *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 durch den Erwerb von Virulenzfaktoren einschließlich der Pathogenitätsinseln, des Hämolytins und der durch Phagen kodierten Shiga Toxine. Dies führte zum steten Aufbau der molekularen Mechanismen und somit zur Steigerung der Virulenz von EDL933. Der Zuwachs an Virulenzeigenschaften ist auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen [Perna *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2000].

Zielsetzung

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical bar. The horizontal line is a thin, light blue line that spans across the page. The vertical bar is a thicker, light blue bar that is positioned on the right side of the page, extending from the top to the bottom. The word "Zielsetzung" is centered above the horizontal line.

B Zielsetzung

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* sind wichtige Erreger von Lebensmittelinfektionen und gelten als bakterielle Hauptverursacher für die Ausbildung einer hämorrhagischen Colitis und eines hämolytisch-urämischen Syndroms. Ausgehend von der Tatsache, dass die Shiga Toxin-Freisetzung bei STEC-Stämmen eng mit dem Phagenzyklus gekoppelt ist und durch variierende Umweltbedingungen, z.B. Antibiotika oder UV-Strahlung moduliert werden kann, war Ziel dieser Arbeit die Wirkung von Antibiotika am Beispiel des Gyrasehemmers Norfloxacin umfassend zu untersuchen. Insbesondere sollten die Auswirkungen von Antibiotika auf die Regulation der Genexpression der Stx- und Non-Stx-Phagen sowie weiterer im *E. coli* O157:H7 vorkommender potentieller Virulenzfaktoren untersucht werden.

Schwerpunkt dieser Arbeit lag somit auf der Analyse des Einflusses einer geringen Konzentration an Norfloxacin auf das Gesamttranskriptom des enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mittels DNA-Microarraytechnologie.

Im Vordergrund stand zunächst die Etablierung und Validierung der DNA-Microarraytechnologie. Vorangehend sollte die RNA-Isolierung aus *E. coli* Flüssigkulturen, die sich daran anschließende reverse Transkription der mRNA sowie die Hybridisierung der cDNA mit dem O157 Array optimiert werden.

Aufgabe war weiterhin, durch Erstellen von Wachstumskurven die Konzentration an Norfloxacin zu ermitteln, die zum einen das Bakterienwachstum im Verlauf der Inkubation nur geringfügig hemmt und gleichzeitig eine erhöhte Stx-Freisetzung bedingt. Um die Wirkung von Norfloxacin auf die Genregulation von EDL933 zu untersuchen, sollten Transkriptionsprofile unter Anwendung der Arraytechnologie mit dem kommerziell erhältlichen O157 Array der Firma MWG Biotech AG erstellt werden. Des Weiteren sollte die minimale Hemmkonzentration von Norfloxacin ermittelt sowie die Effekte von diesem Gyrasehemmer auf EDL933 durch Bestimmung der optischen Dichte, Lebendkeimzahl, Phagenfreisetzung und Shiga Toxin-Produktion vor und nach Induktion untersucht werden.

Material und Methoden



C Material und Methoden

C 1 Material

C 1.1 Verwendete Enzyme

DNase I, RNase-frei	Roche Deutschland Holding GmbH
Expand High Fidelity PCR System	Roche Deutschland Holding GmbH
Superskript™ II RNase H ⁻	Invitrogen Corporation
Taq DNA Polymerase	Promega Corporation

C 1.2 DNA/RNA Größenstandards

SmartLadder (200-10000 bp)	Eurogentec
SmartLadder SF (100-1000 bp)	Eurogentec
RNA Marker (0,281-6,583 Kb)	Promega Corporation
RNA Ladder, high range (0,2-6,000 Kb)	Fermentas GmbH
RNA-Längenstandard I Digoxigenin-markiert (0,3-6,9 Kb)	Roche Deutschland Holding GmbH

C 1.3 Farbstoffe

FluoroLink™ Cy™ 3-AP3-dCTP	Amersham Biosciences Europe GmbH
FluoroLink™ Cy™ 5-AP3-dCTP	Amersham Biosciences Europe GmbH
Cyanine 3-dCTP	PerkinElmer, Inc.
Cyanine 5-dCTP	PerkinElmer, Inc.

C 1.4 Desoxynukleotidtriphosphate

100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Invitrogen Corporation
PCR Nukleotidmix (10 mM von jedem dNTP)	Promega Corporation

C 1.5 Antibiotika

MitomycinC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<u>Stammlösung:</u>	0,5 mg/ml in Aqua _{bidest}
Norfloxacin (NFLX)	Valeant Pharmaceuticals International
<u>Stammlösungen:</u>	25 mg/ml und 32 mg/ml in Eisessig
<u>Arbeitslösung:</u>	32 µg/ml in Mueller-Hinton-Bouillon

Etest® Norfloxacin

VIVA Diagnostika - Diagnostische Produkte GmbH

C 1.6 Puffer und Medien

Die verwendeten Standardchemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Difco (Heidelberg) bezogen. Für die Herstellung der Lösungen und Puffer wurden die Feststoffchemikalien durch Lösen in bidestilliertem Wasser (Aqua_{bidest}) hergestellt.

C 1.6.1 Nährmedien und Puffer

Luria-Bertani-Medium (LB):	1% (w/v) Bacto™ Trypton, 0,5% (w/v) Hefextrakt, 1% (w/v) NaCl wurden mit 1 M NaOH auf pH=7,5 eingestellt und autoklaviert.
Gelbeladungspuffer (DNA):	2 ml 1% (w/v) Bromphenolblau, 200 µl 1% (w/v) Xylencyanol, 500 µl 0,5 M EDTA (pH=7,5) und 100 µl 10% SDS wurden gemischt und mit Glycerin (99%) auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt.
PBS:	170 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 13 mM Na ₂ HPO ₄ wurden mit 1 M HCl auf pH=7,4 eingestellt und autoklaviert.
SM-Puffer:	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O und 0,01% (w/v) Gelatine wurden gemischt und pH=7 eingestellt.
TE-Puffer:	10 mM Tris, 1 mM EDTA wurden auf pH=7,5 oder 8,0 eingestellt und autoklaviert.
2-fach Proteinase K Puffer:	20 ml 1 M Tris-HCl (pH=8), 20 ml 0,5 M EDTA (pH=8) und 100 ml 10% (w/v) SDS wurden gemischt und mit Aqua _{bidest} auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt.
3 M NaAc:	3 M NaAc wurde mit 25% Essigsäure auf pH=7,2 eingestellt.
50-fach TAE:	2 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA (pH=8,0), 5,71% Eisessig (100% Essigsäure)
Tween20:	Tween80 1:4 in Aqua _{bidest}
10-fach MOPS:	0,2 M MOPS, 5 mM NaAc-3 H ₂ O, 20 ml 0,5 M Na ₂ EDTA wurden mit 1M NaOH (DEPC-behandelt), pH=7,0 eingestellt und mit DEPC-Aqua _{bidest} auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt.

C 1.6.2 Puffer für Plaquehybridisierung

Denaturierungspuffer:	25 ml 3 M NaCl (autoklaviert) und 12,5 ml 2 M NaOH (autoklaviert) wurden gemischt und mit sterilem Aqua _{bidest} auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt.
Neutralisierungspuffer:	1,5 M NaCl, 1,0 M Tris-HCl wurden auf pH=8,0 eingestellt und autoklaviert.
Spülpuffer:	10 ml Tris-HCl (pH=7,5, autoklaviert) und 5 ml 20-fach SSC (autoklaviert) wurden gemischt und mit sterilem Aqua _{bidest} auf ein Endvolumen von 35 ml aufgefüllt.
20-fach SSC:	3 M NaCl, 300 mM Natrium-Citrat-Dihydrat (Promega) wurden mit 1 M HCl pH=7,0 eingestellt und autoklaviert.
Hybridisierungspuffer:	5-fach SSC (autoklaviert), 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin (Roche) und 0,2% (w/v) SDS (sterilfiltriert) wurden unter sterilen Bedingungen gemischt und mit sterilem Aqua _{bidest} auf ein Endvolumen von 180 ml aufgefüllt und anschließend 1% Blocking Reagenz hinzugeben.
Waschpuffer 1:	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3% (v/v) Tween 20 mit NaOH-Plätzchen wurden auf pH=7,5 eingestellt und autoklaviert.
Waschpuffer 2:	2-fach SSC (autoklaviert) und 0,1% (w/v) SDS (sterilfiltriert).
Waschpuffer 3:	0,5-fach SSC (autoklaviert) und 0,1% (w/v) SDS (sterilfiltriert).
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl wurden mit 1 M NaOH auf pH=9,5 eingestellt und autoklaviert.
Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl wurden mit 1 M NaOH auf pH=7,5 eingestellt und autoklaviert.
10-fach Blockierungsreagenz:	10% (w/v) „Blocking Reagenz“ (DIG DNA-Labeling and Detection Kit, Roche) wurde in Maleinsäurepuffer durch vorsichtiges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und autoklaviert.
Blockierungslösung:	10-fach Blockierungsreagenz wurde 1:10 in Maleinsäurepuffer verdünnt.

Antikörperlösung: 4 µl Antikörperlösung (DIG DNA-Labeling and Detection Kit) wurden mit 20 ml 1-fach Blockierlösung gemischt (immer frisch herstellen).

C 1.7 Microarray und Microarray-Scanner

<i>E. coli</i> O157 Array	MWG Biotech AG
Affymetrix 428 Scanner	Affymetrix UK Ltd

C 1.8 EDV

Expressionist™	Genedata, Basel, Switzerland
MAVI Software	MWG Biotech AG
BioDiscovery ImaGene™	MWG Biotech AG (5.0 Image Processing Software)
Adobe Photoshop 5.0	Adobe
BioEdit	[Hall, 1999]
Oligoexplorer	Oligo 4.0, National Biosciences, (Plymouth, USA)
Editseq 4.03, Megalign 4.03, SeqMan 4.03	DNASTAR

C 1.9 Oligonukleotidprimer

Die in der Arbeit verwendeten Primer und die PCR-Bedingungen sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Die vom Hersteller als Lyophilisat gelieferten Primer wurden mit Aqua_{bidest} auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Aus dieser Stammlösung wurden die Arbeitslösungen (30 pmol/µl und 10 pmol/µl) verdünnt. Für die reverse Transkription wurden Random Primer (3 µg/µl, Invitrogen Corporation) verwendet.

Tabelle C 1: Verwendete Primer, deren Sequenz, Zielbereich, PCR-Produktlänge, Annealing- u. Extensionsbedingungen der PCR und Literaturangabe.

Primer	Sequenz (5`-3`)	Zielsequenz	PCR-Produktlänge	T _A * u. t _A ⁺	t _E [#]	Referenz
GK3 GK4	ATG AAG AAG ATG TTT ATG GCG TCA GTC ATT ATT AAA CTG CAC	<i>stxB₂</i>	260 bp	52°C 30 s	40 s	[Gunzer <i>et al.</i> , 1992]
KS7 KS8	CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG	<i>stxB₁</i>	288 bp	52°C 60s	40s	[Schmidt <i>et al.</i> , 1994b]
LP43 LP44	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	<i>stxA₂</i>	584 bp	54°C 30s	90 s	[Cebula <i>et al.</i> , 1995]
z1464-F z1464-Rn	CAG ATC AGC AAT GTG CTT CC TGA CTT TCT GTT CAG AAA CGC	<i>stxA₂</i>	258 bp	49°C 60 s	60 s	diese Arbeit
z1465-F z1465-Rn	CTG CAA CCG TTA CTG CAA AG TAA ACT GCA CTT CAG CAA ATC C	<i>stxB₂</i>	100 bp	49°C 60 s	60 s	diese Arbeit
z3343-Fn z3343-R	CCA ACA GAT GGA ATC TTC AGT C AAA TAA CTT CGC TGA ATC CCC	<i>stxB₁</i>	111 bp	49°C 60 s	60 s	diese Arbeit
z3344-Fn z3344-R	GCC TGA TTA TCA TGG ACA AGA C CCG GAC ACA TAG AAG GAA AC	<i>stxA₁</i>	158 bp	49°C 60 s	60 s	diese Arbeit
z4652-Fn z4652-R	TAA TCG GAC GGT ATC CCG AG ACA CCA TGC CAA AAA AGG AG	<i>aroE</i>	235 bp	51°C 60 s	60 s	diese Arbeit
z1253-F z1253-Rn	AAA GCG AAT GTC GCG TGT CC CAA TTT GTC AAG CGC ACT GTC C	<i>serC</i>	288 bp	51°C 60 s	60 s	diese Arbeit
z4002-F z4002-R	ACA CGC TGC TGA TCT TCA TC GCA GCG ATT TTG TTC TTC AC	<i>recA</i>	202 bp	49°C 60 s	90 s	diese Arbeit
z5623-F z5623-R	CGG TAA CGT TGT GGA TTA CC GGG CGA AGA AGT TAG ACA GC	<i>pgi</i>	188 bp	50°C 60s	90 s	diese Arbeit
z5330F z5330R	GTG ATG ATC GTC GGT GAT GAC GCG CAA TAG AGG GAA ATA GGC	<i>uvrD</i>	242 bp	49°C 60 s	90 s	diese Arbeit
<i>lomW</i> -F <i>lomW</i> -R	TTC AGT CAT TTC GTC AAC AG CAA AAT CAT CCG TTA TCT CG	<i>lomW</i>	139 bp	49°C 60s	60 s	diese Arbeit

T_A*: Annealingtemperatur; t_A⁺: Annealingzeit; t_E[#]: Elongationszeit

C 2 Methoden

C 2.1 Bakterielle Arbeitsmethoden

C 2.1.1 Verwendete *E. coli* Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und deren geno- und phänotypischen Eigenschaften sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle C 2: Geno- und phänotypische Eigenschaften der verwendeten *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
C600	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21</i>		[Huynh <i>et al.</i> , 1985]
EDL933	<i>stx₁, stx₂</i>	Serotyp O157:H7	[O'Brien <i>et al.</i> , 1984]
C600(933W)	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21</i>	Φ933W	[O'Brien <i>et al.</i> , 1984]
C600(H-19J)	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21</i>	ΦH19-J	[O'Brien <i>et al.</i> , 1984]
EDL933r	<i>stx₁, stx₂, recA-</i>	Serotyp O157:H7	[Fuchs <i>et al.</i> , 1999]

C 2.1.2 Lagerung und Kultivierung von *E. coli*

Für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten wurden in der Regel autoklavierte (20 min, 121°C, 1 bar) oder sterilfiltrierte (Bottle-Top-Filter, 0,22 µm, Nevolab und Spitzenvorsatzfilter; 0,22 µm; Qualilab) Lösungen verwendet. Alle Arbeiten in Zusammenhang mit Bakterienkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank der Klasse 2 („laminar air flow“) durchgeführt. Die Lagerung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerinkonserven. Um die Konserven herzustellen, wurden 0,4 ml einer Übernachtskultur mit 0,6 ml Glycerin (92%) gemischt, in Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Als Standardnährmedium für die Kultivierung der *E. coli* Stämme wurde LB-Medium verwendet. Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Bacto-Agar in einer Konzentration (w/v) 1,5% für Agarplatten und 0,7% für Weichagar zugegeben. Je nach Bedarf wurde nach dem Autoklavieren dem LB-Agar Antibiotikum in definierter Konzentration unter sterilen Bedingungen zugegeben. Um die Bakterien zu kultivieren wurden die Bakterien in einem Dreiosenausstrich auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurden ein bis zwei Bakterienkolonien in 10 ml LB-Flüssigmedium in einem Erlenmeyerkolben eingerieben und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator (CERTOMAT MO, B. Braun Biotech, Sartorius group) bei 180 rpm bebrütet.

C 2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Lebendkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Flüssigkulturen erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) mit Hilfe eines Photometers (Amersham Pharmacia Biotech) gegen LB-Flüssigmedium als Blindwert in einem Volumen von 1 ml (UltraVette halbmicroTM, Roth). Für die Messung wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene OD_{600} -Wert im Bereich zwischen 0,1 und 0,6 lag, da nur in diesem Bereich eine Linearität zwischen Zellzahl und Extinktion besteht. Eine optische Dichte OD_{600} von 1 entspricht näherungsweise einer *E. coli* Zellzahl von circa 10^9 Zellen pro ml Kultur [Sambrook J. *et al.*, 1989]. Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden aus dem Kulturmedium 2 x 100 µl entnommen und 2 serielle Verdünnungen in PBS hergestellt. Je 100 µl dieser Verdünnungen wurden mittels Drigalski-Spatel jeweils auf 2 LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden nur die Verdünnungsstufen ausplattiert, bei denen eine Koloniezahl von 50 bis 1000 Kolonien zu erwarten war. Die Einzelkolonien wurden ausgezählt und die mittlere Lebendkeimzahl in Kolonie-bildenden Einheiten (KBE/ml) angegeben.

C 2.1.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die niedrigste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, die eine Keimvermehrung unter standardisierten Bedingungen noch unterbindet. Die Empfindlichkeitsprüfung von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 gegen Norfloxacin (NFLX) wurde mit der Bouillon-Dilutionsmethode im Röhrchen (Makrodilutionsmethode) laut DIN 58940 Teil 5 durchgeführt. Als Kultur- und Verdünnungsmedium wurde Mueller-Hinton-Bouillon (MHB, Difco) verwendet. Eine Stammlösung von 32 mg NFLX/ml Eisessig wurde in MHB so verdünnt, dass eine Wirkstoffkonzentration von 32 µg/ml NFLX erhalten wurde. Von dieser Arbeitslösung wurde 1 ml in Reagenzgläser, die bereits 1 ml MHB beinhalten, überführt und eine serielle Verdünnungsreihe mit Endkonzentrationen von 16 µg/ml - 0,015 µg/ml hergestellt. Ein ml einer *E. coli* EDL933 Kultur in MHB mit 1×10^6 KBE/ml wurde abschließend zu jedem Röhrchen gegeben und der Test für 16-18 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Reagenzglas ohne Wirkstoff inkubiert. Ein mit EDL933-Kultur beimpftes wirkstofffreies Röhrchen wurde zusätzlich bei 4°C aufbewahrt und diente als Ver-

gleichsmuster für eine vollständige Hemmung (Negativkontrolle). Zudem wurde der MHK-Test parallel ohne Antibiotika, jedoch mit der gleichen Menge an Eisessig durchgeführt, um einen Einfluss von Eisessig auszuschließen. Die Interpretation der MHK erfolgte visuell. Die Bestimmung der MHK wurde dreimal wiederholt. Zusätzlich wurde eine MHK-Bestimmung mit Norfloxacin Etest Streifen (VIVA Diagnostika) laut Herstellerangaben durchgeführt.

C 2.1.5 Wachstumskurve von *E. coli* EDL933

Zur Erstellung der Wachstumskurven für die Induktionsexperimente wurden die Bakterien in 500 ml Erlenmeyerkolben in einem Volumen von 100 ml LB-Flüssigmedium inkubiert. Die Kulturen wurden parallel auf eine optische Dichte von $OD_{600}=0,05$ angeimpft. Hierfür wurde der OD_{600} -Wert der Übernachtskulturen vermessen und die Menge an Volumina berechnet, um die gewünschte OD_{600} in 100 ml LB-Flüssigmedium zu erhalten. Die Kulturen wurden bei 37°C auf dem Rotationsschüttler bei 180 rpm inkubiert und der OD_{600} -Wert aller 30 min gemessen. Bei einem OD_{600} -Wert von 0,3 wurde NFLX in den Endkonzentrationen 100, 200, 500 und 1000 ng/ml (Stammlösung 25 mg NFLX/ml Eisessig) zugegeben. Die Menge an zugegebenem Eisessig hatte dabei keinen Einfluss auf den pH-Wert der Flüssigkultur. Als Kontrolle wurde eine Flüssigkultur ohne Antibiotikum mitgeführt. Die optische Dichte wurde nach Induktion alle 30 min für insgesamt 5 h vermessen.

C 2.1.6 Induktionsexperimente mit dem *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933

Sechs 500 ml Erlenmeyerkolben mit je 100 ml LB-Flüssigmedium wurden parallel mit Bakterien der jeweiligen Übernachtskultur auf eine optische Dichte von $OD_{600}=0,05$ angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von $OD=0,3$ inkubiert (180 rpm, 37°C). Nach Zugabe von 200 ng/ml NFLX (Endkonzentration) zu 3 Kulturen (Experiment) wurden die Kulturen (3x Experiment und 3x Kontrolle ohne NFLX) für 120 Minuten inkubiert (180 rpm, 37°C) und im Anschluss wurde Gesamt-RNA isoliert. Das Induktionsexperiment wurde an einem weiteren Tag wiederholt. Zusätzlich wurde ein 3. Versuch jedoch ohne Antibiotikagabe durchgeführt (d.h. 6 Kontrollkulturen). Um den Einfluss von 200 ng/ml NFLX auf den *recA*-negativen Stamm *E. coli* O157H:H7 EDL933r (*recA*-) zu untersuchen, wurden ebenfalls Wachstumskurven erstellt.

C 2.1.7 Freisetzung von Phagen

Zur Gewinnung von infektiösen Phagenpartikeln (Phagenlysate) wurde 1 ml einer *E. coli* EDL933 Kultur für 5 min bei 13000 rpm und 4°C (Heraeus Zentrifuge, Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH) zentrifugiert. Zur Abtrennung restlicher Bakterien wurde der Überstand über einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilfiltriert (Spitzenvorsatzfilter, 0,22 µm; Qualilab). Das erhaltene Phagenlysate wurde in SM-Puffer so verdünnt, dass eine Plaqueanzahl zwischen 50 und 300 Plaques pro Platte zu erwarten war. Als Wirtstamm für den Plaque-Test wurde *E. coli* C600 verwendet. Zu 4 ml LB-Weichagar (48°C) wurden je 40 µl 1 M CaCl₂, 100 µl der C600-Kultur mit einer OD₆₀₀=0,6-0,8 und 100 µl des verdünnten Phagenlysates hinzugegeben, vorsichtig gemischt und im flüssigen Zustand gleichmäßig durch langsames Kreisen auf die LB-Platten verteilt. Nach Abkühlung des Weichagars wurden die Kulturen bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte durch Auszählen der im Bakterienrasen entstandenen Plaques. Der Phagentiter wurde in Plaque-bildenden Einheiten (PFU/ml) angegeben.

C 2.1.8 Isolierung von Phagen-DNA

In einem 1 Liter Erlenmeyerkolben wurden 200 ml LB-Flüssigmedium und 5 mM CaCl₂ mit Übernachtskulturen der Stämme EDL933 und C600(933W) auf eine OD₆₀₀=0,05 angeimpft und bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0,6-0,8 erfolgte die Induktion mit Mitomycin C (Endkonzentration 0,5 µg/ml) für 18 h, bei 37°C und 180 rpm. Es erfolgte eine nochmalige Zugabe von CaCl₂ (5 mM Endkonzentration). Das gesamte Volumen an Flüssigkulturen wurden am nächsten Tag in Zentrifugen-Becher (Centrifuge Bottles Assembly, Polypropylene 500 ml, Beckman Coulter) überführt und für 30 min bei 4°C mit 7470 g (Avanti™ Centrifuge HP-25, Rotor JA-10, Beckman Coulter) zentrifugiert. Die Überstände wurden über einen Faltenfilter (Ø 185 mm, 595^{1/2} S&S Folded Filters, Schleicher & Schuell) in frische Zentrifugenbecher überführt, DNase I und RNase A in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und für 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zum Ausfällen der DNA und RNA wurde 5,8% (w/v) NaCl hinzugegeben, vorsichtig bis zum Lösen invertiert und 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde für 10 min bei 4°C und 7470 g zentrifugiert und der Überstand in einen frischen Zentrifugenbecher überführt. Polyethylenglykol wurde in einer Endkonzentration von 10% (w/v) 6000 in jedes Gefäß gegeben und bei Raumtemperatur durch Schütteln gelöst. Zum Ausfällen der Phagen wurden die Proben anschließend für 1 h in Eiswasser inkubiert und für 30 min bei 4°C und 9950 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml SM-Puffer aufgenommen und als Phagenlysat bezeichnet. Die Gefäßwände der Zentrifugenbecher wurden mit 1 ml 2 x Proteinase K-Puffer mindestens für 2 min sorgfältig abgespült und dies zum Phagenlysat hinzugegeben. Die gesamte Suspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Das Phagenlysat wurde mit Proteinase K (Sigma) in einer Endkonzentration von 120 µg/ml für 1 h bei 56°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit jeweils ¼ des Volumens Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und für 5 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die Reaktionsgefäße wurden hierfür gründlich gemischt und die wässrige Phase in ein frisches Gefäß gegeben. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zu dieser Lösung wurde 1/10 des Volumens an 3 M Na-Ac (pH=7,2) und das doppelte Volumen an 100%-igem Ethanol hinzugegeben, gut gemischt und bei 4°C, 30 min und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70%-igen Ethanol gewaschen und zentrifugiert (4°C, 20 min und 14000 rpm). Nach der letzten Zentrifugation wurden Ethanolreste entfernt und das Pellet für 10 min bei 55°C getrocknet, in 100 µl Aqua_{bidest} (Braun) aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank gelöst. Die jeweiligen zusammengehörenden DNA-Lösungen wurden vereinigt und die Konzentration der Phagen-DNA vermessen.

C 2.1.9 Restriktion von Phagen-DNA

Je 1,6 µg an Phagen-DNA aus C 2.1.8 wurde einzeln mit *EcoRI* (MBI Fermentas) und *HindIII* (MBI Fermentas) sowie im Doppelverdau mit *EcoRI/HindIII* verdaut. Die Restriktion erfolgt in einem 30 µl Ansatz mit 5 Units Enzym und zugehörigem Puffer (Puffer B, MBI Fermentas) für 2 h bei 37°C. Durch eine anschließende Inkubation von 20 min bei 65°C wurden die Enzyme hitzeinaktiviert. Der gesamte Ansatz wurde gelelektrophoretisch ca. 18 h mit 2 V/cm aufgetrennt.

C 2.2 Gramfärbung und Elektronenmikroskopie

C 2.2.1 Gramfärbung

Fünzig µl der induzierten und nicht-induzierten EDL933-Flüssigkultur wurden auf einem Objektträger hitzefixiert und eine Gramfärbung mit dem Färbeautomaten MIDAS durchgeführt. Die Mikroskopie der Präparate erfolgte am Lichtmikroskop (AxioStar plus, Zeiss) mit dem Objektiv 100x/1,25 (CP-Achromat, Zeiss) und deren Dokumentation mit der AxioCam Mrc Kamera der Firma Zeiss. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem EDV-Programm Adobe Photoshop 5.0 (Adobe).

C 2.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der induzierten und nicht-induzierten Bakterienzellen erfolgte nach einer Induktionszeit von 120 min aus einer Verdünnung 10^{-1} in PBS. Die Vorbereitung der Proben und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit dem Institut für Anatomie (Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus) durch Fr. D. Streichert und U. Nimtschke durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurden 1 h auf Thermanox (Plastikblättchen), welche im Vorfeld mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden, bei RT adhäriert. Die Suspension wurde im Anschluss vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, Fixans (2,5% Glutaraldehyd in 0,1M PBS) hinzugegeben und über Nacht fixiert. Es erfolgte eine Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe. Nacheinander wurden hierfür die Thermanox-Plättchen mit 70%-, 90%-, 96%- und dreimal mit 100%-igen Ethanol ab gespült und anschließend im Wärmeschrank bei 37°C für 1 h getrocknet. Die Bedampfung mit Gold erfolgte im Med010 (Balzer Union, NL) für 70 s. Die Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop S430 (LEO Electron Microscopy, Cambridge, UK) angefertigt.

C 2.3 Polymerasekettenreaktion

Als Matrizen-DNA für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen dienten Bakteriensuspensionen (Einzelkolonie in 50 μ l 150 mM NaCl), isolierte chromosomale DNA, cDNA und bereits aufgereinigte PCR-Produkte. Für die PCR wurden 5 μ l der Bakteriensuspension bzw. 0,1–1 μ g DNA, je 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP (Promega), je 0,6 μ M Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1-fach konzentrierter Polymerase-Puffer (15 mM $MgCl_2$, Promega) und 1,5 Units Taq DNA Polymerase (Promega) in einem Endvolumen von 50 μ l Aqua_{bidest} (Braun) eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung von 10 min bei 95°C folgten 30 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt (95°C, 30 s), einem Annealingschritt (Temperatur und Zeit je nach Zielsequenz und Primerpaar in C 1.9 angegeben), einem Elongationssschritt (72°C, Zeit je nach Zielsequenz in C 1.9 angegeben) und einer finalen Elongation von 5 min bei 72°C. Nach der PCR wurden die PCR-Produkte wie in C 2.4 beschrieben elektrophoretisch zur visuellen Identifizierung und Auswertung aufgetrennt.

C 2.4 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden, da DNA auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückrad zur Anode wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für DNA-Fragmente von 100-500 bp 2%-ige und für DNA-Fragmente >500 bp 0,8%-ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die benötigte Menge an Agarose in 1-fach TAE durch Aufkochen gelöst, abgekühlt und in einem abgedichteten Elektrophoreseschlitten mit Taschenformer (Kamm) gegossen. Sowohl die nicht-denaturierende als auch die denaturierende Gelelektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern durchgeführt und die DNA, je nach Länge der Fragmente, bei 0,8-12 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1-fach TAE verwendet. Fünf µl Gelbeladungspuffer und ein Aliquot an DNA, je nach Fragestellung zwischen 5-30 µl (PCR-Produkt, genomische DNA oder Restriktion), wurden gemischt und aufgetragen. Die DNA wurde im Gel nach Ethidiumbromidfärbung mit Hilfe eines Transilluminators sichtbar gemacht und die Elektrophoreseergebnisse mit einem Gel Doc 2000 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) dokumentiert [Sambrook J. *et al.*, 1989].

C 2.5 Denaturierende Gelelektrophorese

Einzelsträngige RNA kann durch intra- und intermolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen und Aggregate ausbilden. Aus diesem Grund ist das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken erforderlich, um ein Auftrennen der RNA entsprechend ihres Molekulargewichts zu ermöglichen. Aldehydgruppen sind in der Lage, mit den Aminogruppen von Adenin und Guanin sowie Cytosin Schiff'sche Basen zu bilden, so dass die Aminogruppen dieser Basen nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu Verfügung stehen. Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA wurden deshalb 1,2%-ige Agarosegele mit 1-fach MOPS und 2% Formaldehyd verwendet. Die Agarose wurde in Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) -behandeltem Wasser aufgeköcht, nach Abkühlung MOPS-Puffer und Formaldehyd hinzugegeben und das Gel gegossen. Da Formaldehyd gesundheitsschädigend ist, wurden die Arbeiten unter dem Abzug durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1-fach MOPS verwendet. Zur Überprüfung intakter isolierter RNA wurde 1 µg Gesamt-RNA mit 5 µl Probenauftragungspuffer (Loading Dye, Fermentas GmbH) und 10 µl DEPC-Wasser gemischt, für 10 min

bei 70°C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Von dem als Größenstandard mitgeführten RNA Marker (RNA Ladder, high range, Fermentas GmbH) wurde 1,5 µg aufgetragen. Da in dem Probenpuffer bereits Ethidiumbromid enthalten war, entfiel das Anfärben der Gele.

C 2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Auf Grund der π -Elektronen der konjugierten Doppelbindung in den Basen von Nukleinsäuren absorbieren DNA und RNA ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei etwa 257 nm. Mit Hilfe der Absorptionsmessung kann die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren ermittelt werden. Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde über die Messung der Extinktion mittels einer Quarzglaszelle (70 µl, Schichtdicke 10 mm) bei einer Wellenlänge von OD_{260} mit dem Photometer „Gene Quant pro“ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus dem OD_{260} -Wert, der Verdünnung und einem für dsDNA (50), ssDNA (37) und RNA (40) spezifischen Multiplikationsfaktor [Mühlhardt, 2002; Sambrook J. *et al.*, 1989]. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über mögliche Proteinverunreinigungen der Lösung. Eine Nukleinsäurelösung mit geringen Proteinverunreinigungen weist einen OD_{260}/OD_{280} Quotienten von 1,8-2,0 auf.

C 2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „PCR-Purification Kit“ (Qiagen) laut Herstellerangaben. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Trennung wurden die Banden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die Gelstücke mit dem 3-fachen Volumen an QX1-Puffer (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen) versetzt und bei 50°C bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Die Probe wurde dann auf eine Qiagen Minisäule gegeben. Die weitere Aufreinigung erfolgte wie im „Purification Kit“ beschrieben. Die DNA wurde mit 20-50 µl Aqua_{bidest} (Braun) eluiert. Um genügend aufgereinigte DNA für nachfolgende Experimente zu erhalten, wurden in der Regel 6 PCR-Reaktionen durchgeführt, diese einzeln mittels Gelextraktion aufgereinigt, vereinigt und das Volumen mittels Vakuumkonzentrator (Maxi dry lyo, Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark) verringert.

C 2.8 RNA-Methoden

C 2.8.1 Umgang mit RNA und RNasen

Die meisten RNasen benötigen als Cofaktoren keine Kationen und sind nur aus einer Polypeptidkette aufgebaut, was zur Folge hat, dass sie bei Hitzeeinwirkung zwar denaturieren, beim Abkühlen jedoch renaturieren und somit nach wie vor katalytisch aktiv sein können. Die verbreitetste Methode, um RNase-freie Lösungen zu erhalten, ist die Behandlung der Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC). DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, unter anderem auch an wichtige Histidin-Seitenketten in den aktiven Zentren von RNasen, die dadurch irreversibel inhibiert werden. Aus diesem Grund sollten jedoch Lösungen, die sekundäre und primäre Amine enthalten, wie z. B. MOPS und Tris nicht mit DEPC-behandelt werden. DEPC wurde in einer Endkonzentration von 0,1% den Lösungen zugegeben und über Nacht gerührt. DEPC kann nachfolgende Experimente beeinflussen, da eventuell Purinbasen der RNA durch Carboxymethylierungen kovalent modifiziert werden könnten. Die Inaktivierung von DEPC erfolgte durch dessen Hydrolyse während des Autoklaviervorgangs der Lösungen von mindestens 20 min. Einige Lösungen wurden bereits mit DEPC-behandeltem Wasser (z.B. MOPS) hergestellt, falls ein Einstellen des pH-Wertes nötig war, wurde die pH-Elektrode vorher gesäubert, um mögliche RNasen zu inhibieren. Die Elektrode wurde hierfür mit DEPC-Wasser gespült, für 30 s in 70%-igem RNase-freiem Ethanol, anschließend 5 min in 1 M NaOH (DEPC-behandelt) getaucht und mit DEPC-behandeltem Wasser gespült und erst dann der pH-Wert der Lösung vermessen. Glaswaren, wie Erlenmeyerkolben und Glasflaschen wurden mindestens 5 Stunden bei 200°C im Trockenofen erhitzt, um mögliche RNasen zu entfernen. Um die Gel-elektrophoresekammer von RNasen zu befreien, wurde diese mit 1% SDS, für 10 min mit 3% H₂O₂ und mit DEPC-Wasser gespült. Im Anschluss wurde die Kammer mit RNaseZap (Ambion o. Sigma) gereinigt und erneut mit DEPC-behandeltem Wasser gespült. Für RNA-Arbeiten wurden RNase freie Einmalpipetten und Tubes (15 ml u. 50 ml Röhrchen, 5/10/25 ml Einmalpipetten, DNase und RNase frei, Greiner; 1,5 ml Reaktionsgefäße DNase und RNase frei, Biozyme) verwendet. Chemikalien, Pipetten, Lösungen und Elektrophoresekammern wurden ausschließlich für Arbeiten mit RNA verwendet. Arbeitsplätze und Plastikwaren wurden mit RNaseZap laut Herstelleranweisung gereinigt.

C 2.8.2 Gesamt-RNA Isolierung

Je 50 ml der induzierten Bakterienkulturen aus C 2.1.6 wurden in 50 ml Röhren überführt und 5 min bei 3740 x g, 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) zentrifugiert. Jeweils 5 ml des Überstandes wurden für den nachfolgenden Shiga-Toxin ELISA (ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* Microplate Assay, Alexon Trend) aufbewahrt und der restliche Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden bei -80°C gelagert oder sofort Gesamt-RNA isoliert. Zu dem im RNeasy Kit (Qiagen) befindlichen RLT-Puffer wurde vor Beginn der RNA-Isolierung 1% (w/w) β -Mercaptoethanol (14,3 M) hinzugegeben.

Das Bakterienpellet wurde in 1 ml RLT-Puffer durch Mischen gelöst. Die Suspension wurde in „Biopulverizer FastRNA-Blue Tubes“ (BIO101) überführt und für 45 s bei Stufe 6.5 mechanisch in einem Fast Prep® Instrument (Qbiogen) geschreddert und anschließend bei 13000 rpm (Microfuge 18 Centrifuge, Beckmann Coulter™, GmbH-Biomedical Research, Krefeld) für 3 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in 15 ml Röhren, in denen bereits 4 ml RLT-Puffer vorgelegt waren, überführt. Nach Zugabe von 2,8 ml RNase-freiem Ethanol (Ethanol absolut, Spektranal, Sigma) wurde die Lösung gemischt, in die im Kit befindlichen RNeasy Midi Säulen überführt und für 5 min bei 3740 x g zentrifugiert. Die weiteren Isolierungsschritte wurden nach Angaben des Hersteller mit dem Protokoll „Protocol Bacteria“ (RNeasy Kit, Qiagen) durchgeführt. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte zweimal mit je 250 μ l DEPC-behandeltem destillierten Wasser. Erfolgte die Zellyse mittels Lysozym wurde das Bakterienpellet mit 1 ml Lysozym (1 mg Lysozym/ml TE-Puffer, pH=8) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 4 ml RLT-Puffer hinzugegeben und für 5 min 3740 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 2,8 ml Ethanol hinzugegeben und auf die Säulen des Kits gegeben und RNA wie bereits beschrieben isoliert.

C 2.8.3 Gesamt-RNA Aufreinigung

Die RNA aus C 2.8.2 wurde in einem Gesamtvolumen von 600 μ l mit 0,1 M Na-Ac (pH=5, DEPC-behandelt), 0,05 M $MgCl_2$ (pH=5, DEPC-behandelt) und 120 Units DNase I (RNase-frei; Roche) für 60 min bei 37°C inkubiert, um vorhandene DNA zu entfernen. Der Restriktionsansatz wurde mittels RNeasy Midi Säulen (RNeasy Kit, Qiagen) aufgereinigt. Hierfür wurde dieser in 15 ml Röhren, in denen bereits 4 ml RLT-Puffer und 2,8 ml RNase-freies Ethanol vorgelegt wurden, überführt, gemischt und auf RNeasy Midi Säulen des Kits gegeben. Die weitere Behandlung erfolgte wie im Kitprotokoll beschrieben. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte zweimal mit je 250 μ l DEPC-behandeltem destillierten Wasser. Die drei RNA-Proben der Experimente

und die drei RNA-Proben der Kontrollen des jeweiligen Versuches wurden vereinigt und so ein Gesamtvolumen von ca. 1500 µl Experiment-RNA- und Kontroll-RNA-Lösung erhalten. Für weitere Arbeitsschritte wurde das Volumen der RNA-Lösungen durch Eindampfen des Wassers bei maximal 30°C in einem Vakuumkonzentrator (Maxi dry Iyo, Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark) verringert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch gemessen und die Qualität der RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese beurteilt. Eindeutige und klare Banden im Bereich 1,5 Kb für 16S-rRNA und 2,9 Kb für 23S-rRNA zeigen das Vorhandensein von intakter, nicht-degradierter RNA an.

Erfolgte die Aufreinigung der RNA mit Phenol-Chloroform wurde der Restriktionsansatz mit einem Volumenanteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) für 20 s gemischt und für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit einem Volumenanteil Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt, erneut zentrifugiert und anschließend mit 1/10 Volumenanteil 3 M NaCl und 2 Volumenanteilen 100%-igem Ethanol 20 min auf Trockeneis inkubiert und 10 min bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 70%-igem eiskalten Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in ca. 80 µl DEPC-behandeltem Aqua_{bidest} aufgenommen.

C 2.8.4 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Die Synthese von markierter cDNA aus Gesamt-RNA für eine komplexe Hybridisierung mit Mikroarrays erfolgte durch Reverse Transkription mittels RNA abhängiger DNA-Polymerase (reverse Transkriptase). Zu dem wurden Random Primer, die als Startpunkt der reversen Transkriptase fungieren (Hexamerprimer), und fluoreszenzmarkierte Desoxynukleotide verwendet.

Die cDNA-Synthese wurde nach Anleitung der Firma MWG "Bacteria MWG-Application Guide" in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Zu 50 µg Gesamt-RNA, in einem Volumen von 6 µl DEPC-behandeltem Aqua_{bidest}, wurden 3 µl Random Primer (3 µg/µl, Invitrogen) hinzugegeben, 10 min bei 65°C und weitere 10 min bei RT inkubiert und abschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Zu diesem RNA-Primer-Gemisch wurden 2 µl eines dNTP-Mixes (je 5 mM dATP, dGTP, dTTP, und 2 mM dCTP, Invitrogen), 4 µl des 5-fach konzentrierten Reaktions-Puffers (Invitrogen), 2 µl 100 mM DTT (Invitrogen), 2 µl von 1mM „cyanine 3-dCTP“ (cy3-dCTP+RNA_K) oder 2 µl von 1 mM „cyanine 5-dCTP“ (cy5-dCTP+RNA_E) und 1 µl Superscript II H⁻ (Invitrogen, 10 Units) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 2 h bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion abzuhalten und die RNA zu degradieren, wurden 5 µl einer 1 M NaOH zu den Proben hinzugegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. Zur Neutralisierung wurden 5 µl einer 1 M HCl und 200 µl TE-Puffer (pH=7,5) zu dem Mix gegeben. Um Unterschiede der

Einbauraten (Einbaueffizienz) der beiden Farbstoffe zu kontrollieren, wurden Experiment und Kontrolle entgegengesetzt (revers) markiert (cy3-dCTP+RNA_E und cy5-dCTP+RNA_K). Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit dem „PCR-Purification Kit“ (Qiagen) laut Herstellerangaben. Nach Zugabe von 1200 µl PB-Puffer (Kit) wurde nacheinander das gesamte Volumen auf die Säulen des Kits beladen und für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden laut Kitprotokoll durchgeführt. Die Elution der cDNA erfolgte mit zweimal mit 40 µl Aqua_{bidest} (Braun). Zur Bestimmung der cDNA-Konzentration, des Salzgehaltes und der Reinheit wurde die cDNA unverdünnt photometrisch vermessen (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech). Die Konzentrationsberechnung der cDNA erfolgte unter Einbeziehung des Multiplikationsfaktors 37, da die reverse Transkriptase einzelsträngige DNA (ssDNA) synthetisiert. Da die Farbstoffe lichtempfindlich sind, wurden die Proben bei allen Arbeitsgängen vor Lichteinwirkung geschützt. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese für die Real-Time PCR wurde wie beschrieben durchgeführt, jedoch ohne Einbau der fluoreszenzmarkierten dCTPs. Für diese reverse Transkriptionsreaktion wurden je 5 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP eingesetzt.

C 2.9 Hybridisierung, Scannen und Analyse des O157-Arrays

Die Vorgehensweise der Hybridisierung wurde dem Protokoll „Bacteria Manual“ (http://ecom2.mwgdna.com/download/arrays/manuals/manual_bacteria.pdf) entnommen. Die cy3-markierte cDNA (C 2.8.4) vom Experiment (cy3cDNA_E) und die cy5-markierte cDNA der Kontrolle (cy5cDNA_K), bzw. cy5cDNA_E und cy3cDNA_K für die reverse Markierung, wurden in gleichen Mengen (3200 ng von Experiment und Kontrolle) in einem Reaktionsgefäß vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator (Heto Lab) zu einem glasigen Pellet getrocknet. Die markierte cDNA wurde in 250 µl Hybridisierungspuffer (42°C) (MWG Biotech AG) gelöst und zur Denaturierung 3 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Diese Mischung wurde an zentrifugiert, auf den O157 Array (MWG Biotech AG) pipettiert und mit dem auf dem O157 befindlichen Oligonukleotiden hybridisiert. Zu Beginn wurde auf den O157 Array ein „Gene-Frame“ (beidseitiger Kleberahmen mit Größe des Spottingbereiches, MWG Biotech AG) aufgeklebt, der die Hybridisierungsfläche markiert. Die obere Folie wurde abgezogen und die Hybridisierungslösung innerhalb der Abgrenzung des „Gene Frames“ pipettiert. Ein „Polyester Cover Slip“ (MWG Biotech AG) wurde auf eine Seite des Rahmens geklebt und langsam an das andere Ende geführt. Dabei erfolgte eine gleichmäßige Verteilung der Hybridisierungslösung. Mit einem stumpfen Gegenstand wurde der „Cover Slip“ angedrückt, ohne jedoch die Hybridisierungsebene zu berühren. Innerhalb der Hybridisierungsebene durften sich keine Luftblasen befinden. Der Array wurde in eine

feuchte Hybridisierungskammer (CMT™ Hybridisierungskammern, Corning) überführt und über Nacht bei 42°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der O157 Array aus der Hybridisierungskammer entfernt und der „Gene Frame“ vorsichtig mit einem Skalpell entfernt, ohne dabei die Hybridisierungsfläche zu berühren. Es wurde sofort mit dem Waschen der O157 Arrays begonnen. Die Arrays wurden unter stringenten Bedingungen je 5 min mit steriltfiltriertem, auf 30°C temperiertem Waschpuffer 1 (2-fach SSC, 0,1% SDS), Waschpuffer 2 (1-fach SSC) und Waschpuffer 3 (0,1-fach SSC) gewaschen. Durch Zentrifugation von 2 min bei 500 g in einem 50 ml Röhrchen wurde der Arrays getrocknet. Die Arrays wurden bis zum Scannvorgang lichtgeschützt gelagert. Das Scannen der Arrays wurde in Zusammenarbeit mit der Firma MWG in Ebersberg durchgeführt. Für eine optimale Auswertung der Spotintensitäten wurden die Arrays in den Photo Multiplier Tube (PMT) Stufen 35, 45, und 55 mit einem Affymetrix 428 Scanner (Affymetrix) gescannt. Nach dem Scannen der Arrays wurden die erhaltenen Rohdaten mit der BioDiscovery ImaGen™ 5.0 Image Processing Software analysiert. Mit Hilfe der Software wurde ein Rasterfeld für jeden Array erstellt, um die Spots optimal auswerten zu können. Fehlerhafte Spots, z. B. durch Verschmutzung, wurden von der Analyse ausgeschlossen (flag-spots). Für jeden Spot und dessen Hintergrund wurden die Fluoreszenzintensitäten für beide Farbstoffe cy3 (Kanal 550 nm) und cy5 (Kanal 650 nm) gemessen.

Die weiteren Mikroarrayanalysen wurden mit der Software MAVI (MWG Biotech AG) durchgeführt. Durch MAVI wurde der dynamische Messbereich vergrößert und gleichzeitig Sättigungsprobleme der Spots vermieden. Die Software ermittelte den Anstieg der Fluoreszenzintensität eines jeden Spots bei den jeweiligen PMT Stufen und so konnten Daten für schwache bzw. gesättigte Spots extrapoliert werden. Von diesen erhaltenen Daten wurde mittels linearer Regression die Spotintensität für eine bestimmte PMT-Stufe errechnet. Um Unterschiede in der Probenaufarbeitung, beim Scannen und der Einbaueffizienz zu korrigieren, wurden die Daten durch MAVI normalisiert. In den hier durchgeführten Analysen wurde die Fluoreszenzintensität von cy3 gegenüber cy5 normalisiert (nI_{c3}), da die Einbaueffizienz von cy5 im Vergleich zu cy3 schlechter ist.

Für jeden Array wurde der Mittelwert (MW) der Fluoreszenzintensität des Hintergrundes von jedem Spot und die Standardabweichung des mittleren Hintergrundes (Std) für beide Kanäle errechnet. Die Summe des Mittelwertes und der 2-fachen Standardabweichung für jeden Kanal wurde als Intensitäts-cut (I_{cut}) (Intensitätsschnitt) bezeichnet. Für weitere Datenanalysen wurden nur die Spots herangezogen, bei denen die Fluoreszenzintensität in einem der beiden Kanäle über dem I_{cut} lag. Diese Berechnung wurde für jeden Array durchgeführt. In die abschließende Auswertung wurden

nur die Spots einbezogen, die in der Schnittmenge aller Arrays der jeweiligen Versuchsreihen enthalten waren. Der Quotient der Fluoreszenzintensität von Experiment und Kontrolle wurde für jeden Spot berechnet und stellt die „normalisierte Ratio“ dar. Je nach Markierung wurde der Quotient (Ratio) aus der normalisierten Fluoreszenzintensität von cy3 (nIc3) und der Fluoreszenzintensität von cy5 (Ic5), bzw. umgekehrt errechnet. P-Werte der Ratios der Experiment- und Kontrollgruppe wurden mit dem T-Test unter Verwendung der Software Expressionist™ (Genedata, Basel, Schweiz) berechnet.

C 2.10 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse von PCR-Produkten über die Messung von Fluoreszenzsignalen. Bei der hier durchgeführten Real-Time PCR wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, dessen Fluoreszenzintensität bei Anlagerung an doppelsträngige PCR-Produkte nach Anregung durch Lichtsignale steigt, quantifiziert. Die Auswertung der Analyse erfolgte über die Messung von Ct-(Threshold Cycle) Werten. Der Ct-Wert gibt dabei die Zyklenzahl an, bei der ein Anstieg des Fluoreszenzsignals deutlich über dem Grundrauschen zu verzeichnen ist. Die Real-Time PCR wurde in einem Endvolumen von 20 µl in Glaskapillaren in einem LightCycler Gerät (Roche) mit dem FastStart DNA Master Kit SYBR GreenI (Roche Diagnostics) mit einer Konzentration von 4 mM MgCl₂ und je 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer laut Herstelleranweisung durchgeführt. Es wurde aus den Reagenzien ein Mastermix hergestellt, auf die Kapillaren verteilt (je 18 µl) und Template-DNA (2 µl) hinzugegeben. Das Temperaturprofil für die Real-Time PCR wurde an das „Instruction Manual“, Abschnitt 3 Experimental Protocol, (FastStart DNA Master Kit SYBR GreenI) angelehnt und wie folgt gewählt: Vorinkubation 95°C für 10 min, Amplifikation 40 Zyklen mit 95°C für 10 s, 55°C für 5 s und 72°C für 10 s. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurve der Amplifikate durch Erhitzen auf 95°C, Abkühlen auf 65°C und erneutes kontinuierliches Erhitzen auf 95°C (0,1°C/s) erstellt. Nach dem LightCycler Lauf wurden der PCR-Ansatz aus den Kapillaren durch Zentrifugieren (1 min, 2000 rpm) entnommen und die Spezifität der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (1% Agarosegel) überprüft.

C 2.10.1 Erstellung der Standardkurven

Die Standardkurven wurden aus seriellen Verdünnungen (1:10) der cDNA von EDL933 erstellt. Für jede Verdünnung wurde eine Kopienzahl festgelegt. Der Mastermix wurde in die Kapillaren gegeben und 2 µl der seriellen Verdünnungsstufen für die Real-Time PCR eingesetzt. Es wurden Standardkurven für die Gene *serC*, *stxA₂*, *stxB₂*,

stxA₁, *stxB₁*, *recA*, *uvrD* und *pgi* erstellt. Der Mastermix für die Gene *serC*, *uvrD*, *recA* und *pgi* wurde mit Microcon-Säulen (Amicon) laut Vorschrift aufgereinigt. Zur Erstellung der Standardkurve wurden die jeweiligen Ct-Werte gegen die Kopienzahlen für jedes Gen mit Hilfe der LightCycler Software aufgetragen.

Die Auswertung aller LightCycler Läufe erfolgte mit der Fit-Point Methode (LightCycler Software Version 3.5 Roche, beschrieben im LightCycler Manual LightCycler operator's manual, version 3.0 Mai 1999). Die Grundfluoreszenz (Hintergrund) kann bei unterschiedlichen Proben auf Grund von Matrixeffekten variieren. Die Fit Point Methode ermöglicht einen Vergleich verschiedener Proben. Durch manuelles Festlegen der Grundlinienfluoreszenz („Baseline“) und der „Noise Band“, sowie der „Fit Points“ (Datenpunkte) werden nichtinformativ Fluoreszenzwerte aus der Analyse ausgeschlossen, die Grundlinie für alle Proben auf den Wert „0“ gesetzt und nur Werte aus der exponentiellen Amplifikationsphase verwendet (nicht aus der Plateau-Phase).

C 2.10.2 Quantifizierung der cDNA

Die relative Quantifizierung der ausgewählten Gene wurden mit je 2800 pg synthetisierter cDNA der Kontroll- (cDNA_K) bzw. Experimentproben (cDNA_E) durchgeführt. Von der synthetisierten cDNA wurde dafür die Konzentration bestimmt und aus einer 1:100 Verdünnung in Aqua_{bidest} (C 2.8.4) das benötigte Volumen errechnet, um 2800 pg zu erhalten. Der Mastermix (vgl. C 2.10) wurde in die Kapillaren überführt und das Volumen für 2800 pg an cDNA-Lösung hinzugegeben (zwischen 1,9-2,4 µl). Der Mastermix für die Gene *serC*, *uvrD*, *recA* und *pgi* wurde ebenfalls mit Microcon-Säulen (Amicon) aufgereinigt.

C 2.11 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit dem Genomic-tip 100/G und Genomic DNA Buffer-Set (Qiagen) nach Herstelleranweisung isoliert. *E. coli* C600(933W), C600(H-19J) und C600 wurden aus einer Übernachtskultur auf eine optische Dichte von OD₆₀₀=0,05 in 50 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀=0,6-0,8 bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Drei ml der Kulturen wurden für 10 min bei 3740 x g (Heraeus Varifuge 3.0R) zentrifugiert und die genomische DNA laut Protokoll für Bakterien isoliert. Das durch Isopropanolfällung gereinigte DNA-Pellet wurde je nach isolierter Menge in ca. 50 bis 100 µl Aqua_{bidest} aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch, die Qualität visuell nach gelektrophoretischer Trennung (0,7%-iges Agarosegel, 12 h, 30 V) bestimmt.

C 2.12 Southern Blot

C 2.12.1 Sondenherstellung

Für die Herstellung der *stx*₁-Sonde für die Plaquehybridisierung und das Dot-Blot Verfahren wurde das *stx*₁-PCR-Produkt (KS7/KS8) und das *stx*₂-PCR-Produkt (GK3/GK4) mittels Gelextraktion (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die DIG-DNA-Markierung wurde laut Angaben im „DIG DNA-Labeling and Detection Kit“ (Roche) in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Die empfohlenen Menge an DNA ist laut Herstellerangaben zwischen 10 ng-3 µg DNA. Die Konzentration an PCR-Produkt wurde auf ein Volumen von 15 µl berechnet. Wurde die empfohlene Menge an DNA in 15 µl erreicht, erfolgte die Markierungsreaktion. Zu 15 µl der PCR-Produkte der *stx*₁- bzw. *stx*₂-PCR wurden 2 µl 10-fach konzentrierte Hexanukleotide, 2 µl dNTP Labeling Mix und 1 µl Klenow Enzym hinzugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl einer 0,2 M EDTA (pH=8) abgestoppt. Die gesamte Menge an Sonde wurde für die Hybridisierungsreaktionen eingesetzt (C 2.12.2 und C 2.12.3).

C 2.12.2 Dot-Blothybridisierung

Zur Etablierung von Positiv- und Negativkontrollen für nachfolgende Plaque- und Dot-Blothybridisierungen wurden je 100, 500 und 1000 ng genomische DNA von C600, C600(H-19J) und C600(933W), sowie 100, 500 und 1000 ng *stx*₁ und *stx*₂ PCR-Produkt in einem Endvolumen von 5 µl bzw. von 10 µl Aqua_{bidest} (für 1000 ng genomische DNA, 1000 ng *stx*₁ und *stx*₂-PCR) auf eine Transfermembran (Roti®-Nylon plus, Roth) aufgetropft und unter einer Sterilbank getrocknet. Die Membran wurde 2 min denaturiert (Denaturierungspuffer, C 1.6.2), 4 min neutralisiert (Neutralisierungspuffer, C 1.6.2) und 30 s gespült (Spülpuffer, C 1.6.2). Hierfür wurde Whatman Papier mit den jeweiligen Puffern getränkt und die Membran aufgelegt. Um die DNA zu fixieren wurde die Membran auf ein mit 2-fach SSC getränktes Whatman gelegt, 30 s mit 120 mJ UV-bestrahlt (UV-Crosslinker, Bio-Link type BIX) und getrocknet. Die Membran wurde in Hybridisierungsröhrchen (Biometra) überführt und mit 20 ml (10 ml/100cm²) auf 68°C temperierten Hybridisierungspuffer (C 1.6.2) 30 min im Hybridisierungsöfen (Hir10M, Grant Boekel) bei 68°C und unter Drehen (Stufe 3) inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde verworfen, zu der im Röhrchen befindlichen Membran 3,5 ml Hybridisierungs-Sonden-Gemisch hinzugegeben und über Nacht bei 68°C und unter Drehen (Stufe 3) inkubiert. Für die Herstellung des Hybridisierungs-*stx*₁-Sonden-Gemisches wurde die *stx*₁-Sonde (C 2.12.1) für 5 min aufgekocht, kurz

auf Eis abgekühlt, zu 3,5 ml Hybridisierungspuffer hinzugegeben und bei 68°C temperiert. Die Membran wurde ca. 18 h inkubiert.

C 2.12.3 Plaquehybridisierung

Eine Nylonmembran wurde auf die Form und Größe von Petrischalen zugeschnitten. Im oberen Drittel der Membran wurden je 100 ng *stx*₁ und *stx*₂-PCR-Produkt in einem Endvolumen von 6 µl Aqua_{bidest} aufgetropft und unter der Sterilbank getrocknet (Dot-Blot). Der Membranabschnitt mit der aufgetropften DNA wurde mit einer Folie abgedeckt. Die Membran wurde dann für 2 min auf LB-Platten mit Plaques aufgelegt, um den Transfer der Phagenpartikel auf die Membran zu ermöglichen. Für einen weiteren Transfer auf eine zweite Membran wurde diese 4 min auf der LB-Platte belassen. Zur Markierung und für eine spätere Zuordnung wurde die Membran mit einem Skalpell unsymmetrisch am Rand eingeschnitten und am Rand der Platte die Schnittstelle mit einem Stift markiert. Die Membran wurde entfernt, 2 min denaturiert (Denaturierungspuffer, C 1.6.2), 4 min neutralisiert (Neutralisierungspuffer, C 1.6.2) und 30 s gespült (Spülpuffer, C 1.6.2). Die weiteren Schritte sind bereits in C 2.12.2 beschrieben bzw. dem Kitprotokoll zu entnehmen. Die Membran wurde ebenfalls in Hybridisierungsröhrchen überführt und mit 20 ml des auf 68°C temperierten Hybridisierungspuffer 30 min im Hybridisierungsofen bei 68°C und unter langsamen Drehen inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde verworfen, zu der im Röhrchen befindlichen Membran wurden 3,5 ml Hybridisierungs-Sonden-Gemisch (*stx*₁ bzw. *stx*₂) hinzugegeben und bei 68°C inkubiert.

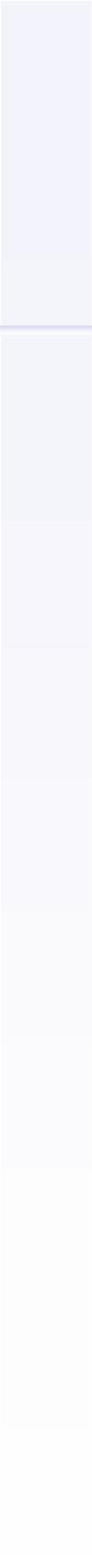
C 2.12.4 Waschen und Detektion

Die Membran wurde in den Röhrchen zweimal mit je 25 ml 2-fach SSC; 0,1% SDS bei RT und anschließend zweimal 15 min bei 68°C mit 25 ml temperiertem Puffer 0,5-fach SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die weiteren Waschschrte sind dem „DIG DNA-Labeling and Detection Kit“-Protokoll entnommen und die Menge an Puffer auf die Größe der Membran berechnet. Durch Zugabe von Farbsubstratlösung erfolgte die Detektion, ein Farbumschlag war nach ca. 60 min zu erkennen. Die Reaktion wurde mit Aqua_{bidest} abgestoppt und die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mittels Fotografie.

C 2.13 Freisetzung von Shiga Toxin

Die Freisetzung von Shiga Toxin wurde mit einem kommerziell erhältlichen ProSpect T Shiga Toxin *E. coli* (STEC) EIA (Alexon Trend, USA) ermittelt. Der Test beruht auf dem Prinzip des Fest-Phasen Enzym Immunoassays. Anti Shiga Toxin 1 und 2 Antikörper sind an die Festphase gebunden. Enthält die Probe Shiga-Toxin, bindet dieses an die Antikörper. Monoklonaler anti-*E. coli* Shiga Toxin Antikörper, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Enzym-Konjugat), wird hinzugegeben, eventuell gebundenes Toxin bindet diesen enzymgekoppelten Antikörper. Nach Substratzugabe kommt es zu einer Farbreaktion durch vorhandene Enzymaktivität. Die für den Plaquetest gewonnen sterilfiltrierten Kulturüberstände dienten neben dem Nachweis von Phagen auch dem Nachweis von Shiga Toxin. Insofern der ELISA nicht sofort durchgeführt wurde, wurden Aliquote der Überstände bei -20°C eingefroren. Der Test wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Für eine bessere Interpretation der Ergebnisse wurde die Vorschrift dahingehend modifiziert, dass die Zugabe der einzelnen Chemikalien und Proben als definiertes Volumen ($200\ \mu\text{l}$) erfolgte. Die Extinktion in den Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde bei $450\ \text{nm}$ im „Microplate Scanning Spectrophotometer“, PowerWave 200 (Bio-Tek Instruments) gemessen. Die Verdünnung der Kulturüberstände im „Bacterial Specimen Dilution Buffer“ (ProSpect T Shiga Toxin *E. coli*) wurde so gewählt, dass die gemessene Extinktion einen Wert von $E_{450}=4,0$ nicht überschritt. Bei jedem Test wurde ein Negativ- und eine Positiv-Kontrolle (ProSpect T Shiga Toxin *E. coli* (STEC)) mitgeführt. Der EIA wurde nur ausgewertet, wenn die Extinktion der Negativkontrolle $E_{450} < 0,100$ und die der Positivkontrolle $E_{450} > 0,500$ betrug.

Ergebnisse

A decorative vertical bar on the right side of the page, composed of several stacked rectangular segments in a light blue color.

D Ergebnisse

D 1 Effekte von Norfloxacin auf *E. coli* O157:H7

D 1.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Empfindlichkeit von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 gegen das Antibiotikum Norfloxacin (NFLX) wurde in 3 verschiedenen Ansätzen mit der Bouillon-Dilutionsmethode im Röhrchen bestimmt. Die Makrodilutionsmethode gilt dabei als Referenzmethode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die Konzentration, bei der kein makroskopisch sichtbares Wachstum stattfindet, stellt die MHK dar. Die beimpfte, wirkstofffreie und bei 4°C inkubierte Probe (Negativkontrolle) fungierte als Vergleichsmuster für die visuelle Einschätzung der vollständigen Wachstumshemmung. Für die Bestimmung der MHK wurde aus der Stammlösung von 32 mg NFLX/ml in Eisessig eine Arbeitslösung von 32 µg/ml in Mueller-Hinton-Bouillon hergestellt. Die Menge an verwendetem Eisessig hatte keinen Einfluss auf den pH-Wert der Kultur und dementsprechend auch keine Auswirkungen auf die MHK-Bestimmung. Dies wurde in einem Ansatz ohne Wirkstoffkonzentration, jedoch mit der entsprechenden Menge an Eisessig (1 µl Eisessig auf 1000 µl Bouillon) untersucht. Als MHK für *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wurde in den Versuchen I-III 250 ng/ml ermittelt (Tabelle D 1). Die durch den Etest® ermittelte minimale Hemmkonzentration für EDL933 wurde zu 125 ng/ml bestimmt. Hierfür wurden 5×10^5 KBE/ml *E. coli* O157:H7 auf Mueller-Hinton Platten ausgestrichen, der NFLX Etest® Streifen aufgelegt und bei 37°C 18 h inkubiert. Die Bestimmung der MHK erfolgte visuell. Der Bereich der kompletten Wachstumsinhibition, d.h. der Schnittpunkt des Hemmhofes mit dem Etest® Streifen, ergibt die MHK (Abbildung D 1).

Tabelle D 1: Empfindlichkeitsprüfung von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 gegen NFLX mit der Makro-Bouillondilutionsmethode.

	Endkonzentration NFLX µg/ml ¹ im Teströhrchen										
	16,0	8,0	4,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016
Versuch I	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Versuch II	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Versuch III	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

¹) -: kein makroskopisches Wachstum sichtbar (keine Trübung), +: makroskopisches Wachstum sichtbar (Trübung)

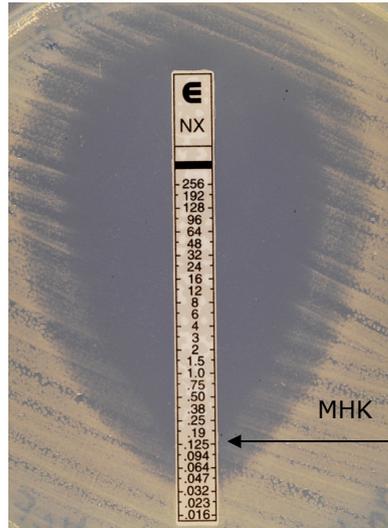


Abbildung D 1: Bestimmung der MHK von NFLX für EDL933 mit dem Etest. Der Schnittpunkt des innenliegenden Hemmhofes am Teststreifen (Punkt der kompletten Wachstumsinhibition) gibt die MHK an (125 ng/ml).

D 1.2 Induktion von *E. coli* O157:H7 EDL933 mit verschiedenen Norfloxacinkonzentrationen

Um den Einfluss verschiedener Norfloxacinkonzentrationen auf *E. coli* O157:H7 zu untersuchen, wurde der Stamm EDL933 bei einer $OD_{600}=0,3$ mit 100, 200, 500 und 1000 ng/ml NFLX induziert und die optische Dichte im 30-minütigen Abstand gemessen. Die daraus resultierenden Wachstumskurven sind in der Abbildung D 2 und die Messdaten in Tabelle Anhang A 1 dargestellt. Zum Vergleich wurde eine Kontrolle ohne Antibiotikazugabe mitgeführt. Nach 60 und 120 min Induktion wurde die Shiga Toxin-Freisetzung mittels des kommerziellen ELISA „ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* Microplate Assay“ (Alexon Trend) bestimmt. Bereits nach den ersten 30 Minuten Inkubation konnte eine deutliche Reduktion der OD_{600} um 0,3 log-Stufen bei den mit 500 und 1000 ng/ml induzierten Kulturen im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle verzeichnet werden (Abbildung D 2). In den ersten 60 min nach Induktion wurde bei den Konzentrationen von 100 und 200 ng/ml NFLX keine Reduktion der OD_{600} im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Nach weiteren 30 min Inkubation wurde eine vorerst schwache Reduktion der OD_{600} beobachtet, in den darauffolgenden Minuten sanken die OD_{600} -Werte der mit 100 und 200 ng/ml induzierten Kulturen um ca. 0,2 log-Stufen ab. Die OD_{600} -Werte der Kulturen mit den höheren Norfloxacinkonzentrationen nahmen im Verlauf der Wachstumskurve ebenfalls weiter ab. Die Auswertung der Stx-Freisetzung der induzierten Kulturen ergab, dass nach einer Inkubationszeit von 60 min in keiner der induzierten Kulturen eine gesteigerte Stx-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle

verzeichnet werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 120 min konnte bei den mit 100 ng/ml und 200 ng/ml NFLX induzierten Kulturen ein deutlicher Anstieg an freiem Stx im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Auf Grund der ermittelten MHK von 250 ng/ml und dem Ergebnis der Stx-Freisetzung wurde bei den nachfolgenden Induktionsexperimenten mit einer Konzentration von 200 ng/ml NFLX gearbeitet. Diese gewählte Konzentration induziert eine Stx-Freisetzung und hemmt gleichzeitig das Bakterienwachstum im Verlauf der Induktion nur geringfügig.

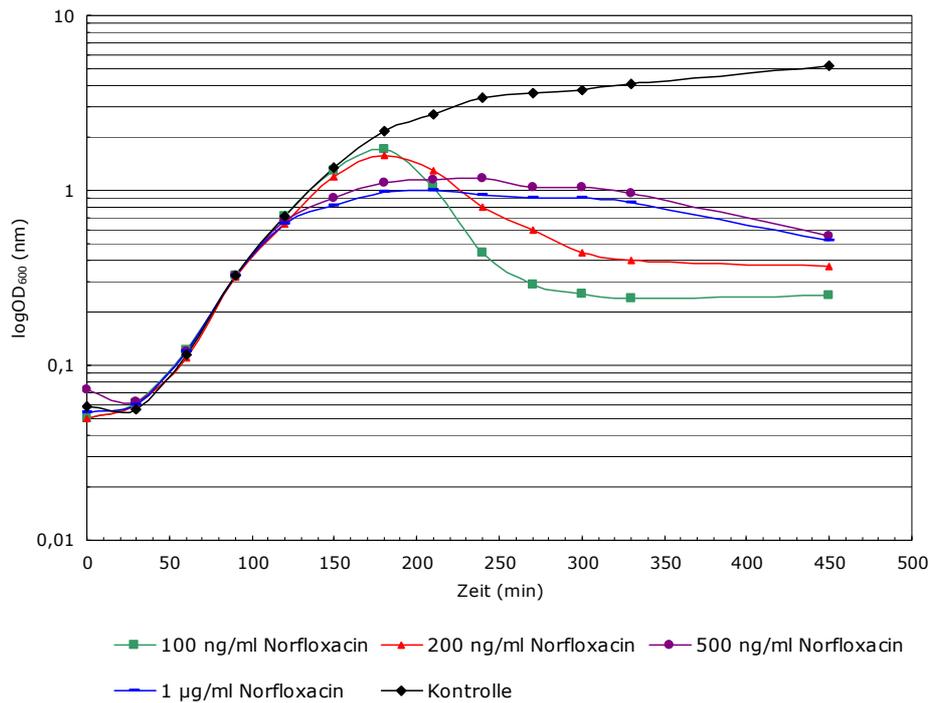


Abbildung D 2: Wachstumskurven von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 nach Induktion mit 100, 200, 500 und 1000 ng/ml NFLX (pH=7,0). Kontrolle: *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 ohne Antibiotikum.

D 1.3 Induktionsexperiment mit 200 ng/ml Norfloxacin

D 1.3.1 Optische Dichte, Lebendkeimzahl, Phagentiter und Stx-Produktion

Um detailliertere Aussagen über den Einfluss von 200 ng/ml NFLX auf den Stamm EDL933 zu erhalten, wurden weitere Wachstumskurven mit gleichzeitiger Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE/ml), des Phagentiters (PBE/ml) und der Stx-Freisetzung (AE₄₅₀/ml) in 20 bzw. 30-minütigen Abständen erstellt. Die daraus

resultierende Wachstumskurven und Messdaten sind in Abbildung D 3 und in Tabelle Anhang A 2 dargestellt. Des Weiteren wurden Gramfärbepreparate und elektronenmikroskopische Aufnahmen von induzierten und nicht-induzierten Bakterienzellen angefertigt.

Die Induktion von EDL933 mit NFLX erfolgte 90 min nach Inokulation der Bakterien und einer OD_{600} von 0,3. Sowohl in der induzierten als auch in der nicht-induzierten Kultur erfolgte auf Grund des Bakterienwachstums eine Zunahme der optischen Dichte. Nach einer Inkubation von 90 min sank die OD_{600} der induzierten Kultur im Vergleich zur Kontrolle geringfügig und nach weiteren 30 min um 0,5 log-Stufen ab. Gleichzeitig konnte eine beginnende vermehrte Freisetzung von Stx in der mit NFLX induzierten EDL933-Kultur im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden.

Ein exponentieller Anstieg der Stx-Freisetzung erfolgte zu dem Zeitpunkt, an dem sich die OD_{600} der Experimentkultur um ca. 0,5 log-Stufen verringert (120 min Induktion). Parallel dazu konnte eine exponentielle Zunahme der Plaque-bildenden Einheiten (PBE/ml) beobachtet werden. Die Freisetzung an freiem Stx ging demzufolge mit der Zunahme an freien infektiösen Phagenpartikeln einher. Nach einer Inkubation von 130 min stieg der Anteil infektiöser Phagenpartikel im Experiment auf $4,5 \times 10^4$ PBE/ml an und fiel nach diesem Maximum in den folgenden 30 min wieder ab. Die Reduktion des Phagentiters nach Erreichens eines Höchstwertes konnte in mehreren Versuchsreihen bestätigt werden. Bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl, ermittelt als Kolonie-bildende Einheiten, (KBE/ml) konnte festgestellt werden, dass in den ersten 30 min nach Induktion die KBE/ml der induzierten Kultur parallel mit der KBE/ml der Kontrolle infolge des Bakterienwachstums zunahm. Allerdings reduzierte sich die KBE/ml der induzierten Kultur in den folgenden 40 min um ca. 1,5 log-Stufen und verringerte sich daraufhin stetig weiter, jedoch geringfügiger. Nach einer Inkubationszeit von 130 min unterschieden sich die KBE/ml von Experiment und Kontrolle um ca. 3,1 log-Stufen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Abnahme der OD_{600} und parallel ein exponentieller Anstieg in der Freisetzung an Stx und infektiösen Phagenpartikeln.

Mit Hilfe von Gramfärbepreparaten und elektronenmikroskopischer Aufnahmen der induzierten und nicht-induzierten Kulturen sollte nachgewiesen werden, ob die Reduktion der Lebendkeimzahl auf Grund der Filamentierung der induzierten Bakterienzelle erfolgte (D 1.3.2).

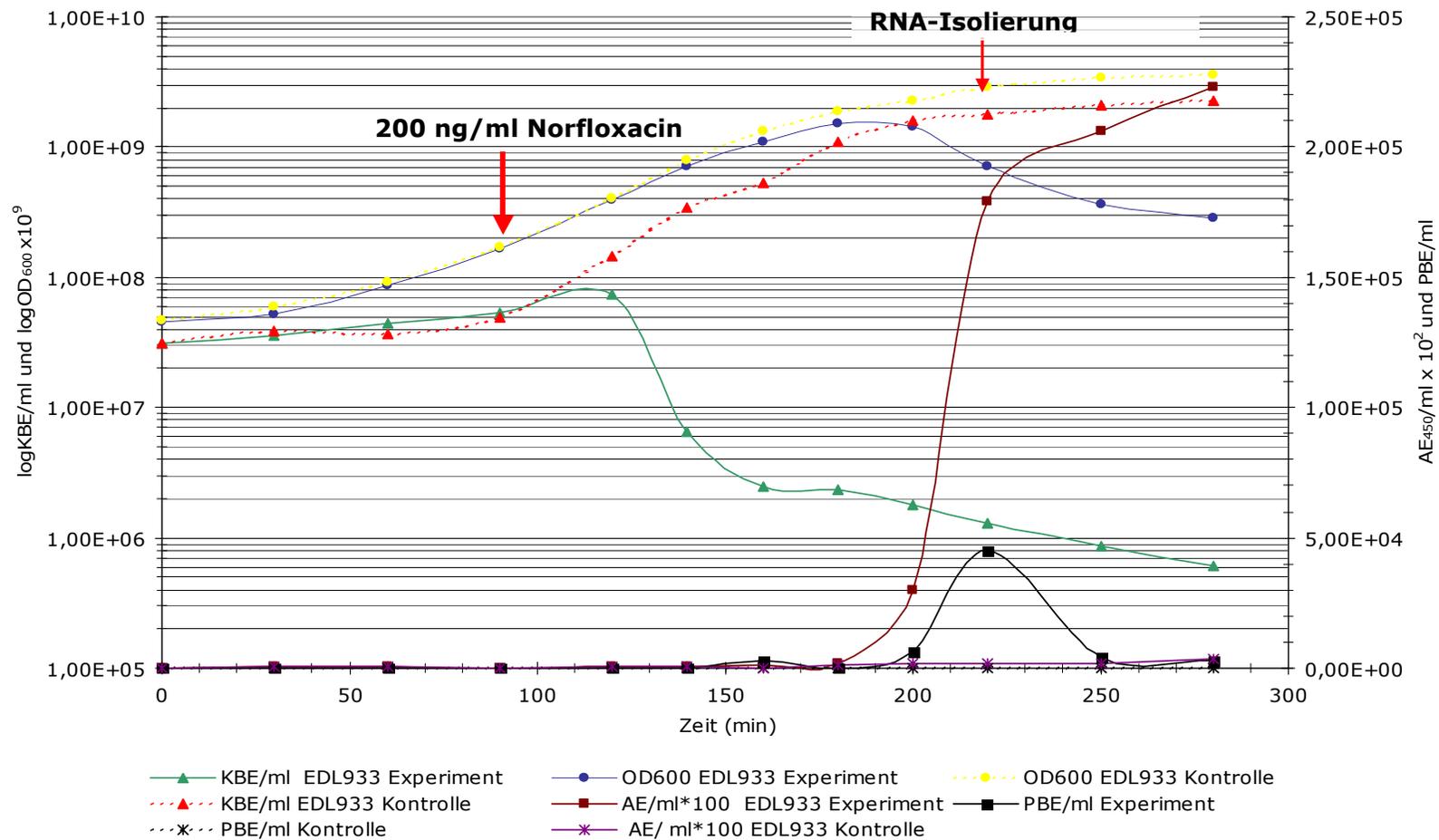


Abbildung D 3: Wachstumskurve mit Bestimmung der Lebendkeimzahl, Stx-Freisetzung und Phagentiter von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX. Kontrolle: *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 ohne Antibiotikum. Y1-Achse: log KBE/ml und log OD₆₀₀ x 10⁹; Y2-Achse: PBE/ml und relative Stx- Freisetzung in AE₄₅₀/ml x 10².

D 1.3.2 Gramfärbung und Rasterelektronenmikroskopie

Um eventuelle morphologische Veränderungen an den mit NFLX induzierten Zellen zu sehen, wurden Präparate für die Licht- und Elektronenmikroskopie angefertigt. Abbildung D 4 zeigt die induzierten Kulturen von *E. coli* O157:H7 EDL933 nach 15 min (B) und 30 min (D) NFLX-Einwirkung und die jeweiligen Kontrollen ohne NFLX (A und C). Während die nicht-induzierten Zellen die für *E. coli* typische Größe und Form zeigen, sind die Zellen nach einer Induktion von 15 min leicht und nach 30 min stark verlängert. Um dies genauer zu untersuchen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Abbildung D 5 (A) zeigt eine induzierte Zelle (120 min Induktion mit NFLX) von EDL933 und Abbildung D 5 (B) die entsprechende nicht-induzierte Kontrolle. In beiden mikroskopischen Verfahren waren die induzierten Zellen durchschnittlich 8–10-fach länger verglichen mit den nicht-induzierten Zellen. Dies zeigt eine Filamentierung der Bakterienzellen an.

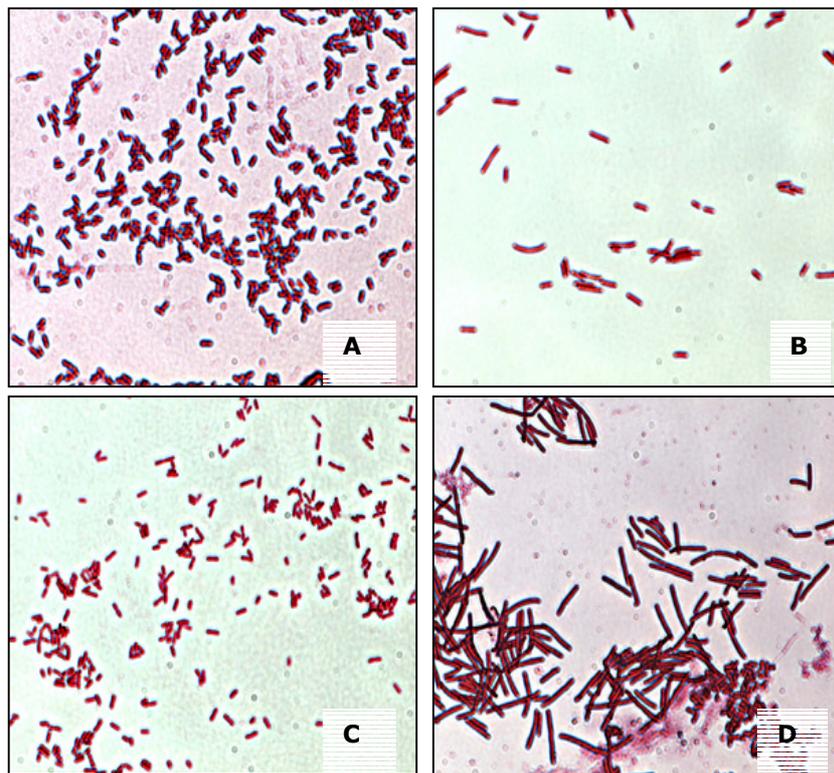


Abbildung D 4: Fotodokumentation (AxioCam Mrc, Zeiss) der lichtmikroskopischen Aufnahmen (AxioStar plus, Objektiv 100x/1,25, Zeiss) der Gramfärbepreparate (1000-fache Vergrößerung) von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 nach 15 min (B) bzw. 30 min (D) Induktion mit 200 ng/ml NFLX (pH=7,0) und der nicht-induzierten Kultur an den Messpunkten 15 min (A) und 30 min (C).

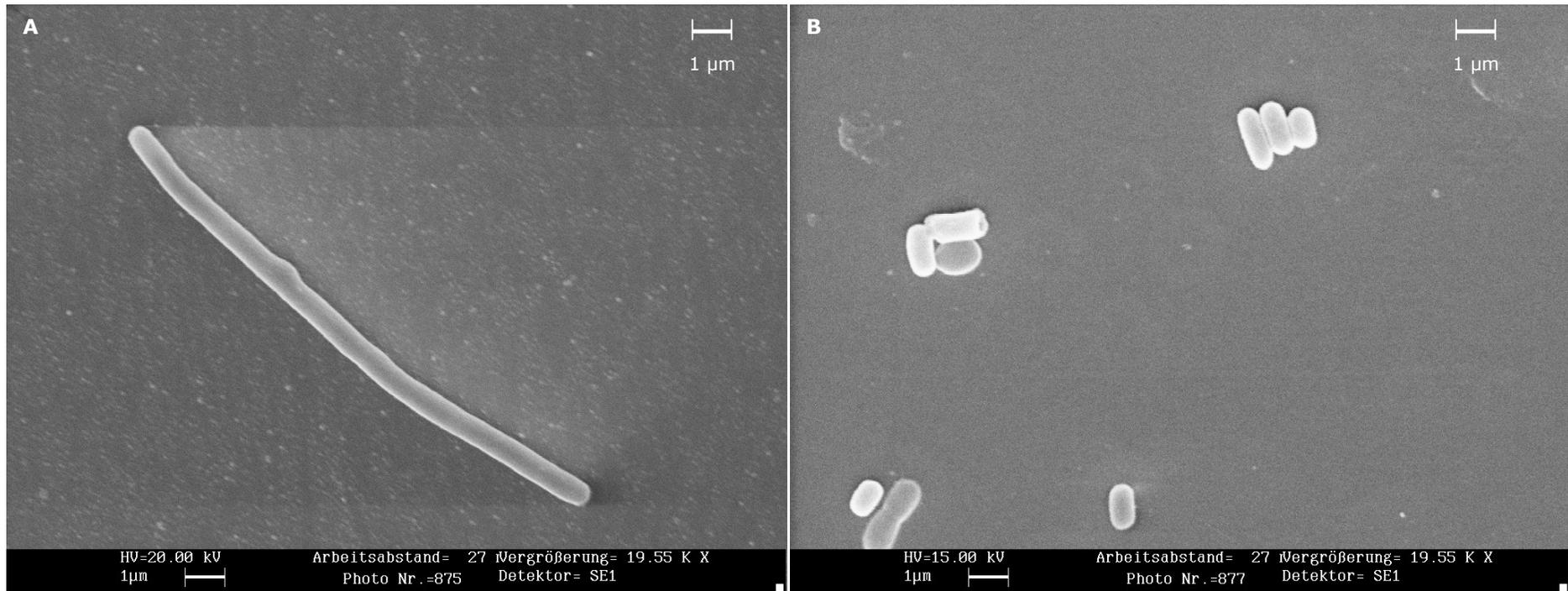


Abbildung D 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (LEO Electron Microscopy S430, Cambridge, UK) von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 mit 19550-facher Vergrößerung. (A) induzierte Kultur von *E. coli* O157:H7 EDL933 (120 min Induktion mit 200 ng/ml NFLX. (B) jeweilige nicht-induzierte Kontrolle (ohne Antibiotikagabe am Messpunkt 120 min).

D 1.3.3 Plaquehybridisierung

Zunächst wurde überprüft, ob der *E. coli* O157:H7 EDL933 infektiöse Stx-Phagen enthält. Hierfür wurde eine Hybridisierung der erhaltenen Plaques mit *stx*₁- und *stx*₂-spezifischen DNA-Sonden nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX (190 min) durchgeführt (D 1.3.1).

Für die Etablierung einer Positivkontrolle wurden verschiedene Mengen an isolierter genomischer DNA und aufgereinigten PCR-Produkten mit einer DIG-markierten *stx*₁-Sonde hybridisiert (Abbildung D 6). Bei keiner der verwendeten Menge an genomischer DNA konnte ein Hybridisierungssignal erhalten werden, hingegen bei allen PCR-Produkt-Mengen. Die Hybridisierungen von 1000 ng und 500 ng PCR-Produkt lieferten jedoch zu starke Signale (Abbildung D 6). Daher wurden als Positivkontrollen je 100 ng *stx*₁- bzw. *stx*₂-PCR-Produkt für die Hybridisierung mit den *stx*₁- bzw. *stx*₂-spezifischen Sonden eingesetzt.

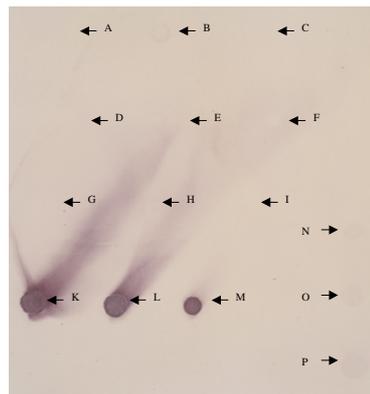


Abbildung D 6: Dot-Blot-Hybridisierung mit einer DIG-markierten *stx*₁-spezifischen DNA-Sonde. Die isolierte genomische DNA von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wurde in einem Gesamtvolumen von 5 bzw 10 µl (C, F, I) aufgetropft.: 100 ng DNA v. C600 (A), C600(H-19J) (B), C600(933W) (C); 500 ng DNA v. C600 (D), C600(H-19J) (E), C600(933W) (F); 1000 ng DNA v. C600 (G), C600(H-19J) (H), C600(933W) (I); *stx*₁-PCR-Produkt 1000 ng (K), 500 ng (L), 100 ng (M); *stx*₂-PCR-Produkt 1000 ng (N); 500 ng (O); 100 ng (P).

In Abbildung D 7 ist die Hybridisierung der nach Induktion von *E. coli* O157:H7 EDL933 erhaltenen Plaques dargestellt. Nur die Hybridisierung der Plaques mit einer *stx*₂-DNA-Sonde erbrachten positive Hybridisierungssignale (Abbildung D 7 B), hingegen erbrachte die Hybridisierung mit einer *stx*₁-Sonde keine Hybridisierungssignale (Abbildung D 7 A). Nach Induktion mit NFLX konnten nur *stx*₂-kodierende Phagenpartikel in dem Phagenlysat nachgewiesen werden.

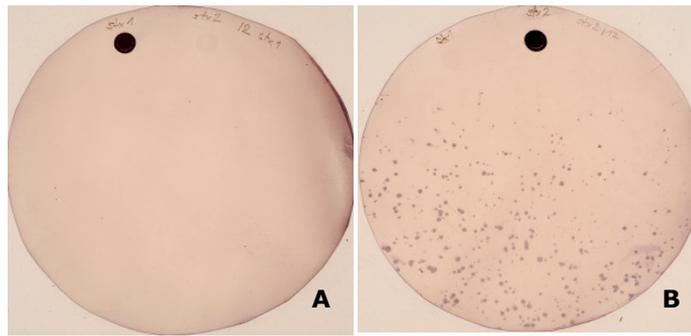


Abbildung D 7: Plaquehybridisierungen mit einer DIG-markierten *stx*₁-DNA-Sonde (A) und einer DIG-markierten *stx*₂-Sonde (B). Die detektierten Einzelplaques entstammen aus 10 µl des sterilfiltrierten Kulturüberstandes von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 nach 190 min Induktion mit 200 ng/ml NFLX. Als Positivkontrolle für die Hybridisierung mit der *stx*₁-Sonde fungierten 100 ng aufgereinigtes nach dem Dot-Blot-Verfahren aufgebracht *stx*₁-PCR-Produkt und für die *stx*₂-Sonde 100 ng *stx*₂-PCR-Produkt. Als Negativkontrolle für die *stx*₁-Sonde fungierten 100 ng *stx*₂-PCR-Produkt und für die *stx*₁-Sonde 100 ng *stx*₁-PCR.

Mittels Analyse der Wachstumskurven durch Bestimmung der OD₆₀₀, Lebendkeimzahl, Stx- und Phagen-Freisetzung, sowie der Anfertigung von Gramfärbepreparaten und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Induktion von EDL933 mit 200 ng/ml NFLX können Aussagen über das Verhalten der induzierten Bakterienkultur im Vergleich zu der nicht-induzierten Kultur getroffen werden.

Die Zunahme der optischen Dichte trotz Induktion mit NFLX läßt zwar vermuten, dass die Bakterien sich vermehren, die Bestimmung der Lebendkeimzahl sowie die Anfertigung von Gramfärbepreparaten und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten jedoch, dass infolge der Gabe von NFLX eine Filamentierung der Zellen erfolgte. Dieser Effekt erklärt die Zunahme der optischen Dichte bei einer gleichzeitig stattfindenden Reduktion der KBE/ml. Zu dem Zeitpunkt, an dem der Phagentiter und die Stx-Menge stieg, erfolgte eine meßbare Reduktion der OD₆₀₀. Die Lebendkeimzahl verringerte sich ebenfalls. NFLX übte somit messbare biologische Effekte auf *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 aus. Zum einen wurde das Bakterienwachstum im Verlauf der Inkubation gehemmt und zum anderen konnte ein erhöhter Phagentiter und Anstieg an Stx beobachtet werden. Die KBE/ml reduziert sich in den ersten Induktionsminuten wahrscheinlich infolge der Filamentierung der Zellen. In der späteren Induktionsperiode kann eine Reduktion der KBE/ml nicht ausschließlich dadurch erklärt werden. Vermutlich erfolgt die Abnahme der Lebendkeimzahl in diesem Stadium durch die nach der Induktion des lytischen Infektionszyklus eintretende Lyse der Bakterienzelle. Ferner führen sicher auch die antibiotischen Wirkungen auf die Stoffwechselgene

des Bakteriums zu einer Reduktion der Lebendkeimzahl. Diese Daten zeigen, dass die biologische Antwort der Zelle auf den Induktor NFLX nur in seiner Gesamtheit betrachtet und diskutiert werden sollte, da die Summe der einzelnen Effekte zu dem beobachteten und messbaren Wachstumsverhalten führen.

D 1.4 Wachstumskurve nach Induktion mit 200 ng/ml Norfloxacin von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r

Um die *recA*-Abhängigkeit der Phageninduktion zu untersuchen, wurden Wachstumskurven von der *recA*-Mutante EDL933r nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX angefertigt. Hierfür wurde die freiwerdende Menge an Stx im Kulturüberstand an zwei Tagen (Versuch A und B) nach Induktion untersucht.

Im Vorfeld wurde für *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r die MHK von NFLX zu 0,065 ng/ml mittels der Bouillon-Dilutionsmethode ermittelt. Die Abbildung D 8 zeigt die Wachstumskinetik von EDL933r nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX. Der *recA*-negative Stamm EDL933r wurde durch NFLX deutlich in seinem Wachstum gehemmt. Bereits nach einer Induktionszeit von 60 min wurde ein Absinken der OD₆₀₀ um ca. 0,2 log-Stufen im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle verzeichnet (Abbildung D 8). In den darauffolgenden Induktionsminuten sank die optische Dichte um ca. 0,7 log-Stufen ab. Die Stx-Freisetzung in den induzierten EDL933r-Kulturen waren gegenüber den nicht-induzierten Kulturen nur geringfügig erhöht (Tabelle D 2). Nach einer Inkubationszeit von 120 min war ein Unterschied in der Freisetzung von Stx von der induzierten Kultur (A) gegenüber der nicht-induzierten Kultur (A) um den Faktor 2 zu verzeichnen. Dies wurde auch in dem zweiten unabhängigen Versuch (B) ermittelt, wobei in der induzierten Kultur ca. die 3-fache Stx-Menge freigesetzt wurde. Es wurden jeweils nur die Stx-Freisetzung der nicht-induzierten und induzierten Kulturen der jeweiligen Versuchsreihen miteinander verglichen.

ERGEBNISSE

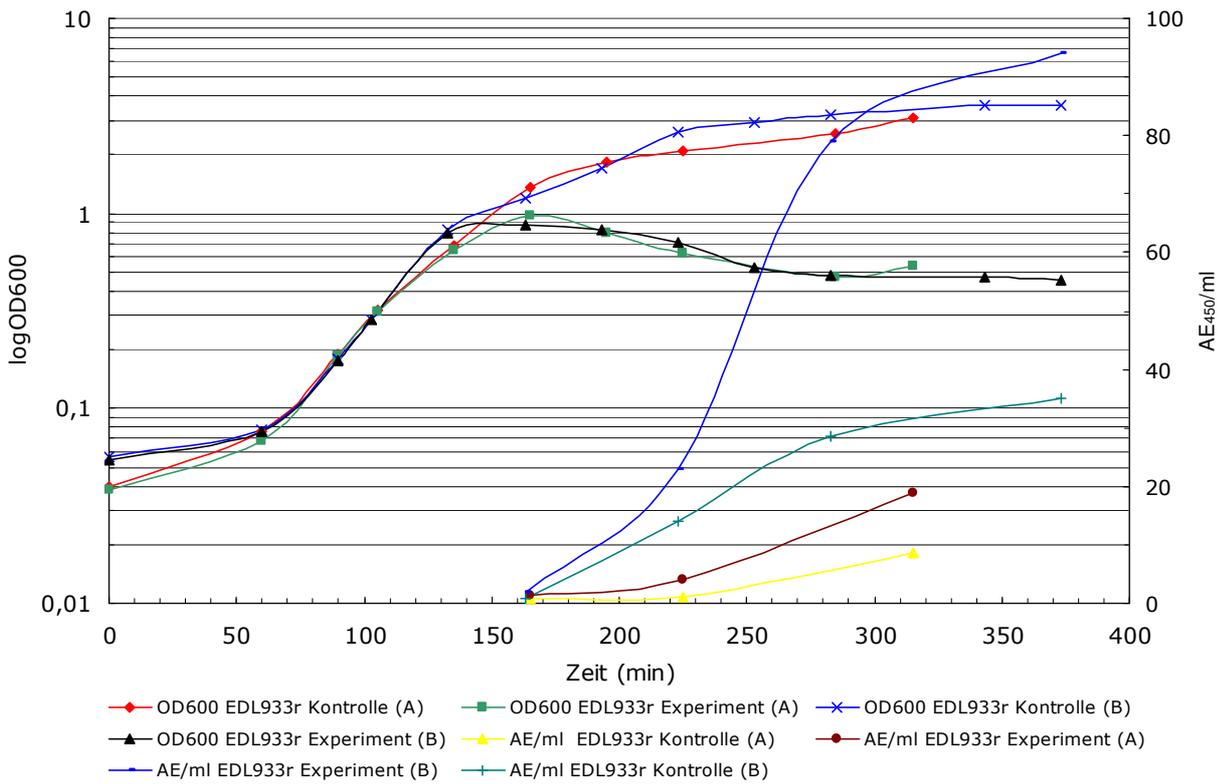


Abbildung D 8: Wachstumskurve (OD₆₀₀) und Stx-Freisetzung (AE₄₅₀/ml) von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX (Experiment). Kontrolle: *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r ohne Antibiotikum. Y1-Achse: log OD₆₀₀; Y2-Achse: relative Stx-Freisetzung (AE₄₅₀/ml).

Tabelle D 2: Relative Stx-Freisetzung (AE₄₅₀/ml) nach Induktion von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r (Experiment, E) mit 200 ng/ml NFLX und Kontrolle (K) ohne Induktion an zwei Tagen (Versuch A und B).

Zeit nach Induktion (min)	Versuch A		Versuch B	
	AE ₄₅₀ /ml EDL933r _K	AE ₄₅₀ /ml EDL933r _E	AE ₄₅₀ /ml EDL933r _K	AE ₄₅₀ /ml EDL933r _E
60	0,8	1,2	0,7	2,0
120	1,1	4,2	14,1	22,9
210	8,7	19,0	28,7	79,0
270	-	-	31,1	94,2

D 2 Genexpressionsanalyse von *E. coli* O157:H7

Ausgehend von den Vorversuchen und Ergebnissen der Wachstumskurven sowie der Stx-Freisetzung wurde *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 mit 200 ng/ml NFLX inkubiert und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Die Wachstumsbedingungen wurden für alle Versuche gleich gewählt, indem alle Induktionsexperimente in 500 ml Erlenmeyerkolben und einem Volumen von 100 ml Flüssigmedium, bei 37°C und 180 rpm durchgeführt wurden. Die Flüssigkulturen wurden insgesamt 2 h nach Zugabe von NFLX inkubiert, da nach diesem Zeitpunkt ein Anstieg der Stx-Freisetzung in den Vorversuchen gemessen wurde. Aus je 50 ml induzierten und nicht-induzierten *E. coli* Flüssigkulturen wurde Gesamt-RNA isoliert, diese in cDNA synthetisiert und mit den, auf dem Array befindlichen Oligonukleotiden hybridisiert.

D 2.1 Optimierung der RNA-Isolierung

Entscheidendes Kriterium für erfolgreiche Genexpressionsanalysen bzw. Microarrayexperimente ist zum einen die Reinheit und zum anderen die Konzentration an isolierter Gesamt-RNA. Für jede cDNA-Synthese wurden 50 µg Kontroll- bzw. Experiment-RNA benötigt. Um für die cDNA Synthesen ausreichende Mengen an Gesamt-RNA zu erhalten, wurden verschiedene Präparations- und Aufreinigungsmethoden getestet. In jedem Fall erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA aus den Flüssigkulturen mit Hilfe der „RNeasy Midi“ Säulen (Qiagen). Für den Zellaufschluß wurde die Methode der enzymatischen Lyse mit Lysozym (Probe A) und die der mechanischen Zellerstörung mit Hilfe von „FastPrep Tubes“ (Probe B) getestet. Die im Anschluss an die Restriktion der DNA durchgeführte Aufreinigung der Gesamt-RNA wurden ebenfalls mit den „RNeasy Midi“ Säulen durchgeführt. Anhand der in Tabelle D 3 aufgeführten gemessenen Konzentrationen und Reinheiten der RNA-Proben wird ersichtlich, dass mit beiden Zellaufschlussmethoden annähernd gleiche Konzentrationen (OD_{260nm}) und Reinheiten ($OD_{260/280}$) an Gesamt-RNA erhalten wurden.

Tabelle D 3: Vergleich der Konzentration und Reinheit an Gesamt-RNA von EDL933 und C600 nach verschiedener Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden.

RNA-Isolierungsmethode	Konzentration an Gesamt-RNA (OD _{260nm})	Reinheit der Gesamt-RNA (OD _{260/280})
A	0,50 µg/µl	1,9
B	0,35 µg/µl	1,9
C	0,41 µg/µl	1,8
D	0,56 µg/µl	1,8

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und visueller Beurteilung konnte ferner beobachtet werden, dass die mechanische Zellzerstörung keine Degradierung der Gesamt-RNA zur Folge hat. Sowohl in der mit Lysozym behandelten Probe als auch in der mechanisch behandelten Probe konnten intakte Banden für die 16S-rRNA (1,5 Kb) und 23S-rRNA (2,9 Kb) identifiziert werden (Abbildung D 9).

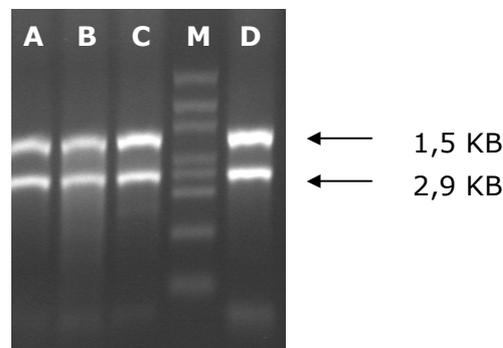


Abbildung D 9: Denaturierendes Agarosegel mit je 1 µg aufgetragener Gesamt-RNA. A: Gesamt-RNA von EDL933 nach enzymatischer Lyse mit Lysozym und Aufreinigung mittels RNeasy Säulen; B: Gesamt-RNA von EDL933 nach mechanischem Zellaufschluss und Aufreinigung mittels RNeasy Säulen; C: Gesamt-RNA von C600 nach mechanischem Zellaufschluss und Aufreinigung mittels RNeasy Säulen; D: Gesamt-RNA von EDL933 nach mechanischem Zellaufschluss und Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion; M: 1 µg RNA-Ladder High Range (6000-200 Kb).

Zusätzlich wurde die Aufreinigung der Gesamt-RNA nach dem DNA-Verdau mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Probe D) getestet. Im Hinblick auf eine Weiterverwendung der Gesamt-RNA für nachfolgende cDNA-Synthesen wurde diese Aufreinigungsmethode als ungeeignet bewertet. Die Gesamt-RNA entsprach zwar den Reinheits- und Konzentrationsanforderungen konnte anschließend jedoch nicht in cDNA synthetisiert werden (Tabelle D 3). Um die Qualität und Konzentration an isolierter Gesamt-RNA von pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen vergleichen zu können, wurde Gesamt-RNA des Stammes C600 (Probe C) wie Probe B isoliert. In allen isolierten Gesamt-RNA-Proben konnten eindeutig die beiden ribosomalen RNA-Untereinheiten, 16S-rRNA (1,5 Kb) und 23S-rRNA (2,9 Kb) identifiziert werden (Abbildung D 9).

Da mRNA nur einen Anteil von 5-10% an der Gesamt-RNA einer Bakterienzelle ausmacht [Knippers *et al.*, 1990] und nur begrenzte Mengen an isolierter RNA für die Qualitätskontrolle zur Verfügung standen, konnte die mRNA nicht mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung visualisiert werden. Als Qualitätsmerkmal dienten somit nur die 16S- und 23S-rRNA-Banden. Waren diese nicht degradiert und somit als präzise und eindeutige Banden zu sehen, konnte von qualitativ hochwertig isolierter Gesamt-RNA ausgegangen werden. Auf der Basis dieser Untersuchungen und den erhaltenen Ergebnissen wurden alle nachfolgenden RNA-Isolierungen und Aufreinigungen nach mechanischer Zellerstörung mittels „FastPrep Tubes“ und „RNeasy Midi“ Säulen durchgeführt.

D 2.2 Experimentelles Design der Transkriptomanalysen

Für die Expressionsanalysen wurden je 3 Kulturen à 100 ml mit NFLX (Experiment) und parallel 3 Kulturen à 100 ml ohne NFLX (Kontrolle) inkubiert und jeweils 50 ml dieser Kulturen für die Gesamt-RNA-Isolierung verwendet. Die benötigte RNA-Menge konnte mit dieser Prozedur für zwei cDNA-Synthesen für die Hybridisierungsreaktionen und für eine weitere cDNA-Synthese ohne Markierung für die Real-Time PCR nach Vereinigung der entsprechenden RNA-Proben erhalten werden. Mit dieser experimentellen Anordnung wurde ferner gewährleistet, biologische Schwankungen während des Wachstums in die Expressionsanalyse mit einzubeziehen.

Die Versuchsanordnung aller nachfolgender Arrayversuche ist in Abbildung D 10 dargestellt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde der in Abbildung D 10 dargestellte Versuchsansatz für *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 insgesamt zweimal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Das Expressionsprofil wurde zusätzlich unter nicht-induzierenden Bedingungen analysiert, indem für *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 ein weiterer Versuch, jedoch ohne Antibiotikagabe durchgeführt wurde (nur

nicht-induzierte Kulturen, Kontrollen). Die Analyse des Transkriptoms von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 erfolgte nach 2-stündiger Induktion mit 200 ng/ml NFLX.

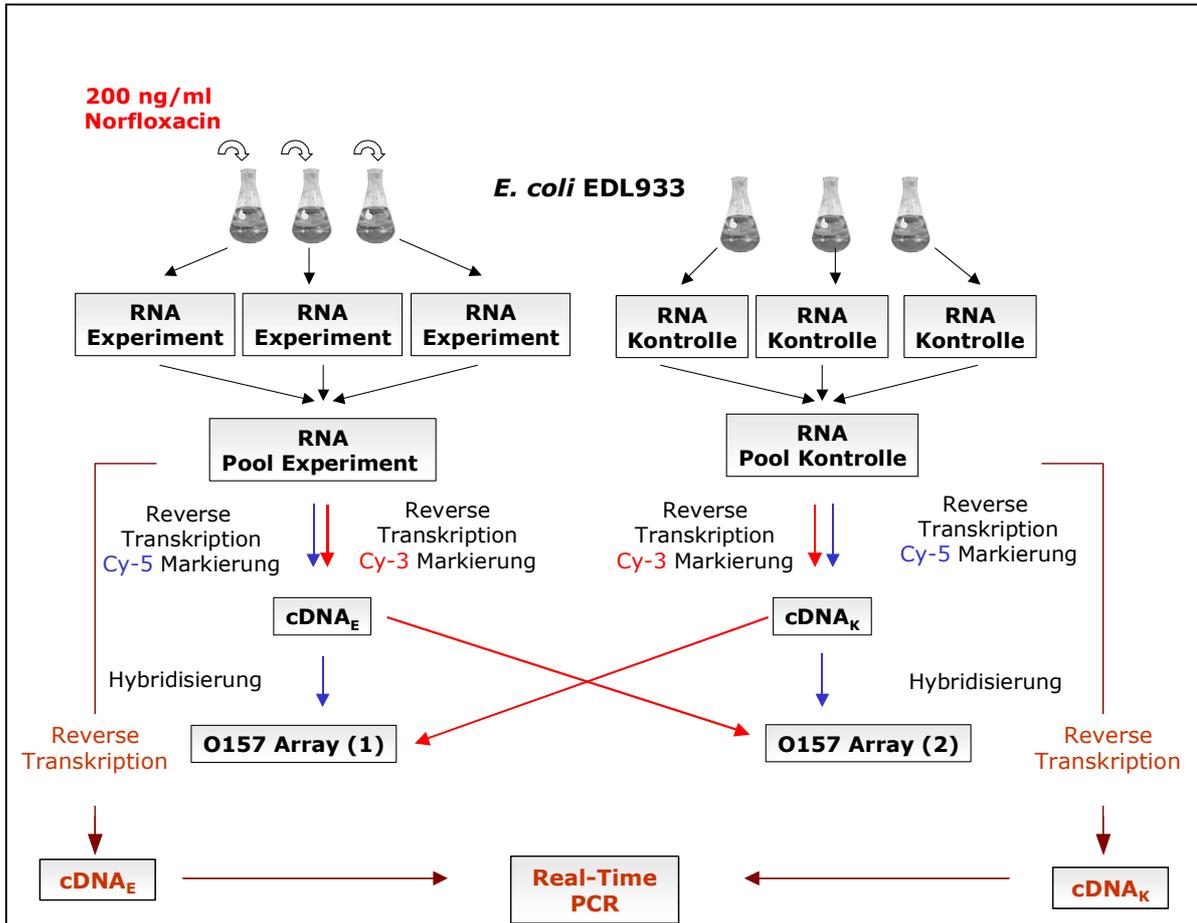


Abbildung D 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Transkriptomanalyse von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933. Je 3 EDL933 Kulturen mit NFLX (Experiment, E) und 3 Kulturen ohne NFLX (Kontrolle, K) wurden parallel inkubiert, RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese mittels Real-Time PCR quantifiziert bzw. mit dem O157 Array hybridisiert (D 2.2).

D 2.3 Markierung und Hybridisierung der Gesamt-RNA

Die Synthese von markierter cDNA erfolgte aus je 50 µg vereinigter Gesamt-RNA der entsprechenden Kontrollen bzw. Gesamt-RNA der entsprechenden Experimente. Die aufgereinigte und vereinigte Gesamt-RNA wurde nur dann für die reverse Transkription eingesetzt, wenn die Reinheit und der Salzgehalt der Gesamt-RNA den Anforderungen entsprach. Der ermittelte Quotient $OD_{260/280}$ der Gesamt-RNA sollte $\geq 1,8$ sein. Das Verhältnis von $OD_{260/230}$ gibt Aufschluss über Salzverunreinigungen in der Probe und sollte in jedem Falle $\geq 2,0$ sein [MWG Application Guide, http://ecom2.mwgdna.com/download/arrays/manuals/manual_bacteria.pdf]. Nur bei einer Konzentration an transkribierter cDNA der Kontrolle ($cDNA_K$) und cDNA des Experimentes ($cDNA_E$) von 3200 ng wurde die cDNA für die Hybridisierungsreaktion mit dem O157 Array eingesetzt. Da die Hybridisierungsreaktion nur unter stringenten, definierten Salzkonzentrationen reproduzierbare und auswertbare Ergebnisse liefert, wurde aus diesem Grund die markierte cDNA auch nur dann für die Hybridisierung eingesetzt, wenn deren Quotient $OD_{260/230} \geq 2,0$ betrug und dies eine salzfreie cDNA anzeigt [MWG Application Guide]. Für jede Hybridisierungsreaktion wurden adäquate Mengen an Cyanine-3-markierter DNA_K ($cy3DNA_K$) und Cyanine-5-markierter DNA_E ($cy5DNA_E$) bzw. $cy5DNA_K$ und $cy3DNA_E$ für die reverse Markierung des jeweiligen Versuches vereinigt, auf die Trockene eingedampft, im Hybridisierungspuffer aufgenommen und hybridisiert. Die Zuordnung der Markierung und die Hybridisierung der einzelnen Versuchsreihen ist in Tabelle D 4 angegeben. Die auf den Array 42 und den Array 43 hybridisierte, markierte cDNA unterscheidet sich durch ihre zueinander umgekehrte Markierung. Mit Hilfe dieser Versuchsanordnung sollte überprüft werden, ob mögliche unterschiedliche Einbaueffizienzen der Farbstoffe einen Einfluss auf die Ergebnisse der Expressionsanalyse haben. Ebenso wurde bei Versuch 1 (Tabelle D 4) verfahren.

Tabelle D 4: Versuch, Nummer des hybridisierten Arrays, Markierung, Hybridisierungsschema und Konzentration der hybridisierten cDNA.

Versuch	Array-nummer	Markierung der cDNA	Menge cDNA für Hybridisierung
1	Array 18	cy3cDNA _{K1} + cy5cDNA _{K1'}	3200 ng
	Array 19	cy3cDNA _{K1'} + cy5cDNA _{K1}	3200 ng
2	Array 42	cy3cDNA _{K2} + cy5cDNA _{E2}	3200 ng
	Array 43	cy5cDNA _{K2} + cy3cDNA _{E2}	3200 ng
3	Array 45	cy5cDNA _{K3} + cy3cDNA _{E3}	3200 ng

K: Kontrolle, E: Experiment, K1': Kontrolle (ohne NFLX) jedoch als Experiment behandelt.

D 2.4 Auswertung und Reproduzierbarkeit der Mikroarrayversuche

Die beiden Fluorophore cy3 bzw. cy5 absorbieren Laserlicht bei 550 nm bzw. 649 nm und emittieren längerwelliges Licht bei 570 nm im Falle von cy3 und bei 670 nm im Falle von cy5. Die Arrays wurden mit einem Affymetrix 428 Scanner bei den für cy3 und cy5 spezifischen Wellenlängen 550 nm und 649 nm in den Photomultiplier Tube (PMT) Stufen 35, 45, und 55 gescannt, wodurch eine optimale Auswertung der Spotintensitäten erzielt wurde (siehe auch A 2.3). Die von dem Microarrayscanner gelieferten Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle (Rohdaten) wurden mit der „BioDiscovery ImaGen™ 5,0 Image Processing“ Software analysiert. Für die Auswertung der Rohdaten wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit dem ursprünglichen Spot-Muster (Grid) verknüpft, um die Spoterkennung auf dem Array zu gewährleisten. Hierbei wurden nur die Signale, die sich innerhalb der Kreise befanden, als Signal und die, die sich außerhalb befanden, als Hintergrund interpretiert. Von jedem Spot wurde dessen Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes bestimmt. Fehlerhafte oder verschmierte (verwischte) Spots wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl an analysierten Spots wurde aus der Gesamtspotanzahl (6636) abzüglich der fehlerhaften Spots für jeden Array errechnet (Tabelle D 5). Die für jeden Array von jedem Spot berechneten Mittelwerte (MW) der Fluoreszenzintensitäten des Hintergrundes und die Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten des Hintergrundes (Std) für beide Kanäle sind in Tabelle D 5 dargestellt. Die Berechnungsgrundlage für die Signalintensitäten waren für die Arrays die Datenreihen der Scanstufe 45 (PMT-Stufe). Aus der Summe der Mittelwerte (MW) der Fluoreszenzintensität und deren 2-fachen Standardabweichung für jeden Kanal wurde für jeden Array der Intensitätsausschlusswert (In-

intensitätscut, I_{cut}) berechnet. In die Datenanalysen wurden nur die Spots des jeweiligen Arrays einbezogen, bei denen die Fluoreszenzintensität in einem der beiden Kanäle (cy3 oder cy5) über dem Intensitätscut des jeweiligen Kanals ($I_{cut}cy3$ oder $I_{cut}cy5$) lagen. Mit diesem Auswahlprinzip wurde sichergestellt, dass nur die Spots in die Auswertung einbezogen wurden, deren Fluoreszenzintensität größer als deren Hintergrund-Fluoreszenzintensität war.

Tabelle D 5 gibt die Anzahl der Spots mit Fluoreszenzintensitäten über dem I_{cut} in einem der beiden Kanäle (Anzahl der Spots über I_{cut}) an. Die Schnittmenge der Spots der Arrays 18, 19, 42, 43 und 45 ergibt eine Anzahl von 5963 Spots, d.h. 5963 Spots liegen gleichzeitig in allen Arrays über dem I_{cut} .

Tabelle D 5: Nummer der Arrays, deren fehlerhafte Spots, Mittelwerte (MW) der Hintergrundfluoreszenz von allen Spots für jeden Kanal, Standardabweichungen (Std) der mittleren Hintergrundfluoreszenz für jeden Kanal, Intensitätscut (I_{cut}) für jeden Kanal und Anzahl der Spots über I_{cut} in einem der beiden Kanäle für der Versuchsreihe A und B.

Array Nr.	fehlerhafte Spots	analysierte Spots	MW _{cy3}	Std _{cy3}	$I_{cut}cy3$	MW _{cy5}	Std _{cy5}	$I_{cut}cy5$	Anzahl Spots über I_{cut}
18	5	6331	64,0	20,95	105,9	67,8	22,1	112,0	6261
19	1	6335	73,3	21,3	115,9	48,6	15,8	80,2	6321
42	2	6334	80,3	24,1	128,6	62,0	21,2	104,5	6311
43	2	6334	46,2	12,3	70,9	36,7	8,1	53,0	6334
44	23	6313	94,4	31,4	157,2	102,4	33,1	168,6	-
45	8	6328	60,5	22,7	105,9	44,64	14,1	72,8	6332
Schnittmenge der Spots der Arrays 18, 19, 42, 43 und 45								Spots:	5963

*Datenreihen der PMT-Stufe 45 als Berechnungsgrundlage

Für jeden in die Auswertung einbezogenen Spot eines jeden Arrays wurden die Quotienten der Fluoreszenzintensitäten („normalisierte Ratio“) der Farbstoffe von Experiment und Kontrolle berechnet ($R_{E/K}$). Dieser Quotient gibt Aufschluss über die Genexpression von dem Experimentversuch im Vergleich zum Kontrollversuch.

Die Genexpression wurde als gesteigert (hochreguliert) eingestuft, wenn $R_{E/K} \geq 2,0$ und als reduziert (dereguliert), wenn $R_{E/K} \leq 0,5$ war. Diese Werte wurden in anderen Studien ermittelt und wiesen dort ein Konfidenzintervall von 99,9% auf [Guckenberger *et al.*, 2002; Wodicka *et al.*, 1997]. Der Quotient $R_{E/K}$ wurde für jeden Spot von jedem Array berechnet. Nur die Spots, deren Quotient in den Kontrollarrays (18 und 19)

zwischen $R_{E/K}=0,5-2,0$ (nicht-reguliert) und gleichzeitig in allen Experimentarrays (42, 43, 45) einen Quotienten von $R_{E/K} \leq 0,5$ (dereguliert) bzw. $R_{E/K} \geq 2$ (hochreguliert) aufwiesen, wurden als eine Regulation anzeigendes Oligonukleotid interpretiert.

Für nachfolgende Analysen und Darstellungen wurden nur die Mittelwerte von $R_{E/K}$ der jeweilig zusammengehörenden Versuche (Array 18 und 19; 42, 43 und 45) verwendet. Um Aussagen zu treffen, in wie weit sich das arithmetische Mittel zweier unterschiedlicher Gruppen, in diesem Falle die $R_{E/K}$ der Kontrollgruppen und der Experimentgruppen, signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein T-Test durchgeführt und die p-Werte (engl.: p-values) berechnet. Je kleiner der p-Wert, umso signifikanter unterscheiden sich die Kontrollgruppe (Array 18 und 19) und die Experimentgruppe (Array 42, 43 und 45) voneinander. Es wurden nur die Spots (Oligonukleotide) in das endgültige Expressionsprofil einbezogen, bei denen der p-Wert $< 0,05$ war. Bei fast allen Oligonukleotiden, die eine Hochregulation bzw. Deregulation anzeigten, unterschieden sich die Kontrollgruppen und die Experimentgruppen signifikant voneinander. Die Reproduzierbarkeit (Korrelation) der Mikroarraydaten wurde zudem durch den Korrelationskoeffizienten bestimmt. Dieser errechnet sich aus den $R_{E/K}$ aller in die Analyse einbezogenen Spots zweier unabhängiger Experimente, in diesem Fall der $R_{E/K}$ von 42/43, 43/45 und 42/45. Die doppellogarithmische Auftragung der $R_{E/K}$ aller Gene zweier unabhängiger Experimente (loglog-Plot oder Scatter Plot) ist eine graphische Darstellungsform der Korrelation. Im 2-fach Bereich (engl.: 2-fold range) befanden sich all die Spots, deren Quotienten von Experimentarray 43 und Experimentarray 45 ($R_{43_{E/K}}/R_{45_{E/K}}$) sich nicht mehr als um den Faktor 2 voneinander unterschieden (Abbildung D 11). Je mehr Spots in diesem Bereich lagen, umso reproduzierbarer waren die Werte dieser unabhängigen Experimente. Im 5-fach (engl.: five-fold range) und 10-fach Bereich (engl.: ten-fold range) lagen all jene Spots, deren $R_{E/K}$ sich mehr als um den Faktor 5 bzw. 10 unterschieden. Befänden sich alle $R_{E/K}$ auf der Winkelhalbierenden, würde dies für eine sehr gute Korrelation sprechen.

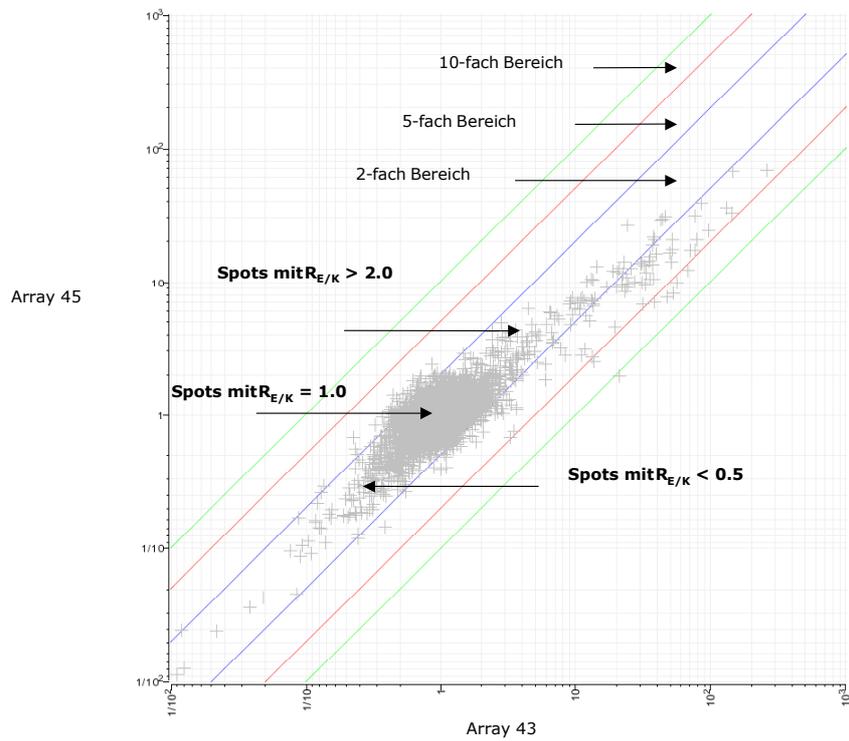


Abbildung D 11: Doppellogarithmisches Diagramm (loglog-Plot) der Ratios $R_{E/K}$ der Spots von Array 43 (X-Achse) versus der Ratios $R_{E/K}$ der Spots von Array 45 (Y-Achse). Die roten Linien geben den Bereich der maximalen 2-fachen Abweichung an, die blauen den 5-fach und die hellgrünen den 10-fach Bereich. Der 2-fach Bereich, 5-fach Bereich bzw. 10-fach Bereich gibt jeweils den Bereich an, in dem sich all die Spots befinden, deren $R_{43E/K}/R_{45E/K}$ sich nicht mehr als um den Faktor 2, 5 bzw. 10 voneinander unterscheiden (vgl. D 2.4).

Die Korrelationskoeffizienten und der prozentuelle Anteil der Spots im 2-fach Bereich der einzelnen Versuche sind in Tabelle D 6 dargestellt.

Tabelle D 6: Korrelationskoeffizienten, Anzahl und prozentualer Anteil der Spots im 2-fach Bereich.

loglog Plot	Anzahl der Spots im 2-fach Bereich (Prozentualer Anteil)	Korrelationskoeffizient
Array42/43	5117 von 5963 (85,8%)	0,70
Array42/45	5031 von 5963 (84,4%)	0,70
Array43/45	5965 von 5963 (96,7%)	0,82

Im Hinblick auf mögliche Schwankungen während der biologischen Wachstumsexperimente, sowie experimenteller und methodischer Einflüsse während der Gesamt-RNA-Isolierung, der reversen Transkription der RNA und Hybridisierung der cDNA konnten die Ergebnisse der Microarraydaten anhand der errechneten Korrelationskoeffizienten von 0,70-0,83 und der Anteil der Spots von 84,4%-97,4% im 2-fach Bereich als äußerst reproduzierbar und valide eingestuft werden.

D 2.5 Genexpressionsanalyse nach Induktion mit 200 ng/ml Norfloxacin

Die Auswertung der Expressionsraten der 5963 Spots ergab, dass nach 2-stündiger Induktion mit 200 ng/ml NFLX insgesamt 240 Spots eine Regulation und damit eine erhöhte Produktion von mRNA anzeigten. Aus der Analyse der $R_{E/K}$ resultierte eine Anzahl von 118 Spots, die auf eine gesteigerte Genexpression mit $R_{E/K} \geq 2,0$ und 122 Spots, die auf Genderegulation mit $R_{E/K} \leq 0,5$ hinwiesen. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse ermöglicht ein Histogramm (Abbildung D 12).

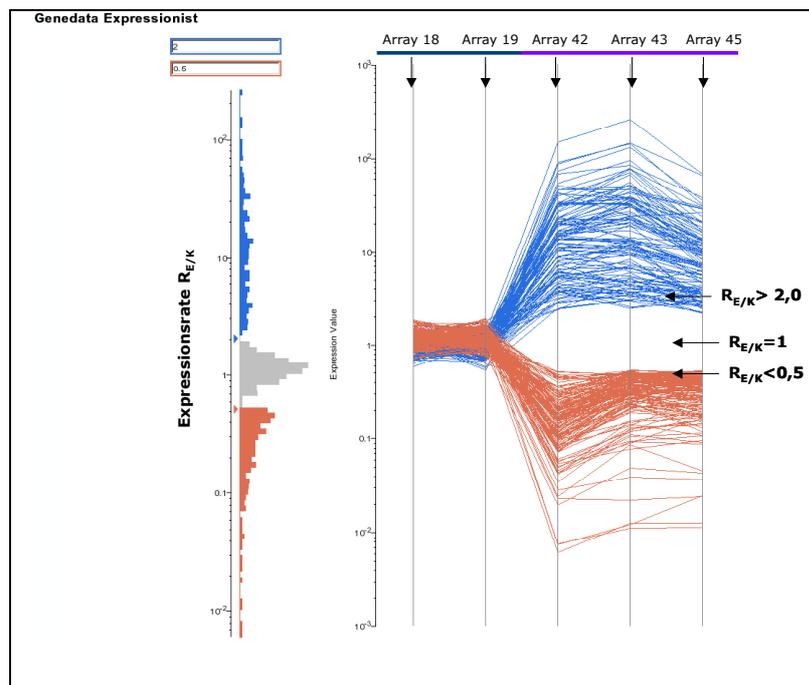


Abbildung D 12: Histogramm („Genedata Expressionist“) der analysierten 5963 Spots. Die blau markierten Linien repräsentieren Spots, die in den Experimentarrays hochregulierte und gleichzeitig in den Kontrollarrays nicht-regulierte Gene anzeigten. Die rot-markierten Linien repräsentieren Oligonukleotide, die deregulierte Gene in den Experimentarrays und gleichzeitig nicht-regulierte Gene in den Kontrollarrays anzeigten. Spots, die in allen Arrays Expressionsraten von $R_{E/K}$ zwischen 0,5 und 2,0 aufwiesen, sind nicht dargestellt.

In diesem Histogramm wird ersichtlich, dass die $R_{E/K}$ der Spots (Gene), die in den Experimentarrays 42, 43 und 45 eine Regulation mit $R_{E/K} > 2,0$ bzw. $R_{E/K} < 0,5$ (blaue bzw. rote Linien) anzeigten, in den Kontrollarrays (Array 18 und 19) nicht-reguliert vorlagen ($R_{E/K}$ zwischen 0,5 – 2,0) (D 2.4).

Die Genome der drei für den O157 Array verwendeten *E. coli* Stämme enthalten eine Reihe homologer Gene und Gensequenzen. Darüber hinaus befinden sich auch im Genom der einzelnen Stämme homologe Gene, wobei es sich dabei in erster Linie um Phagengene handelt. Auf dem O157 Array werden Gene mit mehr als 92% Sequenzidentität durch ein Oligonukleotid repräsentiert und nur Gene mit weniger als 92% Sequenzübereinstimmungen können durch den Array differenziert werden.

Stx- und nicht Stx-konvertierende Phagen setzen sich mosaikartig aus einzelnen verschiedenen genetischen Einheiten zusammen [Hendrix *et al.*, 2000; Campbell, 1994]. Die Struktur der essentiellen Gene für die frühe, verzögert-frühe und späte Transkription ist jedoch in allen intakten lambdoiden Phagen vorhanden. Daher kann geschlossen werden, dass einige Gene der im EDL933 vorkommenden Phagen bzw. Phagenelementen (w.z.B. Lysegene) Sequenzidentitäten größer 92% aufweisen und nicht durch mehrere, sondern nur durch ein Oligonukleotid dargestellt werden können. Für diese Gene wurde die Bezeichnung „unspezifisch“ bzw. „nicht eindeutig zuordenbar“ gewählt. Ein solches Oligonukleotid kann demnach nicht eindeutig einem Gen eines bestimmten Phagens zugeordnet werden, sondern kann unter Umständen Gene von verschiedenen Phagen repräsentieren.

Eine durch die errechnete Ratio angezeigte, erhöhte Genexpression kann in diesen Fällen nicht exakt auf mRNA eines einzelnen Genes zurückgeführt werden.

Auf Grund der Tatsache, dass ein Gen durch mehrere Oligonukleotide repräsentiert (Spots) bzw. ein Oligonukleotid mehrere Gene darstellen kann, wird in den folgenden Kapiteln nicht von hochregulierten Genen, sondern von Spots die eine Hochregulation von Genen anzeigen, gesprochen. Als „spezifisch reguliert“ werden im Folgenden die Spots bzw. Oligonukleotide bezeichnet, die eindeutig, d.h. spezifisch, einem einzigen Gen eines Phagen vom EDL933 zugewiesen werden können.

Auf Grund der Komplexität der erhaltenen Ergebnisse und des Designs des O157 Arrays wurden die hochregulierten Spots (Oligonukleotide) je nach Zugehörigkeit zu dem im EDL933 bzw. RIMD0509952 vorkommenden Phagen in einzelne Abschnitte und Tabellen aufgegliedert.

Von den 118 Spots die eine Hochregulation anzeigten, konnten 85 Spots eindeutig EDL933-Phagengenen zugeordnet werden, wovon 33 eindeutig dem Phagen BP-933W, neun dem Phagen CP-933V und weitere zehn den nicht Stx-kodierenden Phagen des

EDL933 angehören. Tabelle D 9 führt die hochregulierten Gene auf, die eindeutig EDL933-Phagen zugeordnet werden konnten. Ferner konnten 23 Oligonukleotide nicht eindeutig mit einem einzigen im EDL933 vorkommenden Phagen assoziiert werden (unspezifisch bzw. nicht eindeutige Oligonukleotide). Weitere 22 Oligonukleotide, die eine Hochregulation anzeigten, konnten Phagen vorkommend im Genom von *E. coli* O157:H7 Stamm RIMD0509952 zugewiesen werden. Elf Oligonukleotide zeigten eine Hochregulation von Genen, die keinen Phagen zugeordnet werden konnten. In den weiteren Abschnitten werden die eine Regulation anzeigenden Gene und deren Zuordnung detaillierter betrachtet.

D 2.5.1 Genregulation der Prophagen BP-933W und CP-933V

In Tabelle D 7 sind die Spots aufgeführt, die eine Hochregulation von Genen der Phagen BP-933W und CP-933V anzeigen. Die Genbezeichnungen basieren auf NCBI-Datenbankeinträgen [www.ncbi.nlm.nih.gov] und Angaben von MWG Biotech AG. Zusätzlich wurden in Tabelle 7 die MWG-internen Bezeichnungen (Ecov#2) der Oligonukleotide aufgeführt. Mit Hilfe dieser Angaben konnten auf der Homepage der Firma [<https://ecom.mwgdna.com/services/cgx/cgx-init>] im Compact Gene Index ferner Informationen zu jedem Gen und dessen Sequenzidentität zu weiteren, im EDL933 Genom vorkommenden Genen abgerufen werden.

Zur Vereinfachung wurden in Tabelle D 7 für die Gene der Phagen BP-933W bzw. CP-933V die Bezeichnung „z“ (z1424-1503 bzw. z3305-z3375) gewählt. Die Gene, die zudem im Genom von *E. coli* RIMD0509952 und K-12 MG1655 („Ecs“ und „b“) vorkommen, wurden nicht explizit aufgeführt. Die regulierten Gene, die auch im Genom von *E. coli* RIMD0509952 vorkamen, wurden jedoch gekennzeichnet.

Der im EDL933 Genom vorkommende intakte Prophage BP-933W enthält 71 offene Leserahmen [Perna *et al.*, 2001]. Die Genanordnung und das mittels Arraydaten erstellte Transkriptionsprofil des Prophagen BP-933W sind in Abbildung D 13 dargestellt. Insgesamt zeigten 33 Spots eine Hochregulation von Genen an, die eindeutig dem Prophagen BP-933W zugeordnet werden konnten und in der Abbildung D 13 als „eindeutig zuordenbar“ gekennzeichnet sind. Achtzehn Spots, die eine Hochregulation von Genen anzeigten, konnten dem Phagen BP-933W nicht spezifisch zugeordnet werden, da diese Oligonukleotide Gene repräsentieren, deren Sequenzidentitäten zu anderen im EDL933 Genom vorhandenen Genen größer 92% waren. Diese Gene wurden in das Expressionsprofil einbezogen und in Abbildung D 13 als „nicht eindeutig zuordenbar“ gekennzeichnet.

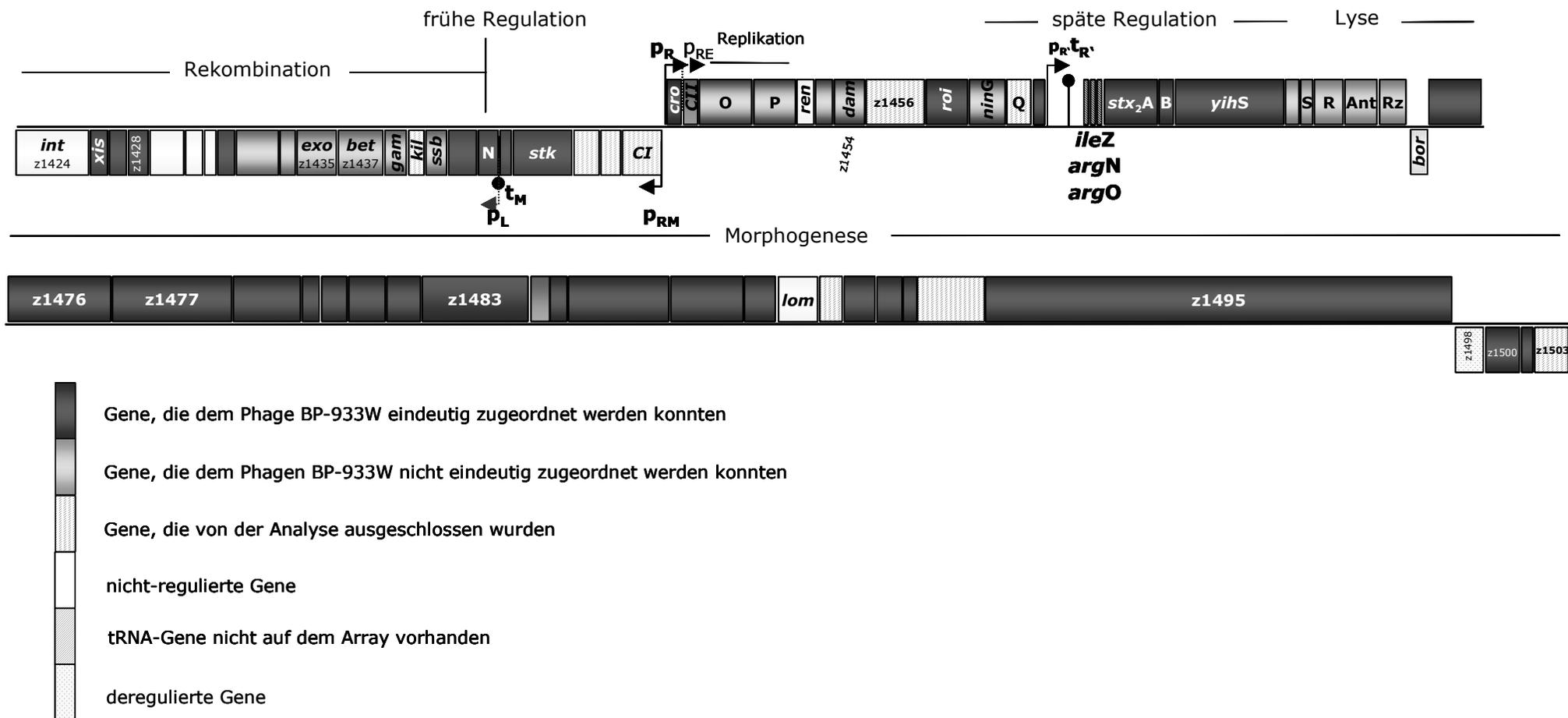


Abbildung D 13: Genanordnung und Transkriptionsprofil des Stx2-Bakteriophagen BP-933W nach 2-stündiger Induktion mit 200 ng/ml NFLX. Das Phagen genom besteht aus 71 offenen Leserahmen. Jedes Kästchen steht für ein Gen, wobei die Größe der Kästchen an Hand der Gengrößen berechnet wurden („in scale“). Die Genbezeichnung wurde der Datenbank NCBI (Zugangsnummer: NC_002655) entnommen. p: Promotor; t: Terminator

Tabelle D 7: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Funktionen, Expressionsraten und p-Werte der hochregulierten Gene der Stx-kodierenden Prophagen BP-933W und CP-933V nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligonukleotid- bezeichnung (Ecov# 2°)	Genbe- zeichnung#		Funktion ⁺	MR _{E/K}	MR _{E/K}	p-Werte ²
	BP-933W	CP-933V		(18/19) ¹	(42/43/45) ¹	
4393	Z1425*		hypothetische Excisionase (Xis)	0,8	4,0	0,0044
5580	Z1426*		hypothetisches Protein	1,0	3,4	0,0089
4394	Z1428*		hypothetisches Protein	1,0	3,3	0,0416
5583	Z1432*		hypothetisches Protein	0,7	8,5	0,0032
5584	Z1441		hypothetisches Protein	0,8	8,2	0,0057
5585	Z1442		hypothetisches Antiterminationsprotein N	1,3	30,1	0,0009
5586	Z1443		hypothetisches Protein	1,1	16,1	0,0013
5587	Z1444		Serin/Threonin Kinase (Stk)	1,3	21,9	0,0027
5591	Z1448		Cro	0,9	63,4	0,0010
5593	Z1457		hypothetisches DNA-Bindeprotein Roi	1,2	7,3	0,0150
4426	Z1460*		hypothetisches Protein	1,0	79,6	0,0031
4427	Z1464*		Shiga Toxin 2A	1,1	157,9	0,0026
4428	Z1465*		Shiga Toxin 2B	0,9	40,7	0,0005
4429	Z1466*		hypothetisches Protein	1,0	99,1	0,0009
5596	Z1475*		hypothetische kleine Terminaseuntereinheit	1,0	16,2	0,0010
5597	Z1476*		hypothetische große Terminaseuntereinheit	0,9	37,3	0,0047
4435	Z1477*		hypothetisches Protein	1,0	18,6	0,0074
5598	Z1478*		hypothetisches Protein	1,0	88,2	0,0049
4436	Z1479*		hypothetisches Protein	1,0	25,1	0,0230
4437	Z1480*		hypothetisches Protein	1,0	30,5	0,0222
5599	Z1481*		hypothetisches Protein	0,8	57,8	0,0044
4439	Z1482*		hypothetisches Protein	0,8	42,4	0,0056
4799	Z1483*		hypothetisches Schwanzfaserprotein	1,1	40,2	0,0097
4441	Z1485*		hypothetisches Protein	1,1	25,9	0,0069
4443	Z1486*		hypothetisches Protein	1,0	32,6	0,0095
5601	Z1487*		hypothetisches Schwanzfaserprotein	0,9	24,2	0,0219

4446	Z1488*	hypothetisches Protein	0,8	10,2	0,0017
5602	Z1491*	hypothetisches Protein	1,2	10,6	0,0182
5603	Z1492*	hypothetisches Protein	1,0	29,9	0,0121
5604	Z1493*	hypothetisches Protein	0,9	24,6	0,0095
4450	Z1495*	hypothetisches Protein	1,1	6,9	0,0471
4453	Z1500*	hypothetisches Protein	0,9	4,5	0,0185
4454	Z1501*	hypothetisches Protein	1,0	4,8	0,0280
4978	Z3342*	hypothetisches Protein	1,3	2,8	0,0090
4417	Z3352*	hypothetisches Protein	1,0	25,4	0,0135
5880	Z3352*	hypothetisches Protein	1,1	33,7	0,0003
4983	Z3354*	Ren	1,1	3,0	0,0042
4986	Z3361*	hypothetisches Regulationsprotein	0,8	16,0	0,0033
4990	Z3370*	hypothetisches Protein	1,0	3,3	0,0043
4992	Z3371*	hypothetisches Protein	0,8	4,5	0,0017
5887	Z3373*	hypothetisches Protein	1,1	4,4	0,0022
5888	Z3374	hypothetisches Protein	1,2	5,3	0,0101
5592	Z1433* Z3369*	hypothetisches Protein	0,7	10,4	0,0009
5503	Z1437* Z3366*	Rekombinationsprotein Bet	1,2	31,9	0,0023
5885	Z1438* Z3365*	Gam	1,0	20,3	0,0027
4403	Z1440* Z3363*	Einzelstrang-bindendes Protein Ea10	1,1	6,7	0,0018
4411	Z1449 Z3357	regulatorisches Protein CII	1,2	31,1	0,0008
4419	Z1453* Z3351*	hypothetisches Protein	0,9	16,0	0,0030
4420	Z1454* Z3349*	Dam-Methylase	1,0	16,0	0,0007
4424	Z1458* Z3346*	NinG	0,9	11,3	0,0028
4430	Z1467* Z3341*	hypothetisches Protein	1,1	20,0	0,0282
4597	Z1467* Z3341*	hypothetisches Protein	0,9	51,0	0,0013

° Oligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG entnommen aus dem „Compact Gene Index“.

* Homologe Gene, die auch im Stamm *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 (Ecs) vorkommen.

Die Genbezeichnungen sind der „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“- Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Zugangsnummer: AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ der Firma MWG Biotech AG entnommen.

+ Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ der Firma MWG Biotech AG entnommen. ¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle ($R_{E/K}$) der jeweiligen Arrays. ² p-Werte wurden mit dem T-Test ermittelt.

Tabelle D 8: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Funktionen, Expressionsraten und p-Werte der nichtregulierten, deregulierten bzw. von der Analyse ausgeschlossenen Gene des Stx-kodierenden Phagen BP-933W nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligonukleotid- bezeichnung (Ecov# 2°)	Genbe- zeichnung#		Funktion ⁺	MR _{E/K}	MR _{E/K}	p-Werte ²	Bemerkung
	BP-933W	CP-933V		(18/19) ¹	(42/43/45) ¹		
4392	Z1424*		hypothetische Integrase	1,2	1,6	0,4497	nicht-reguliert
5881	Z1429*		hypothetisches Protein	0,7	1,0	0,0993	nicht-reguliert
4395	Z1430*		hypothetisches Protein	1,2	1,2	0,7929	nicht-reguliert
5882	Z1431		hypothetisches Protein	1,0	1,1	0,8992	nicht-reguliert
4402	Z1439*	z3364	Kil Protein	1,0	12,4 ^B	0,11	p-Wert (p>0,05)
5888	Z1445		offener Leserahmen	1,5	2,4	0,1507	p-Wert (p>0,05)
5589	Z1446		hypothetisches Protein	1,6	2,9	0,0833	p-Wert (p>0,05)
5590	Z1447		hypothetischer Repressor CI	1,4	2,6 ^B	0,0877	p-Wert(p>0,05)
4416	Z1452*	z3352	hypothetisches Protein	1,0	1,3	0,2516	nicht-reguliert
5592	Z1456		hypothetisches Protein	0,9	1,9 ^B	0,1175	R _{E/K} Array 43,45 <2,0
5594	Z1459*	z3345	Antiterminator Q	0,9	1,9 ^B	0,0361	R _{E/K} Array 43,45 <2,0
0522	Z1474* ^A		Bor Protein	1,3	1,1	0,5722	nicht-reguliert
4447	Z1489*		hypothetisches Protein der äußeren Membran	0,9	1,2	0,2532	nicht-reguliert
4448	Z1490*		hypothetisches Protein	0,9	2,9 ^B	0,0769	p-Wert (p>0,05)
4449	Z1494*		hypothetisches Protein	1,0	3,9	0,0585	p-Wert (p>0,05)
4452	Z1498* ^A		hypothetisches Protein	1,4	0,2	0,0358	dereguliert
4457	Z1503*		hypothetisches Antirepressorprotein	1,0	2,4 ^B	0,0103	R _{E/K} Array 45 <2,0

° Oligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG entnommen aus dem „Compact Gene Index“. * Homologe Gene, die auch im Stamm *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 (Ecs) vorkommen. # Die Genbezeichnungen sind der „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“- Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Zugangsnummer: AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ der Firma MWG Biotech AG entnommen.

+ Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ der Firma MWG Biotech AG entnommen. ¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle (R_{E/K}) der jeweiligen Arrays. ² p-Werte wurde mit dem T-Test ermittelt. ^A Unspezifische Zuordnung der Gene zu dem Phagen BP-933W (Sequenzidentität zu anderen EDL933-Phagengen). ^B Mittelwert des Quotienten der Experimentarrays (MR_{E/K} (42/43/45) zwar >2,0 aber in einem der Experimentarrays R_{E/K}<2,0.

Anhand der errechneten $R_{E/K}$ erschienen die sieben Gene, z1424, z1429, z1430, z1431, z1452, z1474 und z1489 als nicht-reguliert ($R_{E/K} < 2,0$) und wurden deshalb als nicht-regulierte Gene in dem Transkriptionsprofil von BP-933W markiert (Abbildung D 13). Auf der Basis der errechneten p-Werten und $R_{E/K}$ wurden neun Gene von der Analyse ausgeschlossen und nicht in das Transkriptionsprofil einbezogen. Die für die offenen Leserahmen z1456, z1458 und z1503 errechneten $R_{E/K}$ -Werte waren in einem der Arrays $< 2,0$ und erfüllten somit nicht das Kriterium, um in die Analyse einbezogen zu werden. Die offenen Leserahmen z1439, z1445, z1446, z1447, z1490 z1494 wiesen p-Werte $> 0,05$ auf und unterschieden sich somit nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die errechnete Expressionsrate von $R_{E/K} = 0,2$ von z1498 zeigte unter den Versuchsbedingungen eine verringerte Expression (Tabelle D 8) an und wurde deshalb in dem Transkriptionsschema von BP-933W als dereguliertes Gen gekennzeichnet (Abbildung D 13). Die im Stx2-Phagen vorkommenden drei tRNA-Gene sind nicht auf dem O157 Array vorhanden.

Die detaillierte Betrachtung der Genregulation des Phagen BP-933W zeigte, dass in der frühen transkriptionellen Phase (Rekombination) des Prophagen BP-933W ausgehend von dem Gen *int* (z1424) bis zu dem Antiterminator *N* insgesamt sechs Gene (z1425, z1426, z1428, z1432, z1441 und z1442) eindeutig hochreguliert waren. Sechs weitere hochregulierte Gene dieser Region (z1433, z1434, z1435, z1437, z1438 und z1440) konnten nicht eindeutig dem BP-933W zugeordnet werden (Abbildung D 13). Die vier Gene z1424, z1429, z1430 und z1431 wurden angesichts des $R_{E/K}$ -Wertes als nicht-reguliert eingestuft und das Gen z1439 wurde auf Grund des p-Wertes ($p = 0,11$) von der Analyse ausgeschlossen (vgl. Tabelle D 7 und Tabelle D 8).

Im Bereich von *N* bis *Q* konnten die vier hochregulierten Gene, z1443, z1444, z1448 und z1457 eindeutig dem Phagen BP-933W und weitere sechs hochregulierte Gene (z1449, z1450, z1451, z1453, z1454 und z1458) unspezifisch dem 933W-Phagen zugeordnet werden (Tabelle D 7). Ein Gen erschien als nicht-reguliert (z1452, *ren*) und die drei Gene, z1445, z1446 und z1447 wurden von der Analyse ausgeschlossen, da der errechnete p-Wert die Kriterien nicht erfüllte. Die zwei Gene z1456 und z1459 wurden ebenfalls nicht in das Transkriptionsprofil einbezogen, da $R_{E/K} < 2,0$ in einem der Arrays war (Tabelle D 8). Dreiundzwanzig hochregulierte Gene aus der späten Phase, beginnend bei *Q* und endend bei dem, für die Morphogenese des Phagen verantwortlichen Struktur-Kopf-Schwanzfaser-Gen, z1503, konnten spezifisch dem Phagen 933W zugeordnet werden (Tabelle D 7). Die zur Lyseregion gehörenden Gene (z1467, z1468, z1471 und z1473) konnten dem Phagen BP-933W auf Grund des Oligonukleotiddesigns (Sequenzidentität $> 92\%$) nur unspezifisch (nicht eindeutig) zugewiesen werden. Die Gene der späten Phase *lom* und *bor* erschienen auf Grund ihrer

errechneten Expressionsrate als nicht-reguliert. Z1490 und z1494 wurden nicht in die Analyse einbezogen, da die errechnete p-Werte die Kriterien nicht erfüllt. Z1503 wies im Array 45 die $R_{E/K} < 2,0$ auf und wurde deshalb auch nicht in die Analyse einbezogen (Tabelle D 8).

Das Gen *bor* wird im Vergleich zu den anderen späten Phagengenen in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Daher besteht die Möglichkeit, dass keine mRNA gebildet wurde und somit auch keine Genregulation (nicht-reguliert) vorlag (vgl. Abbildung D 13). Nach Real-Time PCR-Untersuchungen wurde für den Genbereich *lom* kein Amplifikat bzw. Signal mittels der für *lomW* spezifischen Primer (*lomW-F/lomW-R*) erhalten. In D 2.5.8.1 sind die Ergebnisse weiterer Untersuchungen hinsichtlich der Transkription von *lomW* aufgeführt.

Eine genauere Betrachtung der Genexpressionsraten verdeutlicht, dass Gene, die nicht unmittelbar für die Phagenmorphogenese wichtig sind, jedoch mit Virulenzeigenschaften assoziiert werden, wie z. B. *stx*, *stk* oder *yjhS* zwischen 21,9 und 157,9-fach reguliert vorlagen. Die Expressionsraten von Genen der frühen Phase (Rekombination) ergaben Werte im Bereich von 3,3-30,1 (Tabelle D 7), im Bereich von *N* bis *Q* zwischen 7,3-63,4 und die der späten Phase von 4,8-88,2. Diese Gene wurden nicht stärker im Vergleich zu *stx*, *stk* oder *yjhS* exprimiert.

In Tabelle D 7 sind acht Gene (z3342, z3352 (2x, Replica), z3354, z3361, z3370, z3371, z3373 und z3374) aufgeführt, die eindeutig dem kryptischen Phagen CP-933V und weitere 10 Gene, die gleichzeitig dem Phagen BP-933W und CP-933V zugeordnet wurden, als hochreguliert aufgelistet. Auf Grund dessen wurde von dem Phagen CP-933V ebenfalls ein Transkriptionsprofil nach Induktion mit NFLX erstellt. Der *Stx1*-kodierende Phage CP-933V besteht aus 64 offenen Leserahmen [Perna *et al.*, 2001]. Zuzüglich der acht hochregulierten Gene, die eindeutig dem Phagen CP-933V zugeordnet werden konnten, zeigten insgesamt weitere 19 Oligonukleotide hochregulierte Gene an, die nicht eindeutig dem Phagen CP-933V zugewiesen werden konnten. Sechsenddreißig Gene des CP-933V waren unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht-reguliert und z3364 (z1439) (Tabelle D 8, Abbildung D 14) wurde von der Analyse ausgeschlossen, da $p > 0,05$ betrug. Die Mehrzahl der nicht-regulierten Gene gehörten der späten Phase an und sind für die Morphogenese des CP-933V Phagen verantwortlich. Die hochregulierten Lysegene konnten nur unspezifisch dem CP-933V-Phagen zugeordnet werden. Da die Höhe der Expressionsraten dieser Gene eher des BP-933W-Phagen ähneln, kann vermutet werden, dass die Regulation dieser Gene auf mRNA bzw. cDNA des 933W-Phagens basiert. Die *stxA/B₁* Gene zeigten nach Induktion mit NFLX keine erhöhte Expressionsraten an.

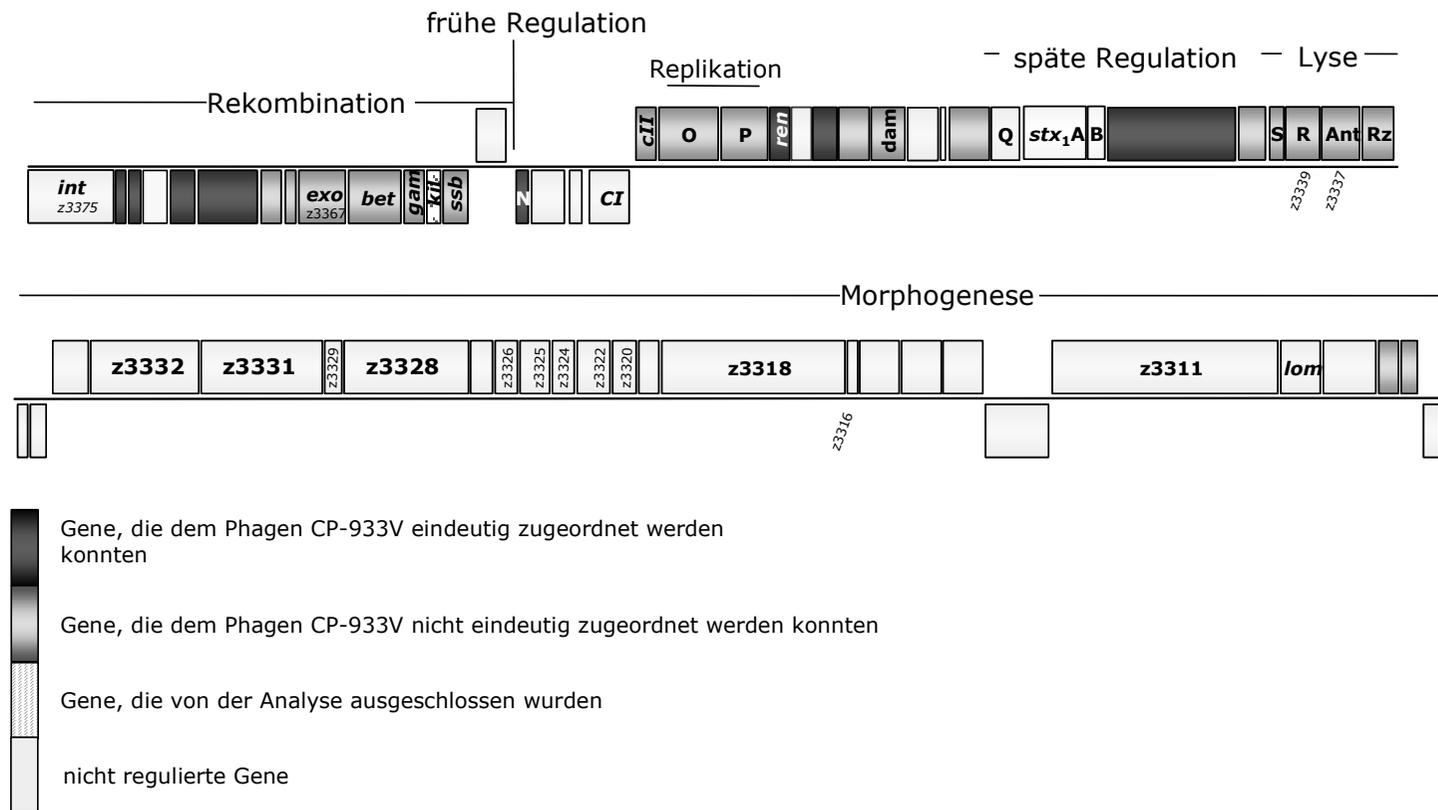


Abbildung D 14: Genanordnung und Transkriptionsprofil des Stx1-kodierenden Bakteriophagen CP-933V nach 2-stündiger Induktion mit 200 ng/ml NFLX. Das Phagengenom besteht aus 64 offenen Leserahmen. Jedes Kästchen steht für ein Gen, wobei die Größe der Kästchen nach Gengrößen berechnet wurde („in scale“). Die Genbezeichnung wurde der Datenbank NCBI (Zugangsnummer: NC_002655) entnommen.

D 2.5.2 Hochregulierte Gene nicht *stx*-kodierender Phagen

Die nachfolgende Tabelle D 9 führt die zehn hochregulierten Gene auf, die eindeutig den nicht *stx*-kodierenden Phagen des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 zugeordnet werden konnten. Die Expressionsraten dieser Gene lagen im Bereich von 3,9–21,8. Anhand der aufgeführten p-Werte der Experimentgruppe wird ersichtlich, dass sich die Werte signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden und so ein eindeutiges Signal vorlag. Eine gesteigerte Genexpression zeigten unter anderem drei Schwanzfaser gene (z0317, z0973 und z1893) sowie z0961, welches eine Endopeptidase kodiert, z2120, welches ein Endolysin und z3614, welches ein Injektionsprotein kodiert. Da nur einzelne Gene der Phagen reguliert waren, wurden keine zusammenhängenden Transkriptionsprofile für diese Phagen erstellt. Weshalb nur einzelne Gene reguliert vorlagen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Tabelle D 9: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Funktionen, Expressionsraten und p-Werte der hochregulierten Gene nicht-*stx*-kodierender Bakteriophagen nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligo- bezeich- nung (Ecov#2)	Genbe- zeichnung[#]	Phage	Funktion⁺	MR_{E/K} (18/19)¹	MR_{E/K} (42/43/45)¹	p-Werte²
4204	Z0317*	CP-933H	hypothetisches Schwanzfaserprotein	1,1	5,1	0,0057
4602	Z0961	CP-933K	hypothetische Endopeptidase Rz	0,9	17,5	0,0070
4309	Z0973*	CP-933K	hypothetisches Schwanzfaserprotein	0,9	3,9	0,0006
4591	Z1781*	CP-933N	hypothetisches Protein	1,2	8,8	0,0014
4665	Z1893*	CP-933X	Schwanzfaserprotein	0,9	21,8	0,0046
4365	Z2120*	CP-933O	hypothetisches Endolysin	0,9	18,6	0,0020
5782	Z2391*	CP-933R	hypothetisches Protein	0,9	8,5	0,0025
4879	Z2970*	CP-933T	hypothetisches DNA-Bindeprotein Cox	1,1	2,9	0,0427
5842	Z3098*	CP-933U	hypothetisches Porenprotein	0,9	4,0	0,0006
5017	Z3614*	^A	hypothetisches Injektionsprotein	1,0	2,8	0,0176

^o Oligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG entnommen aus dem „Compact Gene Index“.

* Homologe Gene, die auch im Stamm *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 (Ecs) vorkommen.

[#] Die Genbezeichnungen sind der NCBI- Datenbank (Zugangsnummer: AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ entnommen.

⁺ Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ entnommen.

¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle der jeweiligen Arrays.

² p-Werte wurden mit dem T-Test ermittelt.

^A Gen, welches sich in der O-Insel #152 befindet (Zugangsnummer: NCBI NC_002655).

D 2.5.3 Analyse weiterer hochregulierter Gene von EDL933

Dreiundzwanzig Spots zeigten eine Hochregulation von Genen an, die nicht eindeutig einem einzigen Gen zugeordnet werden konnten, da die Sequenzidentität dieser Gene zueinander größer 92% beträgt. Dabei handelt es sich vorwiegend um Gene, die für Replikation, Rekombination, Morphogenese und Lyse kodieren. Das Gen, welches für das Holin-Protein (z1350) kodiert, besitzt zu acht weiteren im EDL933 Genom vorkommenden Phagengenen Sequenzidentität von mehr als 92% und konnte dadurch nicht durch ein einzelnes Oligonukleotid auf dem O157 Array repräsentiert werden. Das Oligonukleotid Ecov#2/4431 (Tabelle D 10) repräsentiert somit acht Gene verschiedener Phagen von EDL933. Demzufolge konnte der Spot bzw. das Oligonukleotid, welches eine Hochregulation anzeigt, nicht einem einzigen Phagen zugeordnet werden. In Tabelle D 10 sind die Genbezeichnungen und die damit verbundenen Assoziationen zu den im EDL933 Genom vorkommenden Phagen für die Oligonukleotide aufgelistet. Die Expressionsraten von 3,3-44,0 sprechen für eine intensive Transkriptionsaktivität unter den gewählten Bedingungen. Auf der Basis der mittels Arraytechnologie erhaltenen Daten war es nicht möglich, eindeutige Aussagen dahingehend zu treffen, ob eine Regulation auf die mRNA eines einzelnen Gens oder mehrerer zueinander sequenzidentischer Gene zurückzuführen ist. Auf Grund der zahlreichen regulierten Gene, die spezifisch den Phagen BP-933W und CP-933V zugeordnet werden konnten, wurde vermutet, dass die Regulation der unspezifischen Oligonukleotide aus der intensiven Expression dieser beider Phagen resultiert. Daher wurden diese, eine Regulation anzeigenden Gene in das Transkriptionsprofil des Phagen BP-933W und CP-933V einbezogen.

Tabelle D 10: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Funktionen, Expressionsraten und p-Werte der hochregulierten Gene mit einer Sequenzidentität >92% zu weiteren EDL933-Phagengenomen nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligobezeichnung (Ecov#2°)	Genbezeichnung	Funktion	Prophagenassoziation	MR _{E/K} (18/19) ¹	MR _{E/K} (42/43/45) ¹	p- Wert ²
4982	Z0311, Z1450, Z3356*	Replikationsprotein O	CP-933 H, V, BP-933W	1,0	3,3	0,0146
4203	Z0312, Z1450, Z3356*	Replikationsprotein O	CP-933 H, V, BP-933W	1,2	5,2	0,0023
5502	Z0949, Z1433, Z3369*	hypothetisches Protein	CP-933 K, V, BP-933W	1,2	9,6	0,0032
4292	Z0950, Z1434, Z3368*	hypothetisches Protein	CP-933 K, V, BP-933W	0,9	12,9	0,0003
0508	Z0951, Z1435, Z3367*	hypothetische Exonuklease	CP-933 K, V, BP-933W	0,8	8,1	0,0007
4400	Z0951, Z1435, Z3367*	Exonuklease	CP-933 K, V, BP-933W	0,8	7,4	0,0022
5503	Z0952, Z1437, Z3366*	Rekombinationsprotein Bet	CP-933 K, V, BP-933W	0,9	15,2	0,0007
5931	Z0953, Z1458, Z3346*	NinG	CP-933 K, V, Y, W	1,1	11,3	0,0037
5873	Z3934 Z0982, Z3307*	hypothetisches Schwanzfaser- protein	BP-933W CP-933 K, V	1,3	44,0	0,0072
4763	Z0982, Z1483, Z2147, Z2340, Z3074, Z3307, Z6027*	hypothetisches Schwanzfaser- protein	CP-933 K, M, R, O, U, V, P	1,3	36,3	0,0169
4440	Z0984, Z1383, Z1484,*Z2148, Z3073, Z3306,*Z6026	hypothetisches Protein	CP-933 K, M, O, U, V,P	1,1	27,7	0,0053

4764	Z0984, Z1484*	hypothetisches Protein	CP-933 K, BP-933W	1,0	16,4	0,0041
4431	Z1350, Z1468, Z2374 Z3340, Z2069, Z2122 Z3106, Z1794, Z6053*	hypothetisches Holinprotein	CP-933 M, N, O, R, U, V, P, BP-933W	0,9	25,1	0,0027
5719	Z1352, Z1469, Z1796* Z2120, Z2371, Z3104 Z3339, Z6051	hypothetisches Endolysin	CP-933 M,N, O, R, U V, P, BP-933W	0,8	21,8	0,0030
4432	Z1352, Z1469, Z1796, Z6051, Z2120, Z2371 Z3104, Z3339	hypothetisches Lysozym	CP-933 M,N, O, R, U, V, P, BP-933W	0,8	19,7	0,0101
5565	Z1352, Z1469, Z1796, Z2071, Z2120, Z2371, Z3104, Z3339, Z6051	hypothetisches Endolysin	CP-933 M,N, O, R, U, V, P, BP-933W	1,0	9,7	0,0034
4433	Z1353, Z1471, Z3103 Z3337, Z6050	hypothetischer Antirepressor	CP-933M,U,V,P, BP-933W	0,9	16,7	0,0023
5877	Z1354, Z1473, Z1798* Z2118, Z2369, Z3101 Z3336, Z6049	hypothetische Endopeptidase	CP-933M,N,O,R, U, V, BP-933W	0,9	15,9	0,0042
4705	Z1354, Z1473, Z3101, Z6049	hypothetische Endopeptidase	CP-933M,U, BP-933W	0,9	29,5	0,018
4812	Z1354, Z1473, Z1798, Z2118, Z2369, Z3101 Z3336, Z6049	hypothetischer Rz1 Vorläufer- Protein	CP-933M,N, O, R, U,V, BP-933W	1,0	11,2	0,0050
4964	Z1383, Z2148, Z3306*	hypothetisches Protein	CP-933M, O, V	1,0	11,8	0,0035
4455	Z1432, Z1501, Z3370*	hypothetisches Protein	CP-933V, BP-933W	1,1	19,1	0,0019
4651	Z1451, Z1869, Z3355*	Replikationsprotein P	CP-933V, X, BP-933W	0,8	3,7	0,0013

° Oligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG entnommen aus dem „Compact Gene Index“.

* Homologe Gene, die auch im Stamm *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 (Ecs) vorkommen.

Die Genbezeichnungen sind der NCBI- Datenbank (Zugangsnummer: AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ entnommen.

† Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ entnommen.

¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle der jeweiligen Arrays.

² p-Werte wurden mit dem T-Test ermittelt.

D 2.5.4 Analyse der für *E. coli* O157:H7 Stamm RIMD0509952 spezifischen Gene

Weitere 22 Oligonukleotide, die eine Hochregulation anzeigten, konnten Prophagenen von *E. coli* O157:H7 Stamm RIMD0509952 zugewiesen werden. Die Expressionsraten dieser Gene zeigten eine intensive Transkriptionsaktivität ($R_{E/K}$ 3,1-36,8) an (Tabelle D 11). Im Rahmen der Transkriptionsanalysen wurde jedoch nur mit dem *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 gearbeitet und somit die auf dem O157 Array immobilisierten Oligonukleotide nur mit cDNA von EDL933 hybridisiert. Die Hochregulation der in Tabelle 11 aufgeführten Gene beruht vermutlich auf Kreuzhybridisierung der transkribierten cDNA von EDL933 mit den für RIMD0509952 spezifischen Oligonukleotiden. Bereits Makino *et al.* [1999] beschrieben Sequenzidentitäten zwischen Genen des Phagen VT2-Sakai von *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 und des BP-933W von *E. coli*. In Tabelle D 11 ist daher die Zuordnung der jeweiligen Oligonukleotide zu Genen des RIMD0509952-Prophagen (SP, Sakai-Phage) und die Assoziation zu den jeweiligen Prophagen von EDL933 aufgeführt. Vorwiegend konnten die regulierten Gene dem Phagen SP5 zugeordnet werden und auf Grund der Sequenzidentität in Verbindung mit dem Phagen 933W gebracht werden. Wie in den vorherigen Abschnitten bereits dargelegt, wies BP-933W die höchste Genaktivität auf. Die hochregulierten SP5-Gene wiesen, wie auch die des Phagen BP-933W die höchsten Expressionsraten (3,9-36,8) auf (Tabelle D 11). Die vermutete Kreuzhybridisierung wird durch diese Tatsachen bekräftigt. Bei genauer Betrachtung der regulierten Gene zeigte sich, dass es sich hauptsächlich um Gene, die für hypothetische Proteine kodieren handelte (Tabelle D 11).

Tabelle D 11: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Expressionsraten, p-Werte und Funktionen der hochregulierten Gene spezifisch für *E. coli* RIMD0509952 Phagen (SP) nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligo- bezeichnung (Ecov#2°)	Genbe- zeichnung [#]	Funktion ⁺	Prophagen- assoziatio* RIMD EDL933		MR _{E/K}	MR _{E/K}	P- Wert ²
					(18/19) ¹	(42/43/45) ¹	
4200	ECS0272	Transkription	Sp1 (CP-933H)		1,3	7,2	0,0024
4202	ECS0275	Antiterminationsprotein, Cro Repressor	Sp1 (CP-933H)		1,1	4,7	0,0009
4290	ECS0805, ECS1170, ECS3006	hypothetisches „C4-type zinc finger protein, TraR-family“	SP3, 5, 15 (CP-933K, W, V)		1,0	10,0	0,0048
4399	ECS0808, ECS1173, ECS3003	hypothetisches Protein	SP3, 5, 15 (CP-933K, W, V)		0,9	8,7	0,0017
4293	ECS0810, ECS1197, ECS2980	NinE Protein	SP3, 5, 15 (CP-933K, W, V)		0,9	16,2	0,0054
4315	ECS0844	hypothetisches Schwanzfaser- protein	SP3	(CP-933K)	1,0	33,0	0,0024
4397	ECS1167	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	1,3	9,9	0,0020
4398	ECS1168	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	1,1	3,9	0,0008
4989	ECS1176, ECS2999	Gam	SP5	(BP-933W)	1,0	11,4	0,0274
4418	ECS1194, ECS2983	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	0,9	18,6	0,0013
4415	ECS1191	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	1,0	36,8	0,0030
4422	ECS1199	hypothetisches Anti- repressorprotein	SP5	(BP-933W)	0,8	5,1	0,0015
4425	ECS1202, ECS2976	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	0,8	14,0	0,0017
4434	ECS1218	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	0,9	30,7	0,0053

4438	ECS1226	hypothetisches Protein	SP5	(BP-933W)	1,1	26,0	0,0074
4581	ECS1503	hypothetisches Protein	SP6	(CP-933N)	1,0	3,0	0,0204
4601	ECS1534	hypothetische Endopeptidase	SP6	(CP-933M)	0,8	5,6	0,0069
4604	ECS1537	hypothetisches Protein	SP6	(CP-933M)	1,0	19,0	0,0057
4983	ECS2989	hypothetisches Regulatorprotein	SP15	(CP-933V)	0,8	12,3	0,0027
4991	ECS3008	hypothetisches Protein	SP15	(CP-933V)	0,9	3,1	0,0013
4993	ECS3011	hypothetisches Protein	SP15	(CP-933V)	1,0	5,3	0,0133
4994	ECS3012	hypothetische Excisionase	SP15	(CP-933V)	0,9	3,3	0,0045

^oOligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG entnommen aus dem „Compact Gene Index“.

[#] Die Genbezeichnungen sind der NCBI- Datenbank (Zugangsnummer: AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ entnommen.

^{*}SP: Bezeichnung der Prophagen von *E. coli* O157:H7 RIMD0509952; CP/BP: Bezeichnung der Prophagen von *E. coli* O157:H7 EDL933.

⁺ Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ entnommen.

¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle der jeweiligen Arrays.

² p-Werte wurden mit dem T-Test ermittelt.

D 2.5.5 Weitere hochregulierte, nicht-phagenkodierte Gene

In Tabelle D 12 sind die hochregulierten Gene aufgelistet, die keinen Phagen zugeordnet werden konnten. Die Gene z2083 und z5182 kodieren für Stressproteine und z5070 für ein Protein der SOS-Antwort. Die errechneten Expressionsraten von $R_{E/K}=2,8-5,8$ sprechen für eine geringe Genaktivität nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX. Unter diesen gewählten Bedingungen wurden keine weiteren Stress oder für die SOS-Antwort verantwortlichen regulierten Gene gefunden.

Tabelle D 12: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Funktionen, Expressionsraten und p-Werte der hochregulierten, nicht-phagenassoziierten Gene nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligonukleotid-bezeichnung (Ecov#2°)	Genbezeichnung [#]	Funktion ⁺	$MR_{E/K}$ (18/19) ¹	$MR_{E/K}$ (42/43/45) ¹	p-Wert ²
4473	Z1120, Z1559*	hypothetische P4 Integrase	0,9	3,8	0,0132
5542	Z1180, Z1619*	hypothetisches Protein	0,8	2,9	0,0035
4574	Z1226, Z1664	hypothetische Dehydrogenase	0,9	3,1	0,0226
4471	Z1555*	unbekannte Funktion	1,3	4,4	0,0305
4797	Z2083, Z2152*	hypothetisches „DNA-damage-inducible protein“	1,1	5,8	0,0268
5751	Z2242	unbekannte Funktion	1,1	3,5	0,0118
6063	Z5070*	„DNA-damage-inducible protein“ (DinD)	1,0	2,7	0,0222
6068	Z5129*	hypothetisches Protein	1,6	4,6	0,0250
5226	Z5136*	hypothetisches Protein	1,0	5,8	0,0014
3495	Z5182*	Hitzeschockprotein;	0,8	3,1	0,0194
4069	Z5906*	YjH	0,9	4,7	0,0039

°Oligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG entnommen aus dem „Compact Gene Index“.

[#] Die Genbezeichnungen sind der NCBI- Datenbank (AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ entnommen.

⁺ Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ entnommen.

* Prophagenassoziation, SP Prophagenbezeichnung *E. coli* O157:H7 RIMD0509952, CP/BP Prophagenbezeichnung *E. coli* O157:H7 EDL933.

¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle.

² p-Werte wurden mit dem T-Test ermittelt.

D 2.5.6 Deregulierte Gene

Nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX wurden 122 Spots gefunden, die deregulierte Gene anzeigten. Tabelle D 14 führt die Expressionsraten, p-Werte und die Funktion aller deregulierten Gene auf. Die errechneten Expressionsraten dieser Gene lagen im Bereich von $R_{E/K} < 0,05-0,5$. Nur der offene Leserahmen z1498, mit einer Expressionsrate von $R_{E/K} = 0,2$ konnte einem Phagen zugeordnet werden. Zur Übersicht sind die deregulierten Gene in Tabelle D 13 in funktionelle Gruppen eingeteilt.

Tabelle D 13: Einteilung der deregulierten Gene von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 in funktionelle Gruppen.

Funktionelle Gruppeneinteilung	Anzahl der regulierten Gene*
Aminosäurebiosynthese	6
Proteinbiosynthese	8 (1x Replica)
Osmoregulation	1
Energiestoffwechsel	24 (1x Replica)
Zellteilung	4
Zellwand	1
Fettsäurestoffwechsel	2
Membranproteine	8
regulatorische Proteine	4 (1x Replica)
LEE-Region	7
Transportproteine	2
Primärstoffwechsel	6
Resistenz	2
Toxine	1
Insertionselemente	1
Phagenassoziiert	1
unbekannte Funktion ^A	38
Ungruppierte Gene ^B	6

*Replica bezeichnen die Oligonukleotide, die zweimal auf dem O157 Array immobilisiert vorliegen und nach Induktion mit NFLX deregulierte Gene anzeigten.

^A Aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen konnte keine Genfunktion abgeleitet werden. ^B Die Gene konnten den aufgeführten funktionelle Gruppen nicht zugeordnete werden.

Hauptsächlich kodieren die deregulierten Gene metabolische Funktionen im Energie- und Aminosäurehaushalt, Fettsäurestoffwechsel und Zellwandbiosynthese (Tabelle D 13). Insgesamt zeigten 24 Gene, die Funktionen des Energiestoffwechsel der Zelle innehaben, verminderte Genaktivitäten an. Die Gene *sucA* und *sucD* kodieren für die Enzyme 2-Oxoglutaratdehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase, die im Zironensäurezyklus involviert sind.

Die beiden Gene *cydA* und *cydB* kodieren für eine Cytochromoxidase (engl.: "Cytochrome D Terminal Oxidase Complex"), welche Bestandteil der sauerstoffabhängigen Atmungskette von *E. coli* ist. Die Expressionsraten von $R_{E/K}=0,2-0,1$ zeigen eine deutliche Deregulation und die errechneten p-Werte von $p < 0,026$ zeigten ein signifikantes Ergebnis an.

Ferner wurden die Gene *nuoN/I/H/E*, welche für NADH-Dehydrogenasen kodieren, unter den gewählten Versuchsbedingungen als dereguliert identifiziert. Diese Enzyme vermitteln einen Elektronentransfer in der Atmungskette, die dabei freiwerdende Energie wird als elektronisches Membranpotential für andere Enzyme zur Verfügung gestellt. Neben den deregulierten Genen des Basisstoffwechsels, wurden auch sieben Gene (*espA, B, D, cesT, sepZ, sepL* und *escV*) des LEE als dereguliert gefunden, ebenso Gene für das „Adherence Cytotoxin“ (z4332) und für das „Shet2-like Toxin“ (z4326).

Das bei den uropathogenen *E. coli* als Virulenzfaktor angesehenes Protein der äußeren Membran (*ompT*) zeigt ebenfalls eine verringerte Expression an [Kanamaru *et al.*, 2003].

Des Weiteren wurde der offene Leserahmen, *sodB*, welcher für eine Superoxiddismutase kodiert, vermindert exprimiert. SodB ist an der Detoxifikation von O₂-Radikalen beteiligt, die hauptsächlich für den Zelltod in der stationären Phase verantwortlich sein sollen. Alle weiteren deregulierten Gene sind in Tabelle D 14 aufgeführt. In den meisten Fällen handelt es sich um Gene, die hypothetische Proteine kodieren und deren Funktion und Zuordnung in biochemische Kreisläufe noch nicht exakt aufgeklärt ist.

Tabelle D 14: Oligonukleotid- und Genbezeichnungen, Expressionsraten, p-Werte und Funktionen und Einteilung in biochemische Kreisläufe der de-regulierten Gene nach Induktion des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit 200 ng/ml NFLX.

Oligo- bezeich- nung (Ecov#2°)	Genbe- zeichnung#	Funktion+	Ein- ordnung~	MR_{E/K} (18/19)¹	MR_{E/K} (42/43/45)¹	p-Wert²
0004	Z0004	Threoninsynthetase, ThrC	AS	1,1	0,3	0,0187
5392	Z0057	CcdB-ähnliches Protein	n.g.	1,6	0,4	0,0043
0089	Z0103	Zellteilungsprotein, FtsQ	Cd	1,4	0,3	0,0061
0090	Z0104	ATP-abhängiges Zellteilungsprotein, FtsA	Cd	1,5	0,2	0,0042
0107	Z0124	Pyruvatdehydrogenase, AceE	E	1,0	0,3	0,0191
0562	Z0740	„carbon starvation protein“ CstA	B	1,0	0,2	0,0018
0571	Z0751	hypothetisches Protein	unbekannt	1,2	0,3	0,0373
0619	Z0805	hypothetisches periplasmatisches Transportprotein, YbeJ	n.g.	1,5	0,4	0,0138
0677	Z0880	2-Oxoglutaratdehydrogenase, SucA	E	1,0	0,2	0,0255
0680	Z0883	Succinyl-CoA Synthetase, SucD	E	1,2	0,2	0,0153
0684	Z0900	Cytochromoxidase, CydA	E	1,5	0,2	0,0257
0698	Z0901	Cytochromoxidase, CydB	E	1,5	0,1	0,0148
	Z0924	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase, AroG	E	1,0	0,5	0,0084
0746	Z1024	hypothetisches Protein	unbekannt	1,1	0,2	0,0452
0755	Z1034	globaler Regulator, Dps	R	1,2	0,2	0,0124
0778	Z1062	hypothetischer Rezeptor, b0836	unbekannt	1,0	0,2	0,0318
4330	Z1095	hypothetisches Enzym	unbekannt	1,5	0,3	0,0089
0812	Z1105	hypothetische Oxidase, PoxB	E	1,0	0,4	0,0467
4525	Z1175, Z1614	hypothetisches Telluriumresistenzprotein, TerD	Res	1,7	0,2	0,0113
4526	Z1176, Z1615	hypothetisches Telluriumresistenzprotein, TerE	Res	1,5	0,3	0,0101
4554	Z1203, Z1643	hypothetisches Protein	unbekannt	1,2	0,2	0,0431
4548	Z1198 ^A	hypothetische Transposase, Insertionssequenz IS629,	Is	1,4	0,3	0,0283
0837	Z1243	hypothetisches Protein	AS	1,0	0,3	0,0446

0892	Z1303	"ribosome modulation factor" Rmf	P	1,0	0,0	0,0002
	Z1303 Replica	"ribosome modulation factor" Rmf	Replica	1,2	0,0	0,0000
0910	Z1389	Hydrogenase-1-Untereinheit, HyaA	E	0,8	0,2	0,0077
4452	Z1498, Z2099	hypothetisches Protein	Phage	1,4	0,2	0,0358
0995	Z1701	Glutaredoxin 2, GrxB	E	1,2	0,3	0,0317
1024	Z1732	3-Oxoacyl-Reduktase, FabG	FS	1,2	0,3	0,0392
1030	Z1739	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,3	0,0464
1038	Z1747	hypothetisches Protein	unbekannt	1,6	0,3	0,0198
0530	Z1931	Protein der äußeren Membran (a), OmpT	M	1,0	0,3	0,0093
1117	Z1951	vermutliches Sporulationsprotein, YcgB	unbekannt	0,9	0,4	0,0179
1118	Z1952	D-Aminosäuredehydrogenase, DadA	AS	1,0	0,3	0,0212
1134	Z1976	hypothetisches Protein	unbekannt	1,1	0,1	0,0035
1164	Z2013	DNA-Bindeprotein, Hns	R	1,4	0,4	0,0029
	Z2013 Replica	DNA-Bindeprotein, Hns	R	1,2	0,3	0,0090
1183	Z2034	hypothetisches Protein der äußeren Membran, YciD	M	1,1	0,1	0,0087
1183	Z2034	Membranprotein	M	1,2	0,1	0,0112
1300	Z2335	hypothetisches Filamentprotein, YnaF	n.g.	1,3	0,3	0,0323
1349	Z2292	hypothetisches Protein	unbekannt	1,1	0,3	0,0189
1401	Z2230	ribosomale 30S Untereinheit, Protein S22, RpsV	P	1,3	0,0	0,0047
1413	Z2216	säuresensitives Protein, XasA	B	1,1	0,0	0,0006
1414	Z2215, Z4930	Glutamatdecarboxylase-Isoenzyme, GadB	E	1,4	0,0	0,0021
5805	Z2565, Z3918	BfpT-reguliertes Chaperonprotein	n.g.	1,6	0,4	0,0185
1494	Z2569	hypothetisches Protein	M	1,0	0,1	0,0012
1531	Z2624	NAD-abhängige 7 α - Hydroxysteroiddehydrogenase, hdhA	E	1,4	0,2	0,0176
1568	Z2678	Superoxiddismutase, SodB	B	1,3	0,2	0,0446
1577	Z2694	hypothetisches Protein	unbekannt	1,4	0,3	0,0287
1587	Z2705	Murein-Lipoprotein, Lpp	ZW	1,0	0,3	0,0190
1589	Z2707	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,5	0,0409
1622	Z2741	Faktor für Wirtsintegrations (IHF), Rekombination, HimA	B	1,3	0,3	0,0215
1632	Z2742	Phenylalanin-tRNA Synthetase, PheT	P	1,2	0,2	0,0007
1634	Z2753	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,3	0,0082

1649	Z2769	Aktivator des ntrL-Gens, OsmE	Osmo	1,2	0,3	0,0451
1687	Z2816	hypothetisches Protein	unbekannt	1,1	0,3	0,0284
1688	Z2817	hypothetisches Protein	unbekannt	1,0	0,2	0,0337
1693	Z2823	hypothetisches Protein	unbekannt	1,0	0,1	0,0060
1723	Z2859	hypothetisches Transportprotein, YoaE	M	1,0	0,3	0,0183
4871	Z2868	Kälteschockprotein, CspC	B	1,0	0,4	0,0209
1730	Z2869	hypothetisches Protein	unbekannt	1,1	0,2	0,0114
1744	Z2885	Phosphatase 1-Protein (Signalprotein), PphA	P	0,8	0,3	0,0441
1798	Z2950	Trehalose-6-phosphatphosphatase, OtsB	E	1,2	0,3	0,0089
1853	Z3048	hypothetisches Protein	unbekannt	1,2	0,3	0,0429
1863	Z3059	hypothetisches Protein	unbekannt	1,4	0,1	0,0203
4931	Z3180	Operon für his; HisL	AS	1,1	0,2	0,0116
4938	Z3198	GDP-D-Mannosedehydratase	E	1,4	0,2	0,0020
2028	Z3401	hypothetische Oxidoreduktase, b2146	unbekannt	1,5	0,1	0,0163
4999	Z3473	Protein der äußeren Membran, OmpC	M	1,4	0,2	0,0071
2145	Z3526	hypothetisches Protein	unbekannt	1,4	0,2	0,0131
2155	Z3534	NADH Dehydrogenase I, NuoN	E	1,2	0,4	0,0035
2160	Z3540	NADH Dehydrogenase I, NuoI	E	1,2	0,2	0,0239
2161	Z3541	NADH Dehydrogenase I, NuoH	E	1,3	0,2	0,0225
2164	Z3544	NADH Dehydrogenase I, NuoE	E	1,4	0,3	0,0072
2145	Z3869	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,3	0,0230
2460	Z3890	vermutlicher yhbH Sigma 54 Modulator, YfiA	R	1,3	0,2	0,0035
2469	Z3901	tRNA-(Guanin-7)-Methyltransferase, RmD	P	1,2	0,3	0,0293
2470	Z3902	hypothetisches Protein	unbekannt	1,2	0,4	0,0038
2550	Z3998	Regulator für Kohlenstoffspeicher, Glycogensynthese, CsrA	B	1,2	0,4	0,0061
2748	Z4241	GcvH	Cd	1,6	0,3	0,0147
2749	Z4242	Tetrahydrofolat-abhängige Aminomethyltransferase, GcvT	AS	1,4	0,4	0,0167
5997	Z4325	hypothetisches Protein	unbekannt	1,4	0,4	0,0167
5998	Z4326	hypothetisches Enterotoxin	Tox	1,4	0,4	0,0199
5110	Z4332	hypothetischer Adhärenzfaktor	unbekannt	1,2	0,4	0,0120
5125	Z4401	Glycogenbiosynthese, rpoS abhängig, GlgS	E	1,0	0,2	0,0211

	Z4401 Replica	Glycogenbiosynthese, rpoS abhängig, GlgS	E	1,1	0,2	0,0148
2931	Z4451	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,2	0,0079
2932	Z4452	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,1	0,0082
2937	Z4457	hypothetisches Cytochrome, YhaH	E	1,2	0,4	0,0034
3009	Z4541	Zellteilungspolypeptid, FtsJ	Cd	1,3	0,3	0,0063
3032	Z4565	RNA Polymerase, Sigma (54 o. 60) Faktor, rpoN	P	1,4	0,1	0,0087
3105	Z4654	hypothetische DNA-Topoisomerase, RdD	n.g.	1,5	0,3	0,0138
3106	Z4655	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,4	0,0255
3113	Z4661	MscL	Tr	1,3	0,4	0,0166
3224	Z4758	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, PckA	E	1,3	0,3	0,0161
3250	Z4792	Glucose-1-Phosphatadenyltransferase, GlgC	E	1,4	0,4	0,0144
3309	Z4894	hypothetisches Protein	unbekannt	0,9	0,3	0,0091
3320	Z4908	Membranprotein, Slp	M	1,1	0,1	0,0021
3323	Z4921	hypothetisches Protein	unbekannt	1,5	0,1	0,0104
3324	Z4922	hypothetisches Protein	unbekannt	1,5	0,0	0,0001
3325	Z4923	hypothetisches Protein	unbekannt	1,2	0,2	0,0214
3326	Z4925	hypothetisches Protein	unbekannt	1,4	0,1	0,0048
3366	Z4980	hypothetisches Protein	unbekannt	1,1	0,2	0,0077
5208	Z5105	EspB Protein	Typ III	1,1	0,1	0,0185
5209	Z5106	EspD Protein	Typ III	1,3	0,1	0,0060
5210	Z5107	EspA Protein	Typ III	1,0	0,2	0,0378
5211	Z5108	SepL Protein	Typ III	1,0	0,3	0,0116
5212	Z5111	CesT Protein	Typ III	1,3	0,2	0,0057
6075	Z5120	EscV Protein	Typ III	1,6	0,4	0,0090
6076	Z5122	SepZ Protein	Typ III	1,5	0,1	0,0013
3558	Z5252	periplasmatisches Bindepotein, D-Ribose, RbsB	Tr	1,3	0,2	0,0112
3682	Z5435	Formatdehydrogenase-O, FdoH	E	1,2	0,3	0,0443
3813	Z5638	Chorismatlyase, UbiC	AS	1,3	0,3	0,0048
3819	Z5644	hypothetisches Protein	unbekannt	1,3	0,2	0,0135
3896	Z5728	hypothetisches Protein	unbekannt	1,5	0,1	0,0083
6133	Z5754	hypothetisches Toxin Apoptose-assoziiert	n.g.	1,2	0,2	0,0207
3918	Z5756	Lipoprotein (Außenmembran), Blc	M	1,0	0,3	0,0168

3937	Z5778	Delta(2)-Isopentenylpyrophosphat-tRNA-Adenosintransferase	P	1,3	0,1	0,0083
4001	Z5846	Cytochrom b(562), CybC	E	1,3	0,2	0,0056
6021	Z6021	hypothetisches Protein	unbekannt	1,5	0,3	0,0153
4850	Z6073	hypothetisches Protein	unbekannt	1,4	0,2	0,0064
2102	B2223	Transport kurzkettige Fettsäuren, AtoE	FS	1,4	0,2	0,0349

° Oligonukleotidbezeichnung der Firma MWG Biotech AG aus dem „Compact Gene Index“ entnommen.

Die Genbezeichnungen sind der NCBI- Datenbank (Zugangsnummer: AE005174 und NC002655) sowie dem „Compact Gene Index“ entnommen.

+ Die Funktion der Gene ist aus den Eigenschaften der Aminosäuresequenzen abgeleitet und ebenfalls der NCBI Datenbank und dem „Compact Gene Index“ entnommen.

~ Einteilung der Gene auf Grund ihrer Funktion in Biokreisläufe, AS: Aminosäurebiosynthese; T: Transportproteine; n.g.: nicht gruppiert; FS: Fettstoffwechsel; M: Membranproteine; E: Energiestoffwechsel; Typ III: Typ III Sekretionssystem; R: regulatorische Funktionen; Cd: Zellteilung; B: Primärstoffwechsel; Tox: Toxine; Res: Resistenzmechanismen; IS: Insertionselemente; Osmo: Osmoregulation; P: Proteinbiosynthese; ZW: Zellwandsynthese

¹ Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ratio= Experiment/Kontrolle der jeweiligen Arrays.

² p-Werte wurden mit dem T-Test ermittelt.

^A homologe Gene: Z1221, Z1638, Z1660, Z1934, Z2073, Z2111, Z2376, Z2430, Z2806, Z2981, Z3095, Z3297, Z3925, Z4334, Z4503, und Z5880

Replica: Oligonukleotide, die zweimal auf dem O157 Array immobilisiert sind.

D 2.5.7 RT Real-Time PCR zur Quantifizierung von mRNA

Die durch die Auswertung der Arraydaten erhaltenen Expressionsraten wurden mittels Quantifizierung der cDNA durch RT Real-Time PCR Untersuchungen überprüft. Hierfür wurde mRNA von Versuch 1 von den Kontrollen K1 und K1' und von den Versuchen 2 bzw. 3 jeweils K2 und K3 bzw. E2 und E3 in cDNA synthetisiert. Um die Expressionsraten zu ermitteln, wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung angewendet. Dabei wurde die Stärke der Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht-reguliertes Referenzgen („Housekeeping Gen“) bezogen. Die relative Quantifizierung kann optimiert werden, wenn die mit Hilfe des Anstiegs der jeweiligen Standardkurve ermittelten unterschiedlichen Real-Time PCR Effizienzen der untersuchten Gene berücksichtigt werden. Da die Effizienz einer Real-Time PCR nicht immer gleich ist, d.h. die DNA-Menge verdoppelt sich nicht in jeder PCR mit jedem Zyklus, wurde für jedes PCR-System die jeweilige Effizienz bestimmt.

Tabelle D 15: Zurodnung der cDNA der jeweiligen Veruche für die Real-Time PCR

Versuch	synthetisierte cDNA für Real-Time PCR
1	cDNA-K1 und cDNA-K1'
2	cDNA-K2 und cDNA-E2
3	cDNA-K3 und cDNA-E3

K1': Kontrolle (ohne NFLX) jedoch als Experiment behandelt.

Bei dieser Quantifizierungsmethode wird nicht die absolute Menge der Startkopienzahl oder die Konzentration bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, in diesem Falle nicht-reguliertes „Housekeeping Gen“ bezogen. Die relative Expression des Zielgens in den mit NFLX induzierten Kulturen (Experiment-cDNA, Experiment) wurde auf die Kultur ohne Induktion (Kontrolle-cDNA, Kontrolle) des jeweiligen Versuchs bezogen (Tabelle D 15).

Die Berechnung der Expressionsraten ($R_{E/K(Q)}$) erfolgte unter Verwendung des „Effizienz-korrigierten Quantifizierungsmodells“ [Pfaffl, 2004; Pfaffl, 2001].

Die Expressionsrate wurde nach folgender Formel errechnet:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Experiment})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Experiment})}}$$

Aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Experiment (E) und Kontrolle (K) im Zielgen und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Experiment und Kontrolle vom Referenzgen wurde die „Ratio“ ($R_{E/K(Q)}$) ermittelt, die Aufschluss über die relative Expressionsrate von einem Gen im Experiment im Vergleich zur Kontrolle, normalisiert auf ein nicht-reguliertes Gen, angibt.

Auf Grund der Fülle an regulierten Genen war es unmöglich, die Expressionsraten aller Gene mittels Real-Time PCR zu überprüfen. Nach Analyse der Arraydaten zeigte *stxA₂* mit einer $R_{E/K}=157,9$ die stärkste Genaktivität auf. Die *stxB₁*-Untereinheit wurde im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle 40-fach exprimiert. Um diese Ergebnisse interpretieren zu können, erfolgte eine Quantifizierung mittels RT Real-Time PCR von *stxA₂* und *stxB₂*. Ferner wurde kontrolliert, ob *stxA₁* und *stxB₁* wie in den Arraydaten anzeigt, nicht-reguliert vorliegen.

Die SOS-Antwort ist ein Reparaturmechanismus der Zelle, der nach schädigenden Einflüssen auf die DNA der Bakterien einsetzt. Die Expression des *recA*-Gens, welches an der SOS-Antwort beteiligt ist, kann durch UV-Strahlung und Antibiotikum induziert werden. Nach Induktion mit NFLX konnten anhand der analysierten Arraydaten jedoch nur die zwei an der SOS-Antwort der Zelle beteiligten Gene, *z2152* und *dinD* mit einer geringfügig gesteigerten Genaktivität identifiziert werden. Die Expressionskaskade der Gene des SOS-Regulons gliedert sich in 3 Stufen. Nach Induktion der SOS-Antwort beginnt u. a. die Expression der Gene *uvrA/B/D*. In der folgenden 2. Phase erfolgt die Expression von *recA* und *recN* [Kuzminov and Stahl, 1999]. Um die Expression von Genen sowohl der ersten als auch der 2. Phase mittels Real-Time PCR zu bestimmen, wurden die zwei Gene des SOS-Regulons, *recA* und *uvrD*, ausgewählt.

Als Referenzgen wurde das chromosomal kodierte „Housekeeping Gene“ *serC* gewählt. Es wurden ferner die chromosomal kodierte Gene *aroE* und *pgi* hinsichtlich einer möglichen Verwendung als Referenzgene überprüft. Auf Grund der schlechten Quantifizierungsläufe der seriellen Verdünnungen eigneten sich diese Gene jedoch nicht.

D 2.5.7.1 Erstellen der Standardkurven

Um die Menge an Ausgangsmaterial, in diesem Falle an synthetisierter cDNA, zu bestimmen, wurden für die Quantifizierung die sogenannten „Crossing Point“-Werte herangezogen. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten „Threshold Cycle, (Ct)“ (Crossing Point). Der „Crossing Point“ stellt dabei den PCR-Zyklus dar, bei dem das während der Amplifikation entstehende Fluoreszenzsignal deutlich die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Effizienz der durchgeführten PCR wurde durch Erstellen von Standardkurven serieller Verdünnungen der cDNA von EDL933 durch Berechnung der Steigung bestimmt. Hierfür wurde mRNA von einem nicht-induziertem *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933

(Kontrolle) isoliert, diese während einer reversen Transkription in cDNA synthetisiert und serielle Verdünnungen der cDNA mit Real-Time PCR quantifiziert. Für jede Verdünnung wurde eine Kopienzahl definiert. Eine 1:10 Verdünnung entsprach 1000 Kopien, eine 1:100 entsprach 100 Kopien, 1:1000 10 Kopien und eine 1:10000 Verdünnung 1 Kopie. Die definierten Kopienzahlen wurden nach dem Quantifizierungslauf in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt (Standardkurve). Aus der Steigung der für jedes Gen erstellten Standardkurven wurde die Effizienz mit folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$$

Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte mit der „Fit-Point“ Methode („LightCycler operator`s manual, Version 3.0, Mai 1999“). Der Anstieg der Standardkurven wurde durch die LightCycler Software angegeben. Für jedes Gen wurden je zwei Standardkurven angefertigt.

D 2.5.8 Expressionsraten ausgewählter Gene

Für jede Kontrolle und jede Experimentprobe wurden 2800 pg cDNA aus einer 1:100 Verdünnung für die Real-Time PCR eingesetzt. Für jedes Gen wurden für jede Kontrolle (K1-K3) und für jedes Experiment (E1-E3) zwei Quantifizierungsläufe durchgeführt (Abbildung Anhang A 1-Abbildung Anhang A 5). Die erhaltenen Ct-Werte, die Differenz der Ct-Werte von Kontrolle und Experiment, die Effizienzen der PCR-Läufe und die errechneten Effizienzen der Referenz- und Zielgene sind in Tabelle Anhang A 4 und Tabelle Anhang A 5 aufgeführt. Die daraus errechneten Expressionsraten der Zielgene ($R_{E/K(Q)}$) und der Vergleich mit den durch die Mikroarraydaten erhaltenen Genexpressionsraten sind in Tabelle D 16 dargestellt. Die erhöhten Expressionsraten von *stxA₂* und *stxB₂* konnten auch mittels RT Real-Time PCR bestätigt werden, obgleich diese Werte im Vergleich zu den mittels Mikroarrayversuchen erhaltenen Expressionsraten höher sind. Dies kann zum einen durch die effizientere reverse Transkription ohne den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen und zum anderen durch die sensitivere Quantifizierung mittels Real-Time PCR begründet werden. Die durch Real-Time PCR ermittelten Expressionsraten von 7,0 für *stxA₁* und von 6,0 für *stxB₁* zeigen eine gesteigerte Genaktivität an, verglichen mit denen von *stx₂* jedoch nur geringfügig.

Die beiden an der SOS-Antwort beteiligten Gene *recA* und *uvrD* erschienen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls geringfügig hochreguliert. Hingegen zeigten die durch die Mikroarrayexperimente ermittelten Expressionsraten keine gesteigerte Genregulation an.

Tabelle D 16: Expressionsraten ausgewählter Gene ermittelt durch Mikroarrayexperimente und RT Real-Time PCR-Untersuchungen.

Gene	Mikroarraydaten		Real-Time PCR	
	MR _{E/K} (18/19)	MR _{E/K} (42/43/45)	MR _{E/K(Q)} (K1/K1`)	MR _{E/K(Q)} *
<i>serC</i>	1,0	0,7	-	-
<i>stxA₂</i>	0,9	157,9	0,7	413,1
<i>stxB₂</i>	1,0	40,7	0,8	170,3
<i>stxA₁</i>	0,9	1,8	1,0	7,0
<i>stxB₁</i>	1,2	1,4	0,9	6,0
<i>recA</i>	1,0	1,6	1,7	6,7
<i>uvrD</i>	1,2	1,3	1,0	6,0

* E: Mittelwerte der Ratios (R_{E/K(Q)}) von E2/K2 und E3/K3.

D 2.5.8.1 Untersuchungen zur Deletion des *lomW*-Gens in *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933

Die Analyse des Transkriptionsprofils des Phagen BP-933W zeigte, dass außer des *lomW* Gens alle weiteren Gene in der für die Morphogenese verantwortlichen transkriptionellen Phase als hochreguliert identifiziert wurden (Abbildung D 13). Wenngleich das Vorhandensein angrenzender Gene mittels PCR bestätigt werden konnte, wurde durch Real-Time PCR Untersuchung kein Amplifikat mit den für *lomW* spezifischen Primern erhalten. Weitere durchgeführte PCR Analysen mit Primern für die flankierenden Bereiche von *lomW*, lieferten das Ergebnis, dass *lomW* nicht mehr als intakter Bereich in dem hier verwendeten Stamm *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 vorhanden war. Um dies detaillierter zu prüfen, wurde aus *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und *E. coli* C600(933W) Φ 933W Phagen-DNA isoliert und einer Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII* unterzogen. Der Vergleich des Restriktionsmusters des aus *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und C600(933W) isolierten *stx₂*-Phagens (Φ 933W, BP-933W) zeigte Unterschiede im Bandenmuster (Abbildung D 15). Dies deutet darauf hin, dass die Phagen sich hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz unterschieden. Das veränderte Bandenmuster könnte ein Hinweis auf eine mögliche Deletion des Genbereichs *lomW* geben. Resultat dessen wäre, dass keine Transkription von mRNA von *lomW* erfolgte, somit auch keine markierte cDNA synthetisiert und folglich kein Hybridisierungssignal erhalten wurde.

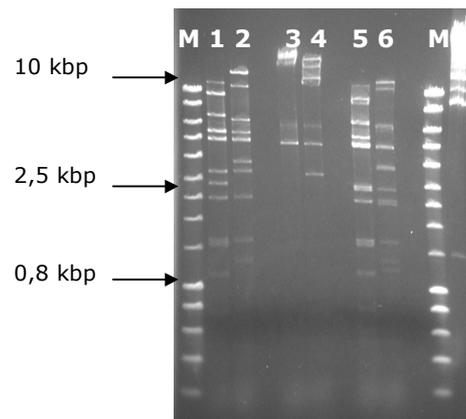
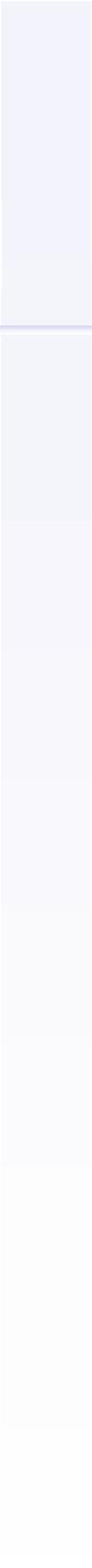


Abbildung D 15: Restriktion der isolierten Stx2-Phagen-DNA (Φ 933W) von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und *E. coli* C600(933W) mit *Hind*III und *Eco*RI. Es wurden je 30 μ l des Restriktionsansatzes aufgetragen. Restriktion der Phagen DNA von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 mit *Eco*RI (1), *Hind*III (3) und *Eco*RI/*Hind*III (5): Restriktion von *E. coli* C600(933W) mit *Eco*RI (2), *Hind*III (4) und *Eco*RI/*Hind*III (6). M: 5 μ l Längenstandard „SmartLadder“.

Diskussion

A decorative vertical bar on the right side of the page, composed of several stacked rectangular segments in a light blue color.

E Diskussion

Der derzeitige Kenntnisstand über die Regulation der Genexpression durch Antibiotika bei pathogenen *Escherichia coli* O157 ist begrenzt und bezieht sich überwiegend auf die Untersuchung zur Expression einzelner Gene, w. z. B. der *stx*-Gene. Die Effekte von Antibiotika auf das Genom des nicht-pathogenen Stammes *E. coli* K12 MG1655 konnten bereits durch Verwendung von *E. coli* K12 Arrays in zwei Studien untersucht werden [Kaldalu *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2003]. Der kommerziell erhältliche *E. coli* O157 Array der Firma MWG offerierte Möglichkeiten einer Transkriptomanalyse von *E. coli* O157.

Die vorliegende Arbeit liefert eine umfassende Analyse über die globalen Mechanismen der Genregulation von *Escherichia coli* O157:H7 nach Induktion mit einer geringen Konzentrationen des Gyrasehemmers Norfloxacin.

Das zu der Wirkstoffgruppe der Gyrasehemmer gehörende Norfloxacin ist ein synthetisches Breitband-Antibiotikum und wird den Fluorochinolonen zugeordnet. Es zeigt eine hohe *in vitro* Aktivität gegen eine Reihe von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und wird u. a. als Therapeutikum für Harnwegsinfektionen eingesetzt [Simon und Stille, 2004]. Fluorochinolone interagieren mit der DNA Gyrase und vermutlich ebenfalls mit der Topoisomerase VI. Die DNA Gyrase kontrolliert das Supercoiling der DNA durch Einbringen von negativen „Supercoils“, wodurch der topologische Stress, der bei der Translokation des Translations- und Replikationskomplexes entlang der DNA entsteht, erleichtert wird. Die Topoisomerase VI löst verkettete Tochterchromosomen im Anschluss an die Replikation [Simon und Stille, 2004; Drlica and Zhao, 1997]. Beide Enzyme sind von essentieller Bedeutung für die Zellteilung und das Zellwachstum. Quinolone, die diese Enzyme inhibieren, wirken somit als bakterizide Substanzen.

Der infolge der Interaktion der Quinolone mit der Gyrase und Topoisomerase VI (Quinolone-Enzym-DNA-Komplex) bedingte Zelltod kann u. a. auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen zurückgeführt werden [Drlica and Zhao, 1997; Zhao *et al.*, 1997]. In Abbildung E 1 sind zwei mögliche intrazelluläre Aktionen von Quinolonen schematisch dargestellt. Der Komplex von Gyrase und DNA wird irreversibel durch Quinolone blockiert, was die Zellteilung und das Zellwachstum inhibiert. Drlica und Zhao [1997] vertreten die Hypothese, dass der Gyrase-Antibiotikum-Komplex von der DNA gelöst wird, wodurch für das Bakterium tödliche Doppelstrang-DNA-Bruchstücke entstehen. Zum anderen wird in dieser Publikation diskutiert, dass Fluoroquinolone in höheren Konzentrationen die Dissoziation der Gyrase in ihre Untereinheiten stimulieren und dadurch DNA-Stränge mit angehängten Gyrase-Untereinheiten entstehen.

Über die Interaktion von Quinolonen mit der Topoisomerase VI ist bisher wenig bekannt, es wird jedoch eine ähnliche Reaktion wie bei der Gyrase vermutet. Quinolone induzieren eine Reihe von Genen des SOS-Regulons, welche Funktionen bei der DNA-Reparatur, Rekombination und Mutagenese innehaben.

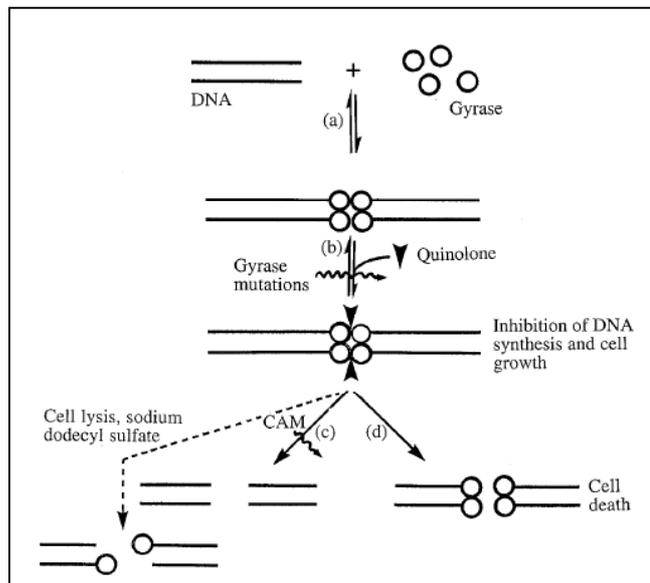


Abbildung E 1: Schematische Darstellung der intrazellulären Aktion von Quinolonen nach Drlica und Zhao [1997] (a): Interaktion und Komplexbildung von DNA-Gyrase mit DNA. (b): Quinolone binden diesen Komplex. Mutationen innerhalb der Gyrase verhindern diese Bindung durch die Quinolone. (c): Durch die Komplexbildung entstehen für das Bakterium tödliche DNA-Doppelstrangbruchstücke. Eine Behandlung der Zellen mit Chloramphenicol (CAM) oder Rifampicin unterbindet diese Reaktion. (d): Fluoroquinolone in hohen Konzentrationen stimulieren die Dissoziation der Gyrase in ihre Untereinheiten, wodurch ebenfalls DNA-Doppelstrangbruchstücke entstehen. Die gepunktete Linie deutet das Freiwerden von versetzten DNA-Doppelstrangbrüchen nach Behandlung der Zellysate mit ionischen Detergentien (SDS) an.

Um die Konzentration an NFLX zu ermitteln, bei der das Bakterienwachstum von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 während der Inkubationszeit am geringsten gehemmt wird und zugleich eine erhöhte Stx-Freisetzung erfolgt, wurden verschiedene Konzentrationen an NFLX getestet. Da die Stx-Produktion mit dem Phagenzyklus gekoppelt ist und u.a. durch chemische Substanzen moduliert werden kann, wurde die Freisetzung von Stx als Marker für einen meßbaren Induktionsreiz gewählt.

An Hand der durchgeführten Wachstumskurven konnte bei den Konzentrationen von 100 und 200 ng/ml bereits nach einer Induktion von 120 min eine erhöhte Stx-Produktion im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle verzeichnet werden. Das Wachstum der Bakterien wurde bei diesen beiden Konzentrationen in den ersten

90 Inkubationsminuten nur geringfügig beeinträchtigt. Eine gesteigerte Stx-Freisetzung bei den mit 500 ng/ml und 1 µg/ml inkubierten Kulturen konnte nach 120 min nicht beobachtet werden, zudem wurde das Wachstum der Bakterien bereits nach 30 min Inkubation deutlich gehemmt. Bereits Matsushiro *et al.* [1999] führten auf, dass NFLX in Konzentrationen von 0,1 bis 10,0 µg/ml sowohl die Freisetzung von Stx1 und Stx2 des *stx*₁- und *stx*₂-positiven *E. coli* O157:H7 Stammes RIMD0509894 induziert als auch eine vermehrte Phagenfreisetzung bedingt und ein Zusammenhang zwischen Norfloxacin-Konzentration und der Stx-Freisetzung besteht. Nach Erreichen eines Maximums an freiem Stx und Phagen nach Induktion mit 1 µg/ml NFLX erfolgte kein weiterer Anstieg der Stx-Produktion. Auch Yoh *et al.* [1999] zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen der Intensität der Stx-Induktion und Norfloxacin-Konzentration besteht. Wurden *E. coli* O157:H7 Stämme mit Konzentrationen unterhalb der MHK, in diesem Falle 1/10-1/20 der MHK inkubiert, erfolgte eine um den Faktor 32 gesteigerte Freisetzung an Stx2 im Vergleich zu nicht-induzierten Stämmen, hingegen führte die Gabe von der 10-fachen MHK an NFLX zu einer verminderten Stx-Freisetzung infolge der Reduktion der KBE/ml [Yoh *et al.*, 1999].

Die MHK von NFLX wurde in der von Yoh *et al.* [1999] durchgeführten Studie für *E. coli* O157:H7 Stämme zu 1 µg/ml bestimmt. Ohara *et al.* [2002] ermittelten im Mittelwert für 208 STEC Isolate verschiedener Serogruppen eine MHK für NFLX von 0,13 µg/ml und Oie *et al.* [2002] bestimmten die MHK von 66 O157 Stämmen zwischen 0,06-0,5 µg/ml mit einem Mittelwert der MHK für NFLX von 0,25 µg/ml. Auch in der Arbeit von Grif *et al.* [1998] wurde gezeigt, dass die drei verschiedenen *E. coli* O157 Stämme 1193/89 (Stx1), 3574/92 (Stx2) und 5769/87 (Stx1, Stx2) unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Antibiotika, u.a. Ciprofloxacin, aufzeigten. Die MHK des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 konnte mit der Makrodilutionsmethode zu 250 ng/ml NFLX und mit dem Etest® zu 125 ng/ml NFLX ermittelt werden. Luber *et al.* [2003] zeigten für die beiden Chinolone, Nalidixinsäure und Ciprofloxacin nach Testung von *Camphylobacter* Isolaten, dass die durch Etest ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen niedriger im Vergleich zu denen durch die Dilutionsmethoden ermittelten sind. Auch Baker *et al.* [1991] ermittelten bei 140 getesteten Gram-negativen Bakterien eine geringere MHK von Ciprofloxacin mit dem Etest im Vergleich zur Mikrodilutionsmethode. Die Divergenz hinsichtlich der publizierten MHK an NFLX für *E. coli* O157 beruht auf der unterschiedlichen Empfindlichkeiten der getesteten Stämme und der Bestimmungsmethoden.

Bezugnehmend auf die Vorversuche erwies sich für die Fragestellung dieser Arbeit die nur geringfügig unterhalb der MHK liegende Konzentration von 200 ng/ml NFLX als geeignet, zum einen induktive Effekte auf die Stx- und Phagenfreisetzung von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 auszuüben und zum anderen dabei das Bakterienwachstum nur geringfügig zu hemmen. Die genauer analysierte Wachstumskinetik von EDL933 nach Induktion (200 ng/ml NFLX, pH=7,0) zeigt, dass sich die optische Dichte der induzierten Kultur im Vergleich zur nicht-induzierten Kultur nach 120 min Inkubation um ca. 0,5 log-Stufen verminderte und dabei gleichzeitig ein exponentieller Anstieg der Freisetzung von Stx und infektiösen Bakteriophagen erfolgte. Die Lebendkeimzahl ermittelt als KBE/ml fiel nach ca. 40 min 1,5 log-Stufen ab und reduzierte sich weiter stetig, jedoch weniger stark.

Durch die Phagenreifung und deren Freisetzung wurden die Bakterienzellen lysiert, was sich in der Reduktion der optischen Dichte im Verlauf der Wachstumskurve widerspiegelt. Ein Maximum an freien, infektiösen Phagenpartikeln ($4,5 \times 10^4$ PBE/ml) wurde nach 130 min Induktion im Experiment ermittelt. Der Rückgang an PBE/ml könnte zum einen durch Instabilität der freien Phagen bzw. durch proteolytischen Abbau begründet werden. Auch besteht die Möglichkeit einer Reinfektion der Phagen in die noch nicht-lysierten Bakterienzellen. Durch die dabei stattfindende Anheftung der Phagen an die Zellen können im Kulturüberstand keine infektiösen Phagen mittels Weichagartest nachgewiesen werden. Da sich die optische Dichte und Lebendkeimzahl reduziert und dies eine verminderte Bakterienzahl in der Kultur anzeigt, können ohnehin weniger freie Phagenpartikel gebildet werden. Die Instabilität sowie der Abbau durch Proteasen und eine grundsätzlich verringerte Phagenproduktion erscheinen die plausibelste Erklärung für den plötzlichen Rückgang an PBE/ml in der induzierten Kultur. Bereits Fuchs *et al.* [1999] beschrieben einen Anstieg nach Induktion mit MitomycinC und UV-Bestrahlung und nach Erreichen eines Maximums einen dramatischen Abfall an infektiösen Phagenpartikeln in der Kultur.

Die nach Induktion von EDL933 mit NFLX erhaltenen Plaque-bildenden Einheiten wurden auf das Vorhandensein von Stx1- und Stx2-kodierenden Phagen überprüft. Nur die Hybridisierung mit der *stx*₂-spezifischen Sonde erbrachte ein positives Hybridisierungssignal. Auf Grund des Ergebnisses kann konstatiert werden, dass nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX nur der Stx2-kodierende Phage BP-933W den lytischen Infektionszyklus einschlägt. Dieses Resultat stimmt mit der von Perna *et al.* [2001] getroffenen Aussage, dass im *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 nur der Phage BP-933W in der Lage ist, infektiöse Phagenpartikel zu bilden und die übrigen Phagen kryptisch bzw. nicht in intakter Form vorliegen, überein.

Ursache der verminderten Lebendkeimzahl nach Induktion von EDL933 mit NFLX und der gleichzeitigen, steten Zunahme der optischen Dichte in den ersten Induktionsminuten kann durch die Filamentierung der induzierten Bakterienzellen begründet werden. Die induzierten Bakterien sind zwar nicht mehr in der Lage sich zu teilen, was durch das Absinken der KBE/ml deutlich wird, es liegt jedoch weiterhin ein Bakterienwachstum vor, was sich in der Zunahme der OD₆₀₀ widerspiegelt. Sowohl die angefertigten Gramfärbepreparate als auch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der induzierten Bakterienzellen zeigen deutlich die Filamentierung der Zellen an. Charakteristisch für Filamentierungen sind das Vorhandensein vieler Genome in nur einem gemeinsamen Zytoplasma bzw. das Unvermögen der Zellen, sich zu teilen [Lorian, 1985]. Vorangehend dokumentierten Lorian [1993, 1985] sowie Voigt und Zeiler [1985] morphologische Veränderungen von Gram-negativen Bakterien nach Antibiotikaeinwirkung. Eine niedrige Konzentration an Ciprofloxacin zeigte laut dieser Studien eine Verlängerung der Bakterienzellen an, höhere Konzentrationen führten zur Beschädigung und Lyse der Zellen [Voigt and Zeiler, 1985].

Nach Auswertung der Microarraydaten wurden die an der Zellteilung beteiligten Gene *ftsQ* und *ftsA* als dereguliert identifiziert. Beide Gene sind essentiell für die Zellteilung und an der Ausbildung der Zellwand beteiligt [Begg *et al.*, 1980]. Resultat der Deregulation dieser Gene ist eine verminderte Zellteilung der induzierten Kulturen, angezeigt durch Reduktion der OD₆₀₀ und KBE/ml.

Um die Auswirkungen von NFLX neben den messbaren Parameter, wie Stx und freien Phagenpartikeln auf das Gesamttranskriptom zu analysieren, wurden nach Induktion von *E. coli* O157:H7 Transkriptomprofile mit Hilfe der Arraytechnologie erstellt. Durch die Optimierung der einzelnen Verfahrensschritte konnte die DNA-Microarraytechnologie unter Verwendung des O157 Arrays (MWG) etabliert und validiert sowie ein Modellsystem für die Genexpressionsanalyse des *E. coli* O157:H7 erstellt werden.

Der *E. coli* O157 Array setzt sich aus 6176 Oligonukleotiden zusammen, welche spezifisch für Gene von *E. coli* K-12 Stamm MG1655, *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 und *E. coli* O157:H7 EDL933 sind. Negativ zu erwähnen ist allerdings, dass auf dem O157 Array keine Oligonukleotide immobilisiert wurden, die plasmidkodierte, virulenzassoziierte (pO157) Gene w. z. B. EHEC-*hly*, *katP*, *espP*, *toxB* und *stcE* repräsentieren und somit auch deren Genaktivität nach Induktion nicht ermittelt werden konnte.

Auf Grund der Vielzahl an immobilisierten Oligonukleotiden und der damit verbundenen großen Hybridisierungsfläche werden für optimale Hybridisierungsergebnisse zwischen 2800 ng und 3200 ng cDNA benötigt [MWG Application Guide]. Um diese Menge an cDNA zu erhalten, bedarf es wiederum einer hohen Konzentration an Ge-

samt-RNA. Mit der in dieser Arbeit etablierten Versuchsanordnung kann die Konzentration an Gesamt-RNA erhalten und aus je 50 µg dieser RNA mittels reverser Transkription die Menge an benötigter cDNA für die Hybridisierungsreaktionen mit dem O157 Array synthetisiert werden. Zudem erlaubt diese experimentelle Durchführung, biologische Wachstumsschwankungen innerhalb der Kulturen mit in die Genexpressionsanalyse einzubeziehen. Der zeitliche Aufwand und die finanziell anfallenden Kosten sind durch die umfangreiche RNA-Isolierung und die reverse Transkription, insbesondere auch durch den Einsatz der fluoreszenzmarkierten Nukleotide (dCTP) enorm. Dennoch konnten nur mit dem hier beschriebenen System die benötigten Mengen an Nukleinsäuren für eine erfolgreiche Transkriptomanalyse erhalten werden.

In erster Linie zeigen die Resultate der Untersuchungen, dass durch 200 ng/ml NFLX eine bedingte komplexe Regulation von Genen, insbesondere von Phagengen erfolgt. Als Resultat der Induktion von EDL933 können von den 118, eine Hochregulation anzeigenden Oligonukleotiden, 85 Oligonukleotide zu Genen von zehn Phagen von EDL933 zugewiesen werden. Der komplexe Aufbau des O157 Arrays erschwert die Auswertung im Hinblick auf die Einordnung der regulierten Phagengene, da Gene vorkommend in EDL933 mit einer Sequenzidentität >92% nicht durch mehrerer Oligonukleotide repräsentiert werden. Die Auswertung der eine Hochregulation anzeigenden Oligonukleotide erfolgt je nach Zugehörigkeit und Sequenzidentität gesondert. Daher resultiert die Einordnung regulierter Gene in die Gruppen „spezifisch“ bzw. „unspezifisch“ reguliert, je nachdem ob ein oder mehrere Gene durch ein Oligonukleotid dargestellt sind. Einige, eine Hochregulation anzeigenden Oligonukleotide repräsentieren Phagengene des *E. coli* O157:H7 Stammes RIMD0509952. Da aber mit dem Stamm EDL933 gearbeitet wurde, wird die Hochregulation dieser Gene durch Kreuzhybridisierung der cDNA des EDL933 mit den für RIMD0509952 spezifischen Oligonukleotiden begründet. Die Ausführungen von Makino *et al.* [1999] über bestehenden Sequenzidentitäten zwischen Genen des Phagen VT2-Sakai von *E. coli* O157:H7 RIMD0509952 und von BP-933W von *E. coli* EDL933 bekräftigen diese Vermutung.

Nach Analyse der Genaktivität kann bemerkt werden, dass die Gene des Stx2-Phagen BP-933W die stärkste Genaktivität unter den gewählten Versuchsbedingungen aufweisen. Insbesondere Gene der späten Region werden stark exprimiert. Im Falle des *stxA*₂ liegt eine 158-fach gesteigerte Expression im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle vor. Gene, die für die Morphogenese kodieren sind 10- bis 99-fach stärker exprimiert. Demgegenüber stehen die geringen Expressionsraten der nicht Stx-kodierenden Phagen und des Stx1-Phagen. Gene des Stx1-Phagen CP-933V zeigen z. B. nur eine geringe Aktivität nach Induktion mit NFLX. Vergleichend zu dem

Transkriptionsprofil von BP-933W, in dem deutlich wird, dass die Gene der späten Region am stärksten reguliert sind, erscheinen im Phagen CP-933V nur einige wenige Gene der frühen Phase als gesteigert exprimiert. Da auch die *stx*₁-Genexpression als nicht gesteigert vorliegt, ist möglicherweise die gewählte Induktionszeit nicht ausreichend, um Effekte auf die Stx1-Produktion auszuüben. Mit Hilfe der Transkriptomanalyse können zwar Aussagen über die Genaktivität nach Einfluss eines Umweltreizes getroffen werden, jedoch nur zu dem Zeitpunkt der mRNA-Isolierung, d.h. es kann immer nur ein Ausschnitt des Transkriptionsablaufes beleuchtet werden. Die Regulation der Gene des Stx1-Phagen CP-933V und der weiteren, im EDL933 vorkommenden Phagen, erfolgt eventuell im späteren Verlauf der Transkription. Vorgehend führten Yoh *et al.* [1999] und Matsushiro *et al.* [1999] auf, dass die Produktion und Freisetzung von Stx1 in der späten Wachstumsphase und die von Stx2 in der frühen Wachstumsphase erfolgt.

Ein weiterer Grund für die geringe Regulation kann aber auch die Tatsache sein, dass CP-933V kryptisch ist und keine infektiösen Phagenpartikel bilden kann, deshalb nicht in dem Maße wie BP-933W durch NFLX induziert und folglich dessen Gene nicht reguliert werden.

Auffallend ist die gesteigerte Expression von einzelnen Genen der nicht-Stx-kodierenden Phagen von EDL933. Hervorzuheben sind dabei die Gene z0961, z1781, z1893, z2120 und z2391 welche für ein Endolysin, Endopeptidase und Schwanzproteine kodieren und Expressionsraten von 8,8-21,8 aufweisen. (Tabelle D 9). Weshalb nur diese einzelnen Gene dieser Phagen reguliert werden, kann mittels der erhaltenen Daten nicht eindeutig beantwortet werden. Christie [2004] zeigte durch Rekombinationsexperimente, dass nach Deletion eines essentiellen Gens für ein Schwanzfaserprotein des BP-933W Phagens dieser in *E. coli* K12 keine infektiöse Phagenpartikel, jedoch in *E. coli* O157:H7 bilden konnte. Der Phage BP-933W erwarb durch homologe Rekombination ein Gen für ein Schwanzfaserprotein von CP-933R und somit auch wieder die Fähigkeit, infektiöse Partikel zu bilden. Wahrscheinlich fungieren diese Phagen als „Helferphagen“ und unterstützen durch eine gesteigerte Genexpression einzelner Gene beispielsweise die Lyse der Bakterienzelle und infolgedessen den Phagen 933W in seinem lytischen Infektionszyklus. Die kryptischen Phagen könnten als Reservoir für Stx-Phagen gelten und an deren genetischen Diversität beteiligt sein [Christie, 2004].

Offenbar reagieren aber auch die verschiedenen Bakteriophagen mit einer unterschiedlichen Sensitivität auf den Induktor NFLX, was in den verschiedenen Transkriptionsmustern zur Geltung kommt. Dies wirft die Frage auf, ob die Transkription der im EDL933 vorkommenden Prophagen durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird

oder unter Umständen Repressoren des BP-933W in die Regulation bzw. Transkription der nicht-Stx-Phagen bzw. des CP-933V eingreifen.

Die vermutlich mit Virulenzeigenschaften assoziierten Gene *stk* und *z1466* des Phagen BP-933W weisen eine gesteigerte Genexpression von 21,9 und 99,1 auf, obgleich sie nicht essentiell für den Phagenaufbau und dessen lytisch-lysogenen Zyklus sind. Tyler und Friedman [2004] konnten demonstrieren, dass *stk* für eine Seronin-Threonin-Kinase kodiert und mit *cI* cotranskribiert wird. Ferner interpretieren die Autoren das Vorkommen von *stk* in konservierten Bereichen in klinischen STEC Isolaten als eine, den Stämmen virulenzvermittelnde Eigenschaft. So zeigen Deletionsmutanten mit fehlendem *stk* einen veränderten lytischen Infektionszyklus auf bzw. werden durch eine veränderte Prophageninduktion charakterisiert.

Die genaue Funktion des 99-fach exprimierten Gens *z1466*, welches eine Sequenzidentität zu *E. coli yjhS* aufweist, ist noch unklar [Perna *et al.*, 2001]. Es erfordert weitere Untersuchungen, um die Funktion dieser, im Genom von BP-933W und weiteren lambdoiden Phagen vorkommenden Gene, aufzuklären.

Die Gene *lomW*, *int*, *bor*, *Q* und einige ORF des Phagen BP-933W zeigen keine gesteigerte Genaktivität, obgleich umliegende Genbereiche hochreguliert erscheinen. Da für die Auswertung der Arraydaten ein striktes Schema angewendet wird, sind einige Gene von der Analyse ausgeschlossen, da entweder der p-Wert oder in einem der Arrays die jeweilige Genexpressionsrate nicht die gesetzten Kriterien erfüllt.

Bei *lomW* zeigen sowohl die Arraydaten als auch die Real-Time PCR Ergebnisse keine Regulation nach Induktion an. Der Bereich für *lomW* konnte auch nach PCR mit spezifischen Primern nicht identifiziert werden. Vergleiche der Restriktionsmuster der Phagen BP-933W aus *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 und *E. coli* C600(933W) weisen Unterschiede auf, was eine veränderte Nukleinsäuresequenz bzw. Genzusammensetzung anzeigt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *lomW* nicht mehr wie im ursprünglichen *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 vorhanden ist und möglicherweise Umordnungen und Insertionen in diesem Bereich erfolgten. Das Phänom genetischer Umordnungen in Bakterienkonserven während der Lagerung über längere Zeiträume bzw. während des Wachstums beschrieben bereits Naas *et al.* [1994] und Papadopoulos *et al.* [1999]. Nach einer Wachstumsperiode (10000 Generationen) von zwölf *E. coli* Populationen mit gleichem Ursprung untersuchte Papadopoulos *et al.* [1999] die genetischen Umordnung mittels Analyse der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (engl.: Restriction fragment length polymorphisms, RFLP) und anschließender Hybridisierung mit spezifischen Sonden für sieben verschiedene Insertionselemente. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass nach 10000 Generation eine genetische Diversität in jeder Population auftrat.

Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wurde 1982 in Amerika isoliert und länger als 10 Jahre in Deutschland gelagert. In diesem Zeitraum erfolgten möglicherweise ebenfalls genetische Umordnungen und daher konnte *lomW* auf Grund von Deletion mit PCR-Untersuchungen nicht mehr amplifiziert werden.

Die Transkriptionsrichtung von *bor* ist entgegengesetzt zu den umliegenden Genen. Vermutlich wird *bor* nicht mit diesen Genen cotranskribiert und demnach als nicht-reguliertes Gen identifiziert.

Shaw *et al.* [2003] konnten nach Induktion von *E. coli* K12 mit NFLX eine Reihe von Genen mit einer gesteigerten Genaktivität identifizieren, die in der SOS-Antwort der Bakterienzelle involviert sind. Die SOS-Antwort ist ein Reparaturmechanismus der Bakterienzelle und beginnt nach schädigenden Einflüssen auf die DNA. Die Expression von RecA kann durch UV-Strahlung und Antibiotikum induziert werden. Durch diese schädigenden Effekte wird die Replikation der DNA unterbrochen und dies bedingt die Entstehung von ssDNA. An diese bindet RecA und ändert daraufhin seine Konformation. Das so aktivierte RecA kann LexA katalytisch spalten und die Repression der 20 SOS-Gene wird aufgehoben. Der darauf eingeleitete Reparaturmechanismus unterteilt sich in 3 Stufen. Zusätzlich kann eine Spaltung des Phagenrepressors erfolgen. Zu Beginn der SOS-Antwort erfolgt u. a. die Expression von *uvrA/B/D* und *dinI*. Führt dies nicht zu einer Reparatur der DNA werden die Gene *recA* und *recN* und im späteren *sfIA* und *umuC/D* exprimiert. Im Zuge dieser SOS-Antwort erfolgt durch *sfIA* eine Inhibierung des Zellwachstums (Zellteilung), um genügend Zeit für eine exakte Wiederherstellung der DNA zu schaffen. Führen auch die Gene der 3. Stufe nicht zum Erfolg einer DNA-Reparatur, wird der Mechanismus der Zelllyse und Phagenproduktion eingeleitet [Kuzminov, 1999; Yasuda *et al.*, 1998; Roberts and Roberts, 1975].

Durch Ablösen des Gyrase-Antibiotikum-Komplexes von der DNA entstehen für *E. coli* tödliche Doppelstrang-DNA-Bruchstücke [Drlica and Zhao, 1997]. *E. coli* ist nicht in der Lage, Doppelstrangbrüche zu reparieren und überlebt so nur 2-3 Doppelstrangbrüche in seinem Chromosom [Kuzminov, 1999]. An Hand der erstellten Wachstumskurven wird deutlich, dass bereits in den ersten 40 Minuten die KBE/ml sinkt, nach 120 Minuten Induktion die Phagenfreisetzung ansteigt und die optische Dichte abnimmt, was die Lyse der Bakterienzellen anzeigt. Nach Auswertung der Arraydaten können nur die zwei Gene des SOS-Regulons, *z2152* (homolog zu *DinI* von *Serratia marcescens*) und *dinD* mit einer erhöhten Genaktivität von 2,7 und 5,8 identifiziert werden. Shaw *et al.* [2003] fanden nach NFLX-Induktion von *E. coli* MG1655 mit 0,03 µg/ml, 0,06 µg/ml und 0,12 µg/ml vier verstärkt exprimierte SOS-Gene (*recA*, *recN*, *sbmC*, *gyrI*) und nach Induktion mit 2,0 und 8,0 µg/ml insgesamt 22 Gene, die im DNA-Metabolismus involviert und gesteigert exprimiert waren. Bei der höchsten

Konzentration an NFLX konnte die höchste Genaktivität der SOS-Gene verzeichnet werden. In dem Konzentrationsbereich in dem auch in dieser Arbeit induziert wurde, fanden auch Shaw *et al.* [2003] nur 4 regulierte Gene. Ein direkter Vergleich der physiologischen Antwort, welche sich in der Transkription der beiden *E. coli* Stämme K12 und EHEC O157:H7 widerspiegelt, ist nicht möglich, da beide Stämme auf Grund ihrer genetischen Ausstattung mit unterschiedlichen Intensitäten auf den Induktor NFLX reagieren.

Die Tatsache, dass unter den gewählten Bedingungen nur zwei Gene des SOS-Regulons reguliert werden, kann mit unterschiedlichen Ansatzpunkten diskutiert und interpretiert werden. Zum einen kann die Konzentration an NFLX zu gering sein, um eine vollständige SOS-Antwort der Bakterienzelle hervorzurufen, der eine komplexe Regulation der SOS-Gene vorangehen würde. Da aber die KBE/ml bereits in den ersten Minuten sinkt, scheint NFLX in dieser Phase multiple Effekte auf *E. coli* auszuüben, auch im Hinblick auf die festgestellte Filamentierung. In der dritten Phase der SOS-Antwort wird das Wachstum der Zellen durch *sfIA* gestoppt, was eventuell die Abnahme der KBE und Filamentierung erklären könnte [Kuzminov, 1999]. Zu dem Zeitpunkt der RNA-Isolierung (120 min nach Induktion) kann der Anteil an mRNA der SOS-Gene vermutlich bereits wieder vermindert sein, da diese Gene bereits kurz nach Inkubation exprimiert werden. Die Untersuchung der Expression der SOS-Genen sollte demzufolge in den frühen Minuten der Induktion erfolgen. Dem ungeachtet könnte auch denkbar sein, dass keine SOS-Antwort erfolgt, da die durch NFLX verursachten Doppelstrangbrüche in der DNA nicht reparabel sind und sofort den Mechanismus der Phagenproduktion herbeiführen.

Letztmöglich können geringe Konzentrationen von Antibiotika aber auch alternative DNA Reparaturmechanismen erwirken. So vermuten Rozanov *et al.* [1998] einen RecA-unabhängige Induktion von lambdoiden Prophagen in *E. coli* und auch Al Mamun *et al.* [2000] beschreiben mit der UVM-Antwort einen RecA-unabhängigen Weg nach Stresseinwirkungen. Die Quantifizierung der exprimierten mRNA einzelner SOS-Gene (z.B. *recA*) nach verschiedenen Inkubationszeiten könnte aufklären, ob NFLX in geringen Konzentrationen einen RecA-abhängigen oder RecA-unabhängigen Reparaturmechanismus bewirkt.

Nach Anfertigung von Wachstumskurven nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX der *recA*-Mutante EDL933r konnte demonstriert werden, dass die Stx-Freisetzung der induzierten Kultur um den Faktor von ca. 3 im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist. Demgegenüber stehen die Untersuchungen von Fuchs *et al.* [1999] in denen verdeutlicht wird, dass nach Induktion mit 100 ng/ml MitomycinC die *recA*-Mutante von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r deutlich weniger Stx produziert als der *recA* positive Stamm. Die An-

nahme, dass NFLX in der geringen Konzentration möglicherweise einen *recA*-unabhängigen Mechanismus bedingt, wird durch diese Untersuchungen bekräftigt. Dennoch sei an dieser Stelle hervorgehoben, dass der Unterschied der Stx-Produktion von induzierter und nicht-induzierter Kultur wesentlich größer in dem *recA*⁺ *E. coli* O157:H7 EDL933 (100-fach erhöht) als von induzierter und nicht-induzierter Kultur des *recA*⁻ EDL933r (2-3-fach erhöht) ist. Die MHK des *recA*⁻ EDL933r wurde zu 0,065 ng/ml NFLX bestimmt. Die Induktion mit 200 ng/ml entspricht somit der 4-fachen MHK. Diese Tatsache weist darauf hin, dass ein Vergleich nur bedingt möglich ist, da die Induktion von EDL933 mit einer NFLX Konzentration unterhalb der MHK erfolgte.

Vornehmlich zeigen Gene des Energiestoffwechsel eine verminderte Genaktivität. Die Deregulation der Gene *nuoN/I/H/E* und *sucA/B* u.w. lassen vermuten, dass in Folge der Induktion mit NFLX Gene energieliefernder Stoffwechselwege unterbunden werden. Kaldalu *et al.* [2004] fanden nach Induktion eines *E. coli* K12 Derivates (*E. coli* HM21 *dapA6 zde-264::Tn10*) mit Ampicillin und Ofloxacin deregulierte Gene, welche in der oxidativen Phosphorylierung involviert sind. Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen nach Induktion von *E. coli* O157 mit NFLX ebenfalls deregulierte Gene der oxidativen Phosphorylierung (*nuoN/I/H/E*).

Prokaryonten modifizieren ihre Transkription über den Anteil an negativer Supercoiling-DNA in der Zelle [Drlica, 1992]. Gyrasehemmer bedingen ein vermindertes Supercoiling der DNA [Drlica and Zhao, 1997; Zhao *et al.*, 1997]. Vorangehend haben bereits Bebbington und Williams [2001] gezeigt, dass eine Veränderung des negativen Supercoiling der DNA von *E. coli* durch den Wechsel zu anaeroben Wachstumsbedingungen die Deregulation von *cydA* (Cytochrom D Oxidase, Polypeptid-Untereinheit I) verursacht. Ferner konnten die Autoren zeigen, dass ebenso Nalidixinsäure und Novobiocin die Expression von *cydA* reduzieren. Diese Gegebenheit kann auch nach Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Arraydaten beobachtet werden. Sowohl *cydA* als auch *cydB* zeigen eine Deregulation nach Induktion mit NFLX an. Die reduzierte Expression dieser beiden Gene könnte die Veränderung des Supercoiling der DNA anzeigen. Infolge der Gabe von Antibiotika und der dadurch einhergehenden Lockerung der Supercoilstruktur der DNA wurde die Expression des *tdc*-Operons erhöht [Wu and Datta, 1995]. Auch Shaw *et al.* [2003] konnten darlegen, dass *tdc* in den, mit Antibiotikum inkubierten Kulturen stärker exprimiert wurde. Diese Tatsache kann nach Genexpressionsanalyse jedoch nicht beobachtet werden.

Insgesamt können sieben deregulierte Gene des LEE-Locus identifiziert werden, die an der Ausbildung von A/E-Läsionen bei *E. coli* O157 beteiligt sind. Diese Gene kodieren u.a. das Chaperon *cesT* und Esp Effektorproteine (*espB*, *espD*, *espA*), die durch dieses

System sekretiert werden. Die weiteren deregulierten Gene sind *sepZ*, *sepL* und *escV*. Die Befähigung A/E-Läsion zu bilden und somit an den eukaryontischen Zellen des Intestinaltraktes zu kolonisieren, wird u. a. als einer der Hauptvirulenzfaktoren der EHEC angesehen. Die Ausbildung von A/E-Läsionen erhöht die Permeabilität der Darmzellwand wodurch die Aufnahme des Stx aus dem Intestinaltrakt in den Blutkreislauf erleichtert wird. Dies wiederum würde bedeuten, dass infolge der beobachteten Deregulation der LEE-Gene keine A/E-Läsionen ausgebildet werden, das Toxin nicht in den Blutkreislauf gelangt und demzufolge auch keine Krankheit ausgelöst wird.

Die Beobachtungen von Deng *et al.* [2005] zeigten, dass in unterschiedlichen Kulturmedien EHEC und EPEC differentielle Sekretionsprofile ausbilden. EHEC sekretieren während einer Kultivierung in dem Zellkulturmedium DMEM (Dulbeccos` s Modified Eagle Medium) hauptsächlich die Translokatoren EspA, EspD und EspB. Die Sekretion der Effektorproteine Tir und NleA ist unter Verwendung des Minimalmediums M9 am stärksten. Im Rahmen dieser Versuche wurde weder Zellkultur- noch Minimalmedium verwendet. Unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen konnte demzufolge keine Regulation dieser Sekretionsproteine und Effektoren erfolgen, da weder eukaryontische Zellen noch das Medium die Expression der LEE-Gene induziert hat. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, müßten die Kultivierung und Induktion von *E. coli* O157:H7 mit NFLX unter Typ III induzierenden Bedingungen erfolgen.

Die deregulierten Gene *sepL* und *espA/B/D* befinden sich in dem Operon LEE4 und *cesT* in dem Operon LEE5. Mittels der erhaltenen Arraydaten kann keine Deregulation von weiteren in LEE4 und LEE5 befindlichen Genen ermittelt werden und demzufolge auch kein zusammenhängendes Transkriptionsprofil erstellt werden.

Die Regulation der LEE-Gene ist sehr komplex und u. a. von dem im LEE kodierten Regulator Ler (LEE-encoded regulator) [Mellies *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000] und zwei weiteren Regulatoren, GrIA (global regulator of LEE activator) und GrIR (global regulator of LEE repressor) [Deng *et al.*, 2004] abhängig. Elliott *et al.* [2000] verdeutlichten in ihren Untersuchungen, dass Ler essentiell für die Ausbildung der A/E-Läsionen ist und als Regulator sowohl in EPEC als auch in EHEC vermutlich die Expression aller LEE-Operons induziert. Die Expression von Ler wird wiederum durch *per* (plasmid-encoded regulator) aktiviert. Da *per* nicht in EHEC vorkommt, muss die Expression von Ler in EHEC durch einen andere Mechanismen gesteuert werden. So konnten beispielsweise Sperandio *et al.* [1999] zeigen, dass die Expression von Ler auch durch Quorum sensing stimuliert werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen eine Deregulation von LEE4 Genen an, jedoch keine Regulation von Ler. Elliott *et al.* [2000] diskutierten bereits in

ihrer Arbeit, dass vermutlich ein weiterer Faktor (hypothetischer Regulator) die Expression von LEE4 unterdrückt und Ler wiederum diesen Regulator reprimieren kann. Diese Vermutung könnte eine mögliche Erklärung für die Deregulation der Gene des LEE4 von EDL933 sein.

Dahan *et al.* [2004] analysierten die Genexpression eines *E. coli* O157:H7 während der Adhärenz an RBC- (red blood cells) Plasmamembranen und fanden einige nicht-regulierter Gene des LEE, obgleich die LEE-Gene als polycistronische Operons vorliegen (LEE1-4) und somit cotranskribiert werden. Als mögliche Ursache hierfür wurden Abbauprozesse der polycistronischen mRNA diskutiert.

Da nach Analyse der Genaktivität von EDL933 nur einzelne Gene als dereguliert und die Mehrzahl der LEE-Gene als nicht-reguliert identifiziert wurden, können Abbauprozesse der mRNA nicht als Begründung für diese Ergebnisse gelten. Um eindeutige Aussagen über die Regulation der LEE-Gene von EDL933 nach Induktion mit NFLX treffen zu können, müßten die Arraydaten durch RT Real-Time PCR bestätigt werden. Zudem sind weiterführende Studien über die Regulation der spezifischen Expression der LEE-Gene erforderlich, insbesondere nach Induktion mit NFLX und Typ III induzierenden Bedingungen, um die erhaltenen Daten interpretieren und bewerten zu können.

Die mRNA einzelner Gene wurden ferner mit der Real-Time PCR quantifiziert und die Genexpressionsraten mit den durch die Arraytechnologie ermittelten verglichen. Die angewendete effizienz-korrigierte relative Quantifizierung stellt die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar [Pfaffl, 2001]. Vorteile dieser Methode sind zum einen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse durch Normalisierung und zum anderen das unterschiedliche RNA-Isolierungsmethoden, Matrixeffekte und Fehler bei der reversen Transkription gleichermaßen das Zielgen und das „Housekeeping Gen“ betreffen [Pfaffl, 2004; Pfaffl, 2001]. Das in den Mikroarrays als nicht reguliert angezeigte Housekeeping Gen *serC*, lieferte in den Real-Time PCR Quantifizierungen bei den Experimentproben (E2 und E3) höhere Ct-Werte, was für eine geringere Menge an transkribierter mRNA und folglich für einer schwächeren Genexpression von *serC* im Vergleich zu den Kontrollen spricht. Auf Basis der Berechnungsformel wurden die Ratios der Zielgene auf die Ratios der Referenzgene, in diesem Fall auf die Ratio von *serC* bezogen. Der Unterschied der *serC*-Expression von Experiment und Kontrolle beeinflusst nachfolgenden Berechnungen der Quotienten. Die Expressionsraten der Zielgene erscheinen höher, da sich der Nenner „ $E_{\text{Referenzgen}}$ “ auf Grund der schwächeren *serC* Expression der Kontrolle verkleinert. Es wurden deshalb weitere Referenzgene auf ihre Tauglichkeit untersucht, jedoch auch *aroE* und *pgi* wiesen eine Deregulation auf. Auf Grund dieser Tatsache erhöhten sich die durch RT Real-Time PCR bestimmten

$R_{E/K(Q)}$ der Zielgene im Vergleich zu den mit Mikroarrays ermittelten Expressionsraten. Nach Analyse des Expressionsprofils von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wird eine gesteigerte Expression von *stxA₂* und *stxB₂* beobachtet, was auch die Ergebnisse der RT Real-Time PCR bestätigen. Die Expressionsraten der beiden *stx₂*-Untereinheiten zeigen, dass *stxA₂* im Vergleich zur Kontrolle ohne Induktion 157,9-fach hochreguliert und *stxB₂* 40,7-fach hochreguliert ist. Diese Unterschiede in den Expressionsraten zeigen auch die Real-Time PCR Daten an. Shiga Toxine setzen sich aus einer A-Untereinheit und 5 B-Untereinheiten zusammen. Es ist bisher unklar, ob das Verhältnis der A- und B-Untereinheit von 1:5 zueinander auf Transkriptions- oder Translationsebene reguliert wird. Die Array- und Real-Time PCR Ergebnisse zeigen Unterschiede in der transkriptionellen Effizienz von A- und B-Untereinheit auf, jedoch wird die A-Untereinheit um ein 4-faches mehr exprimiert und nicht wie erwartet die B-Untereinheit. Weitere Analysen, w. z. B. Notherblot-Hybridisierung oder Primer-Extension müssen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob wirklich eine unterschiedliche Expressionen der Untereinheiten auftreten oder die mRNA Abbauprozessen unterliegt.

Die Mikroarraytechnologie ermöglicht die Erfassung der Genaktivität des Genoms nach Einfluss bestimmter Umweltfaktoren eines Stammes. In dieser Arbeit konnte eine umfassende Expressionsanalyse des Genoms von EDL933 nach Induktion mit NFLX durchgeführt werden und die experimentellen Rahmenbedingungen für weitere Untersuchungen formuliert werden. Die erhaltenen Ergebnisse und die daraus erstellten Transkriptionsprofile zeigen, dass nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX eine komplexe Regulation von Genen des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 erfolgt. Auf Grund der Menge an erhaltenen Daten kann nicht jedes Gen und dessen Genaktivität beleuchtet und diskutiert werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in erster Linie auf der Untersuchung der gesteigerten Genaktivitäten virulenzassoziierter Gene, insbesondere phagenkodierter Gene. Die Regulation der zahlreichen Stoffwechselfgene wurde nicht detailliert analysiert, sondern nur einzelne deregulierte Gene beleuchtet.

Im Vorfeld wurde die Methodik der DNA-Arraytechnologie unter Verwendung des MWG O157 Arrays erfolgreich etabliert. Die Analyse der Genaktivität mittels Microarraytechnologie sollte dennoch kritisch betrachtet werden. Die gleichzeitige Quantifizierung tausender mRNA Transkripte ermöglicht in kurzer Zeit Aufschluss über die spezifische Genexpression eines Genoms zu erhalten. Dennoch muss zusätzlich eine Bestätigung der Expressionsraten mit anderen Methoden erfolgen, insbesondere wenn einzelne Gene als nicht-reguliert identifiziert wurden, obgleich angrenzende Gene verstärkt reguliert wurden.

In dem erstellten Transkriptionsprofil des Phagen BP-933W sind einige Gene als nicht-reguliert identifiziert wurden. Es stellt sich daher die Frage, ob die mRNA Abbauprozessen unterlag oder aber auch die Hybridisierung mit den auf dem O157 Array befindlichen Oligonukleotiden nicht effizient genug und spezifisch war. Die erhaltenen Ergebnisse der hybridisierten Arrays sollten ferner nur dann interpretiert werden, wenn eine gleichmäßige Hybridisierung über den gesamten Spottingbereich erfolgte. Die Genexpression ausgewählter Gene muss in jedem Fall detailliert mit Northern Blot-Hybridisierung oder RT Real-Time PCR bestätigt und validiert werden.

Die hybridisierten O157 Arrays wurden im Rahmen dieser Arbeit nach strikten Kriterien analysiert, um valide und reproduzierbare Daten zu erhalten. Erschwerend für die Analyse der erhaltenen Daten von *E. coli* O157:H7 EDL933 ist die Gegebenheit, dass eine Reihe von Genen von EDL933 untereinander eine hohe Sequenzidentität aufweisen und deshalb nicht durch einzelne Oligonukleotide repräsentiert werden können. Eine genaue Zuordnung der Fluoreszenzintensität eines Oligonukleotides zu einem bestimmten Gen konnte daher nicht erfolgen. Für eine ausführliche Betrachtung wäre erforderlich, die Expressionsraten aller fraglichen Gene mittels RT Real-Time PCR zu bestätigen. Für die Erstellung eines Transkriptionsprofils des Phagen BP-933W besteht zudem die Möglichkeit, die Induktionsexperimente mit dem *E. coli* Stamm C600(933W) durchzuführen, da dieser Stamm nur den BP-933W trägt und daher keine weiteren Phagengene in dessen Genom vorliegen. Oligonukleotide, die in dem beschriebenen Versuch nicht eindeutig dem BP-933W zugeordnet werden konnten, könnten dann eindeutig dem W-Phagen zugewiesen werden.

Für weiterführende Genexpressionsanalysen von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wird die Verwendung eines Arrays, auf dem nur der Genpool des EDL933 und zusätzlich die Gene des pO157 Plasmides in Form von Oligonukleotiden immobilisiert sind, empfohlen. Dadurch kann zum einen die Genaktivität der auf dem Plasmid befindlichen Gene untersucht werden und zum anderen wird die Auswertung der Daten erleichtert, da nur die Gene eines Stammes auf dem Array immobilisiert vorliegen und keine Kreuzhybridisierungen erfolgen können. Da sich ferner die Spottingfläche auf Grund der geringeren Anzahl an immobilisierten Oligonukleotiden verkleinert, wird eine geringere Menge an RNA benötigt, was den finanziellen und zeitlichen Aufwand der Experimente minimiert.

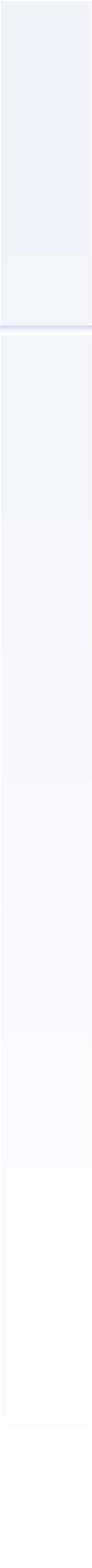
Zur Ergänzung sei noch zu erwähnen, dass der *E. coli* O157 Array nicht mehr durch die MWG Biotech, sondern nun durch die Firma Ocimum Biosolutions [<http://www.ocimumbio.com/web/>] vertrieben wird.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass der O157 Array die Analyse der Genexpression nach einem Induktionsreiz ermöglicht und einen Screening über die Regulation des Genoms angibt. Die erhaltenen Resultate ermöglichen, Kenntnisse über die spezifische Genexpression und über die komplexen Zusammenhänge der Expression von Virulenzfaktoren zu erhalten.

Verschiedene Bedingungen bewirken *in vitro* und *in vivo* differentielle Expressionsmuster. Mit Hilfe der Arraytechnologie kann jedoch immer nur der momentane Ausschnitt zum Zeitpunkt der mRNA Isolierung erfaßt werden.

Um ein zusammenhängendes Verständnis über die Mechanismen der Regulationen, insbesondere von Virulenzfaktoren zu erhalten, bedarf es weiterer Studien nach Einfluss verschiedener Induktionsreize und varrierende Inkubationszeiten.

Literatur

A decorative vertical bar on the right side of the page, composed of several stacked rectangular segments in a light blue-grey color.

F Literaturverzeichnis

Acheson,D.W., Reidl,J., Zhang,X., Keusch,G.T., Mekalanos,J.J., and Waldor,M.K. (1998) In vivo transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. *Infect Immun* **66**: 4496-4498.

Ackers,M.L., Mahon,B.E., Leahy,E., Goode,B., Damrow,T., Hayes,P.S., Bibb,W.F., Rice,D.H., Barrett,T.J., Hutwagner,L., Griffin,P.M., and Slutsker,L. (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J Infect Dis* **177**: 1588-1593.

Adwan,G.M., and Adwan,K.M. (2004) Isolation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine. *Int J Food Microbiol* **97**: 81-84.

Al Mamun,A.A., Yadava,R.S., Ren,L., and Humayun,M.Z. (2000) The *Escherichia coli* UVM response is accompanied by an SOS-independent error-prone DNA replication activity demonstrable *in vitro*. *Mol Microbiol* **38**: 368-380.

Altekruse,S.F., Timbo,B.B., Mowbray,J.C., Bean,N.H., and Potter,M.E. (1998) Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *J Food Prot* **61**: 1405-1407.

Amtliche Sammlung §35 Methode: (2002) Untersuchung von Lebensmitteln. Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Vero Toxin bildender *Escherichia coli* in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik. *Bd I/2, L 07 18-1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes*.

Baker,C.N., Stocker,S.A., Culver,D.H., and Thornsberry,C. (1991) Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* **29**: 533-538.

Bebbington,K.J., and Williams,H.D. (2001) A role for DNA supercoiling in the regulation of the cytochrome bd oxidase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**: 591-598.

Begg,K.J., Hatfull,G.F., and Donachie,W.D. (1980) Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia coli*: cell division gene *ftsQ*. *J Bacteriol* **144**: 435-437.

- Bell,B.P., Griffin,P.M., Lozano,P., Christie,D.L., Kobayashi,J.M., and Tarr,P.I. (1997) Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* **100**: E12.
- Belongia,E.A., Osterholm,M.T., Soler,J.T., Ammend,D.A., Braun,J.E., and MacDonald,K.L. (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA* **269**: 883-888.
- Besser,R.E., Lett,S.M., Weber,J.T., Doyle,M.P., Barrett,T.J., Wells,J.G., and Griffin,P.M. (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* **269**: 2217-2220.
- Beutin,L. (1991) The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* **180**: 167-182.
- Boerlin,P., McEwen,S.A., Boerlin-Petzold,F., Wilson,J.B., Johnson,R.P., and Gyles,C.L. (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**: 497-503.
- Breuer,T., Benkel,D.H., Shapiro,R.L., Hall,W.N., Winnett,M.M., Linn,M.J., Neimann,J., Barrett,T.J., Dietrich,S., Downes,F.P., Toney,D.M., Pearson,J.L., Rolka,H., Slutsker,L., and Griffin,P.M. (2001) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* **7**: 977-982.
- Brewster,D.H., Brown,M.I., Robertson,D., Houghton,G.L., Bimson,J., and Sharp,J.C. (1994) An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* **112**: 441-447.
- Brunder,W., and Karch,H. (2000) Genome plasticity in *Enterobacteriaceae*. *Int J Med Microbiol* **290**: 153-165.
- Brunder,W., Khan,A.S., Hacker,J., and Karch,H. (2001) Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect Immun* **69**: 4447 -57.
- Brunder,W., Schmidt,H., Frosch,M., and Karch,H. (1999) The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* **145**: 1005-1014.
-

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

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

Bryant,P.A., Venter,D., Robins-Browne,R., and Curtis,N. (2004) Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* **4**:100-11.

Burk,C., Dietrich,R., Acar,G., Moravek,M., Bulte,M., and Martlbauer,E. (2003) Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* **41**:2106-12.

Campbell,A. (1994) Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu Rev Microbiol* **48**: 193-222.

Carter,A.O., Borczyk,A.A., Carlson,J.A., Harvey,B., Hockin,J.C., Karmali,M.A., Krishnan,C.; Korn,D.A.; and Lior,H. (1987) A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med* **317**: 1496-1500.

Cavaliere,S.J., Bohach,G.A., and Snyder,I.S. (1984) *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev* **48**:326-343.

Cebula,T.A., Payne,W.L., and Feng,P. (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 248-250.

Chen,H.D., and Frankel,G. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 83-98.

Chizhikov,V., Rasooly,A., Chumakov,K., and Levy,D.D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3258 -63.

Christie,G.E. 2004. Recombination between a Shiga Toxin Encoding Phage and Cryptic Prophages in *E. coli* O157:H7. ASM Conference. The New Phage Biology. Key Biscayne Florida. 1-8-2004. *Conference Proceeding. Poster*.

- Cummings,C.A., and Relman,D.A. (2000) Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis* **6**: 513-25.
- Dahan,S., Knutton,S., Shaw,R.K., Crepin,V.F., Dougan,G., and Frankel,G. (2004) Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect Immun* **72**: 5452-9.
- Deng,W., Li,Y., Hardwidge,P.R., Frey,E.A., Pfuetzner,R.A., Lee,S., Gruenheid,S., Strynacka,N.C., Puente,J.L., and Finlay,B.B. (2005) Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* **73**: 2135-2146.
- Deng,W., Puente,J.L., Gruenheid,S., Li,Y., Vallance,B.A., Vazquez,A., Barba,J., Ibarra,J.A., O'Donnell,P., Metalnikov,P., Ashman,K., Lee,S., Goode,D., Pawson,T., Finlay,B.B. (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3597-602.
- 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**:1831-40.
- Donnenberg,M.S., and Whittam,T.S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**: 539 -48.
- Drlica,K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425-433.
- Drlica,K., and Zhao,X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 377-392.
- Duggan,D.J., Bittner,M., Chen,Y., Meltzer,P., and Trent,J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**: 10-14.
- Dundas,S., Todd,W.T., Stewart,A.I., Murdoch,P.S., Chaudhuri,A.K., and Hutchinson,S.J. (2001) The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* **33**: 923-931.

Elliott,S.J., Sperandio,V., Giron,J.A., Shin,S., Mellies,J.L., Wainwright,L., Hutcheson,S.W., McDaniel,T.K., and Kaper,J.B. (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115-6126.

Elliott,S.J., Wainwright,L.A., McDaniel,T.K., Jarvis,K.G., Deng,Y.K., Lai,L.C., McNamara,B.P., Sonnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.

Endo,Y., Tsurugi,K., Yutsudo,T., Takeda,Y., Ogasawara,T., and Igarashi,K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* **171**: 45-50.

Feldman,K.A., Mohle-Boetani,J.C., Ward,J., Furst,K., Abbott,S.L., Ferrero,D.V., Olsen,A., and Werner,S.B. (2002) A cluster of *Escherichia coli* O157: nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. *Public Health Rep* **117**: 380-385.

Frankel,G., Phillips,A.D., Rosenshine,I., Dougan,G., Kaper,J.B., and Knutton,S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**: 911-921.

Friedrich,A.W., Bielaszewska,M., Zhang,W.L., Pulz,M., Kuczius,T., Ammon,A., and Karch,H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* **185**: 74 -84.

Fruth,A., Richter,H., Timm,M., Streckel,W., Klie,H., Prager,R., Reissbrodt,R. Gallien,P., Skiebe,E., Rienäcker,I., Karch,H., Bockemühl,J., Perlberg,KW., und Tschäpe,H. (2000) Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **43**: 310-317.

Fuchs,S., Mühlendorfer,I., Donohue-Rolfe,A., Kerenyi,M., Emody,L., Alexiev,R., Nenkov,P., and Hacker,J. (1999) Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. *Microb Pathog* **27**: 13-23.

Garcia,A., and Fox,J.G. (2003) The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect* **9**: 1592 -7.

Garmendia,J., Frankel,G., and Crepin,V.F. (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**: 2573-2585.

Grif,K., Dierich,M.P., Karch,H., and Allerberger,F. (1998) Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 761-766.

Grifantini,R., Bartolini,E., Muzzi,A., Draghi,M., Frigimelica,E., Berger,J., Randazzo,F., and Grandi,G. (2002) Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci* **975**: 202-16.

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

Grimm,V., Ezaki,S., Susa,M., Knabbe,C., Schmid,R.D., and Bachmann,T.T. (2004) Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol* **42**: 3766-3774.

Guckenberger,M., Kurz,S., Aepinus,C., Theiss,S., Haller,S., Leimbach,T., Panzner,U., Weber,J., Paul,H., Unkmeir,A., Frosch,M., and Dietrich,G. (2002) Analysis of the heat shock response of *Neisseria meningitidis* with cDNA- and oligonucleotide-based DNA microarrays. *J Bacteriol* **184**: 2546-51.

Gunzer,F., Böhm,H., Rüssmann,H., Bitzan,M., Aleksic,S., and Karch,H. (1992) Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **30**: 1807-1810.

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.

Hall,T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95-98.

Hendrix,R.W., Lawrence,J.G., Hatfull,G.F., and Casjens,S. (2000) The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol* **8**: 504-508.

Heuvelink,A.E., van Heerwaarden,C., Zwartkruis-Nahuis,J.T., van Oosterom,R., Edink,K., van Duynhoven,Y.T., and de Boer,E. (2002) *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol Infect* **129**: 295-302.

Hiruta,N., Murase,T., and Okamura,N. (2001) An outbreak of diarrhoea due to multiple antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 in a nursery. *Epidemiol Infect* **127**: 221-7.

Honda,T. (1999) Factors influencing the development of hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection: from a questionnaire survey to in vitro experiment. *Pediatr Int* **41**: 209-212.

Huynh,T.V., Young,R.A., and Davis,R.W. (1985) In *DNA Cloning: A Practical Approach*. pp. 55-110.

Jacob,F., and Monod,J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**: 318-56.

Jelacic,J.K., Damrow,T., Chen,G.S., Jelacic,S., Bielaszewska,M., Ciol,M., Carvalho,H.M., Melton-Celsa,A.R., O'Brien,A.D., and Tarr,P.I. (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* **188**: 719-29.

Johansen,B.K., Wasteson,Y., Granum,P.E., and Brynestad,S. (2001) Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiology* **147**: 1929-36.

Joos,L., Eryuksel,E., and Brutsche,M.H. (2003) Functional genomics and gene microarrays-the use in research and clinical medicine. *Swiss Med Wkly* **133**: 31-8.

Kaldalu,N., Mei,R., and Lewis,K. (2004) Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 890-6.

Kanamaru,S., Kurazono,H., Ishitoya,S., Terai,A., Habuchi,T., Nakano,M., Ogawa,O., and Yamamoto,S. (2003) Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol* **170**.

Karch H, Bockemühl J, and Huppertz HI (2000) Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Deutsches Ärzteblatt* **97**: 1975-1979.

Karch,H., Bielaszewska,M., Bitzan,M., and Schmidt,H. (1999a) Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**: 229-243.

Karch,H., Rüssmann,H., Schmidt,H., Schwarzkopf,A., and Heesemann,J. (1995) Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol* **33**: 1602-1605.

Karch,H., Schmidt,H., Janetzki-Mittmann,C., Scheef,J., and Kröger,M. (1999b) Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages. *Mol Gen Genet* **262**: 600-607.

Karmali,M.A. (2004) Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol* **26**: 117-22.

Karmali,M.A., Petric,M., Lim,C., Fleming,P.C., Arbus,G.S., and Lior,H. (2004) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985. *J Infect Dis* **189**: 556-63.

Karmali,M.A., Petric,M., Lim,C., Fleming,P.C., and Steele,B.T. (1983a) *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet* **2**: 1299-1300.

Karmali,M.A., Steele,B.T., Petric,M., and Lim,C. (1983b) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **19;1**: 619-620.

Kassenborg,H.D., Hedberg,C.W., Hoekstra,M., Evans,M.C., Chin,A.E., Marcus,R., Vugia,D.J., Smith,K., Ahuja,S.D., Slutsker,L., and Griffin,P.M. (2004) Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. *Clin Infect Dis* **38**: 271-8.

Keene,W.E., McAnulty,J.M., Hoesly,F.C., Williams,L.P., Jr., Hedberg,K., Oxman,G.L., Barrett,T.J., Pfaller,M.A., Fleming,D.W. (1994) A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* **331**: 579-584.

Keene,W.E., Sazie,E., Kok,J., Rice,D.H., Hancock,D.D., Balan,V.K., Zhao,T., Doyle,M.P. (1997) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA* **277**: 1229-1231.

Kenny,B. (2002) Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int J Med Microbiol* **291**: 469-77.

Kimmitt,P.T., Harwood,C.R., and Barer,M.R. (2000) Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* **6**: 458-65.

Knippers,R., Philippsen,P., Schäfer,K.P., and Fanning,E. (1990) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Köhler,B., Karch,H., and Schmidt,H. (2000) Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology* **146**: 1085-90.

Kuzminov,A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 751-813.

Kuzminov,A., and Stahl,F.W. (1999) Double-strand end repair via the RecBC pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes Dev* **13**: 345-356.

Lathem,W.W., Grys,T.E., Witowski,S.E., Torres,A.G., Kaper,J.B., Tarr,P.I., and Welch,R.A. (2002) StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* **45**: 277-88.

Leung,P.H., Peiris,J.S., Ng,W.W., Robins-Browne,R.M., Bettelheim,K.A., and Yam,W.C. (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxinogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7549-53.

Leung,P.H., Yam,W.C., Ng,W.W., and Peiris,J.S. (2001) The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidemiol Infect* **126**: 173-179.

Lipshutz,R.J., Fodor,S.P., Gingeras,T.R., and Lockhart,D.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**: 20-24.

Liptakova,A., Siegfried,L., Rosocha,J., Podracka,L., Bogyiova,E., and Kotulova,D. (2004) A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia. *Clin Microbiol Infect* **10**: 576-8.

Lorian,V. (1985) Low concentrations of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **15 Suppl A**: 15-26.

Lorian,V. (1993) Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **31 Suppl D**: 137-148.

Louise,C.B., and Obrig,T.G. (1995) Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* **172**: 1397-1401.

Luber,P., Bartelt,E., Genschow,E., Wagner,J., and Hahn,H. (2003) Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol* **41**: 1062-8.

Ludwig,K., Ruder,H., Bitzan,M., Zimmermann,S., and Karch,H. (1997) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in a large family. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**: 238-241.

Lyte,M., Arulanandam,B.P., and Frank,C.D. (1996) Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. *J Lab Clin Med* **128**: 392-398.

MacDonald,D.M., Fyfe,M., Paccagnella,A., Trinidad,A., Louie,K., and Patrick,D. (2004) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiol Infect* **132**: 283-9.

Makino,K., Yokoyama,K., Kubota,Y., Yutsudo,C.H., Kimura,S., Kurokawa,K., Ishii,K., Hattori,M., Tatsuno,I., Abe,H., Iida,T., Yamamoto,K., Onishi,M., Hayashi,T., Yasunaga,T., Honda,T., Sasakawa,C., and Shinagawa,H. (1999) Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet Syst* **74**: 227-239.

Makino,S., Kobori,H., Asakura,H., Watarai,M., Shirahata,T., Ikeda,T., Takeshi,K., and Tsukamoto,T. (2000) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol Infect* **125**: 55-61.

Massa,S., Goffredo,E., Altieri,C., and Natola,K. (1999) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees C. *Lett Appl Microbiol* **28**: 89-92.

Matsushiro,A., Sato,K., Miyamoto,H., Yamamura,T., and Honda,T. (1999) Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. *J Bacteriol* **181**: 2257-2260.

McDaniel,T.K., Jarvis,K.G., Donnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1664-1668.

McIntyre,L., Fung,J., Paccagnella,A., Isaac-Renton,J., Rockwell,F., Emerson,B., and Preston,T. (2002) *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can Commun Dis Rep* **28**: 6-8.

Mellies,J.L., Elliott,S.J., Sperandio,V., Donnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.

Melton-Celsa,A.R., Darnell,S.C., and O'Brien,A.D. (1996) Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* **64**: 1569-1576.

Michino,H., Araki,K., Minami,S., Takaya,S., Sakai,N., Miyazaki,M., Ono,A., and Yanagawa,H. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* **150**: 787-796.

Mohle-Boetani,J.C., Farrar,J.A., Werner,S.B., Minassian,D., Bryant,R., Abbott,S., Slutsker,L., and Vugia,D.J. (2001) *Escherichia coli* O157 and Salmonella infections associated with sprouts in California, 1996-1998. *Ann Intern Med* **135**: 239 -47.

Morabito,S., Dell'Omo,G., Agrimi,U., Schmidt,H., Karch,H., Cheasty,T., and Caprioli,A. (2001) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol* **82**: 275-83.

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

Muniesa,M., Blanco,J.E., De Simon,M., Serra-Moreno,R., Blanch,A.R., and Jofre,J. (2004) Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology* **150**: 2959-71.

Mühlhardt,C. (2002) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. Gustav Fischer.

Müller,H., und Röder,T. (2004) *Der Experimentator: Microarrays*. Spektrum Akademischer Verlag. Gustav Fischer.

Naas,T., Blot,M., Fitch,W.M., and Arber,W. (1994) Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **136**: 721-730.

Nataro,J.P., and Kaper,J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.

Neely,M.N., and Friedman,D.I. (1998) Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H- 19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol* **28**: 1255-1267.

Nicholls,L., Grant,T.H., and Robins-Browne,R.M. (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**: 275-88.

Nielsen,E.M., Skov,M.N., Madsen,J.J., Lodal,J., Jespersen,J.B., and Baggesen,D.L. (2004) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6944-7.

O'Brien,A.D., and Holmes,R.K. (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* **51**: 206-220.

O'Brien,A.D., and LaVeck,G.D. (1983) Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* **40**: 675-683.

O'Brien,A.D., LaVeck,G.D., Thompson,M.R., and Formal,S.B. (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**: 763-769.

O'Brien,A.D., Lively,T.A., Chang,T.W., and Gorbach,S.L. (1983a) Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet* **2**: 573.

O'Brien,A.D., Newland,J.W., Miller,S.F., Holmes,R.K., Smith,H.W., and Formal,S.B. (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**: 694-696.

O'Brien,A.O., Lively,T.A., Chen,M.E., Rothman,S.W., and Formal,S.B. (1983b) *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**: 702.

Ohara,T., Kojio,S., Taneike,I., Nakagawa,S., Gondaira,F., Tamura,Y., Gejyo,F., Zhang,H.M., and Yamamoto,T. (2002) Effects of azithromycin on Shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3478-83.

Ohnishi,M., Terajima,J., Kurokawa,K., Nakayama,K., Murata,T., Tamura,K., Ogura,Y., Watanabe,H., and Hayashi,T. (2002) Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 17043-8.

Oie,S., Kawakami,M., Kamiya,A., and Tomita,M. (2002) In vitro susceptibility of four serotypes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to antimicrobial agents. *Biol Pharm Bull* **25**: 671-673.

Orskov,F., Orskov,I., and Villar,J.A. (1987) Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* **2**: 276.

Ostroff,S.M., Tarr,P.I., Neill,M.A., Lewis,J.H., Hargrett-Bean,N., and Kobayashi,J.M. (1989) Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis* **160**: 994-998.

Papadopoulos,D., Schneider,D., Meier-Eiss,J., Arber,W., Lenski,R.E., and Blot,M. (1999) Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3807-3812.

Paton,A.W., Srimanote,P., Woodrow,M.C., and Paton,J.C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**: 6999-7009.

Paton,J.C., and Paton,A.W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**: 450-479.

Perna,N.T., Plunkett,G.,III, Burland,V., Mau,B., Glasner,J.D., Rose,D.J., Mayhew,G.F., Evans,P.S., Gregor,J., Kirkpatrick,H.A., Posfai,G., Hackett,J., Klink,S., Boutin,A., Shao,Y., Miller,L., Grotbeck,E.J., Davis,N.W., Lim,A., Dimalanta,E.T., Potamousis,K.D., Apodaca,J., Anantharaman,T.S., Lin,J., Yen,G., Schwartz,D.C., Welch,R.A., and Blattner,F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529 -33.

Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids* **29**: e45.

Pfaffl,M.W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **10**: 92-95.

Plunkett,G.,III, Rose,D.J., Durfee,T.J., and Blattner,F.R. (1999) Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol* **181**: 1767-1778.

Rangel,J.M., Sparling,P.H., Crowe,C., Griffin,P.M., and Swerdlow,D.L. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* **11**: 603-609.

Reid,S.D., Herbelin,C.J., Bumbaugh,A.C., Selander,R.K., and Whittam,T.S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-7.

Rietra,P.J., Willshaw,G.A., Smith,H.R., Field,A.M., Scotland,S.M., and Rowe,B. (1989) Comparison of Vero-cytotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. *J Gen Microbiol* **135**: 2307-2318.

Riley,L.W., Remis,R.S., Helgerson,S.D., McGee,H.B., Wells,J.G., Davis,B.R., Hebert,R.J., Olcott,E.S., Johnson,L.M., Hargrett,N.T., Blake,P.A., and Cohen,M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685.

Robert Koch Institut (1999) Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Epidemiologisches Bulletin* **31**: 227-230.

Robert Koch Institut (2004) Risikofaktoren für sporadische STEC (EHEC)-Erkrankungen. *Epidemiologisches Bulletin* **50**.

- Roberts,J.W., and Roberts,C.W. (1975) Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 147-151.
- Rozanov,D.V., D'Ari,R., and Sineoky,S.P. (1998) RecA-independent pathways of lambdoid prophage induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 6306-6315.
- Samadpour,M., Ongerth,J.E., Liston,J., Tran,N., Nguyen,D., Whittam,T.S., Wilson,R.A., and Tarr,P.I. (1994) Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1038-1040.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sancak,A.A., Rutgers,H.C., Hart,C.A., and Batt,R.M. (2004) Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *Vet Rec* **154**: 101-6.
- Schena,M., Heller,R.A., Theriault,T.P., Konrad,K., Lachenmeier,E., and Davis,R.W. (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* **16**: 301-306.
- Scheutz,F., Cheasty,T., Woodward,D., and Smith,H.R. (2004) Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS* **112**: 569-84.
- Schmidt,H. (2001) Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* **152**: 687-95.
- Schmidt,H., Beutin,L., and Karch,H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* **63**: 1055-1061.
- Schmidt,H., Bielaszewska,M., and Karch,H. (1999a) Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3855-3861.
- Schmidt,H., Geitz,C., Tarr,P.I., Frosch,M., and Karch,H. (1999b) Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* **179**: 115-123.

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

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

Schmidt,H., Maier,E., Karch,H., and Benz,R. (1996) Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur J Biochem* **241**: 594-601.

Schmidt,H., Montag,M., Bockemühl,J., Heesemann,J., and Karch,H. (1993) Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* **61**: 534-543.

Schmidt,H., Rüssmann,H., Schwarzkopf,A., Aleksic,S., Heesemann,J., and Karch,H. (1994b) Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zentralbl Bakteriol* **281**: 201-213.

Schmidt,H., Scheef,J., Janetzki-Mittmann,C., Datz,M., and Karch,H. (1997) An *ileX* tRNA gene is located close to the Shiga toxin II operon in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* **149**: 39-44.

Schmidt,H., Scheef,J., Morabito,S., Caprioli,A., Wieler,L.H., and Karch,H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1205-8.

Schmitt,C.K., McKee,M.L., and O'Brien,A.D. (1991) Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun* **59**: 1065-1073.

Schulze,A., and Downward,J. (2001) Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* **3**: E190-E195.

Shaikh,N., and Tarr,P.I. (2003) *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J Bacteriol* **185**: 3596-605.

Shaw,K.J., Miller,N., Liu,X., Lerner,D., Wan,J., Bittner,A., and Morrow,B.J. (2003) Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J Mol Microbiol* **5**: 105-22.

Sherman,P., Soni,R., and Karmali,M. (1988) Attaching and effacing adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium *in vivo*. *Infect Immun* **56**: 756-761.

Simon,C., und Stille,W. (2004) *Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*. Schattauer Verlag Stuttgart New York.

Slutsker,L., Ries,A.A., Maloney,K., Wells,J.G., Greene,K.D., and Griffin,P.M. (1998) A nationwide case-control study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States. *J Infect Dis* **177**: 962-966.

Smith,H.W., Green,P., and Parsell,Z. (1983) Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J Gen Microbiol* **129**: 3121-3137.

Snyder,J.A., Haugen,B.J., Buckles,E.L., Lockatell,C.V., Johnson,D.E., Donnenberg,M.S., Welch,R.A., and Mobley,H.L. (2004) Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**: 6373-81.

Southern,E.M. (2001) DNA microarrays. History and overview. *Methods Mol Biol* **170**: 1-15.

Sperandio,V., Mellies,J.L., Nguyen,W., Shin,S., and Kaper,J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15196-15201.

Stevens,M.P., van Diemen,P.M., Frankel,G., Phillips,A.D., and Wallis,T.S. (2002) Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun* **70**: 5158 -66.

Strauch,E., Lurz,R., and Beutin,L. (2001) Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*. *Infect Immun* **69**: 7588-95.

Swerdlow,D.L., Woodruff,B.A., Brady,R.C., Griffin,P.M., Tippen,S., Donnell,H.D., Jr., Geldreich,E., Payne,B.J., Meyer,A., Jr., and Wells,J.G. (1992) A waterborne outbreak in

Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* **117**: 812-819.

Tarr,P.I., Bilge,S.S., Vary,J.C.,Jr., Jelacic,S., Habeeb,R.L., Ward,T.R., Baylor,M.R., and Besser,T.E. (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**: 1400-7.

Tarr,P.I., Gordon,C.A., and Chandler,W.L. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**: 1073-1086.

Tatsuno,I., Horie,M., Abe,H., Miki,T., Makino,K., Shinagawa,H., Taguchi,H., Kamiya,S., Hayashi,T.; and Sasakawa,C. (2001) *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**: 6660-9.

Tatsuno,I., Kimura,H., Okutani,A., Kanamaru,K., Abe,H., Nagai,S., Makino,K., Shinagawa,H., Yoshida,M., Sato,K., Nakamoto,J., Tobe,T., and Sasakawa,C. (2000) Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells. *Infect Immun* **68**: 5943-52.

Te Loo,D.M., van Hinsbergh,V.W., van den Heuvel,L.P., and Monnens,L.A. (2001) Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* **12**: 800-6.

Thorpe,C.M. (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis* **38**: 1298-303.

Tilden,J., Jr., Young,W., McNamara,A.M., Custer,C., Boesel,B., Lambert-Fair,M.A., Majkowski,J., Vugia,D., Werner,S.B., Hollingsworth,J., and Morris,J.G.,Jr. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**: 1142-1145.

Toma,C., Martinez,E.E., Song,T., Miliwebsky,E., Chinen,I., Iyoda,S., Iwanaga,M., and Rivas,M. (2004) Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **42**: 4937-46.

Torres,A.G., Giron,J.A., Perna,N.T., Burland,V., Blattner,F.R., Avelino-Flores,F., and Kaper,J.B. (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 5416-27.

- Torres,A.G., and Kaper,J.B. (2003) Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **71**: 4985-95.
- Trachtman,H., Cnaan,A., Christen,E., Gibbs,K., Zhao,S., Acheson,D.W., Weiss,R., Kaskel,F.J., Spitzer,A., and Hirschman,G.H. (2003) Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA* **290**: 1337-44.
- Tschäpe,H., Prager,R., Streckel,W., Fruth,A., Tietze,E., and Böhme,G. (1995) Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiol Infect* **114**: 441-450.
- Tyler,J.S., and Friedman,D.I. (2004) Characterization of a eukaryotic-like tyrosine protein kinase expressed by the Shiga toxin-encoding bacteriophage 933W. *J Bacteriol* **186**: 3472-9.
- Tzipori,S., Sheoran,A., Akiyoshi,D., Donohue-Rolfe,A., and Trachtman,H. (2004) Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clin Microbiol* **17**: 926-41.
- Unkmeir,A., and Schmidt,H. (2000) Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect Immun* **68**: 4856-64.
- van de Kar,N.C., Monnens,L.A., Karmali,M.A., and van Hinsbergh,V.W. (1992) Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* **80**: 2755-2764.
- van Setten,P.A., Monnens,L.A., Verstraten,R.G., van den Heuvel,L.P., and van Hinsbergh,V.W. (1996) Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood* **88**: 174-183.
- Voigt,W.H., and Zeiler,H.J. (1985) Influence of ciprofloxacin on the ultrastructure of gram-negative and gram-positive bacteria. *Arzneimittelforschung* **35**: 1600-1603.
- Wagner,P.L., Acheson,D.W., and Waldor,M.K. (2001) Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**: 1934-7.
-

- Wagner,P.L., Livny,J., Neely,M.N., Acheson,D.W., Friedman,D.I., and Waldor,M.K. (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 957-70.
- Wagner,P.L., and Waldor,M.K. (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**: 3985-3993.
- Walterspiel,J.N., Ashkenazi,S., Morrow,A.L., and Cleary,T.G. (1992) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection* **20**: 25-29.
- Wang,D., Coscoy,L., Zylberberg,M., Avila,P.C., Boushey,H.A., Ganem,D., and De-Risi,J.L. (2002) Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15687 -92.
- Wang,G., and Doyle,M.P. (1998) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* **61**: 662-667.
- Weinstein,D.L., Jackson,M.P., Samuel,J.E., Holmes,R.K., and O'Brien,A.D. (1988) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol* **170**: 4223-4230.
- Wodicka,L., Dong,H., Mittmann,M., Ho,M.H., and Lockhart,D.J. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **15**: 1359-1367.
- Wong,C.S., Jelacic,S., Habeeb,R.L., Watkins,S.L., and Tarr,P.I. (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* **342**: 1930-1936.
- Wu,Y., and Datta,P. (1995) Influence of DNA topology on expression of the *tdc* operon in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **247**: 764-767.
- Yasuda,T., Morimatsu,K., Horii,T., Nagata,T., and Ohmori,H. (1998) Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI. *EMBO J* **17**: 3207-3216.
- Yoh,M., Frimpong,E.K., Voravuthikunchai,S.P., and Honda,T. (1999) Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol* **45**: 732-739.
-

Yokoyama,K., Makino,K., Kubota,Y., Watanabe,M., Kimura,S., Yutsudo,C.H., Kurokawa,K., Ishii,K., Hattori,M., Tatsuno,I., Abe,H., Yoh,M., Iida,T., Ohnishi,M., Hayashi,T., Yasunaga,T., Honda,T., Sasakawa,C., and Shinagawa,H. (2000) Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* **258**: 127-39.

Zhang,W., Bielaszewska,M., Kuczius,T., and Karch,H. (2002) Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx*(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **40**: 1441-6.

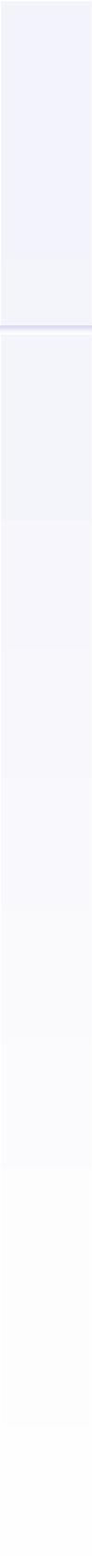
Zhang,X., McDaniel,A.D., Wolf,L.E., Keusch,G.T., Waldor,M.K., and Acheson,D.W. (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* **181**: 664-70.

Zhao,X., Xu,C., Domagala,J., and Drlica,K. (1997) DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13991-13996.

Zhou,D., Han,Y., Song,Y., Tong,Z., Wang,J., Guo,Z., Pei,D., Pang,X., Zhai,J., Li,M., Cui,B., Qi,Z., Jin,L., Dai,R., Du,Z., Bao,J., Zhang,X., Yu,J., Wang,J., Huang,P., and Yang,R. (2004) DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J Bacteriol* **186**: 5138-46.

Zschock,M., Hamann,H.P., Kloppert,B., and Wolter,W. (2000) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol* **31**: 203-8.

Anhang

A decorative vertical bar on the right side of the page, composed of several stacked rectangular segments in a light blue color.

Anhang

Tabelle Anhang A 1: Optischen Dichte (OD₆₀₀) von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 vor und nach Induktion mit 100, 200, 500 und 1000 ng/ml NFLX (Experiment, E) und von der Kontrolle (K) ohne Induktion.

Zeit (min)	OD ₆₀₀ EDL933 _K	OD ₆₀₀ EDL933 _E			
		100 ng/ml NFLX	200 ng/ml NFLX	500 ng/ml NFLX	1 µg/ml NFLX
0	0,058	0,05	0,05	0,072	0,054
30	0,056	0,061	0,059	0,062	0,059
60	0,115	0,122	0,11	0,119	0,119
90	0,329	0,329	0,32	0,329	0,324
120	0,707	0,713	0,65	0,675	0,64
150	1,36	1,3	1,2	0,91	0,82
180	2,2	1,73	1,6	1,1	0,98
210	2,7	1,05	1,3	1,16	1
240	3,4	0,438	0,8	1,17	0,95
270	3,59	0,29	0,59	1,04	0,91
300	3,73	0,258	0,44	1,04	0,91
330	4,07	0,24	0,395	0,955	0,855
450	5,17	0,252	0,369	0,55	0,517

Tabelle Anhang A 2: Optischen Dichte (OD₆₀₀), Kolonie-bildenden Einheiten (KBE/ml), relativen Stx-Freisetzung (AE_{450nm}/ml) und Plaque-bildenden Einheiten (PBE/ml) vor und nach Induktion *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 mit 200 ng/ml NFLX (Experiment, E) und von der Kontrolle (K) ohne Induktion.

Zeit (min)	OD ₆₀₀		OD ₆₀₀ x10 ⁹		KBE/ml		AE ₄₅₀ /ml		AE ₄₅₀ /ml x100		PBE/ml	
	EDL933 _E	EDL933 _K	EDL933 _E	EDL933 _K	EDL933 _E	EDL933 _K	EDL933 _E	EDL933 _K	EDL933 _E	EDL933 _K	EDL933 _E	EDL933 _K
0	0,045	0,047	4,50 x10 ⁷	4,70 x10 ⁷	3,13 x10 ⁷	3,14 x10 ⁷	2,11	2,92	211	292	0	0
30	0,052	0,059	5,20 x10 ⁷	5,90 x10 ⁷	3,61 x10 ⁷	3,89 x10 ⁷	3,08	4,08	308	408	0	0
60	0,086	0,092	8,60 x10 ⁷	9,20 x10 ⁷	4,40 x10 ⁷	3,69 x10 ⁷	3,18	3,15	318	315	0	0
90	0,167	0,169	1,67 x10 ⁸	1,69 x10 ⁸	5,31 x10 ⁷	4,97 x10 ⁷	2,48	2,38	248	238	0	0
120	0,391	0,401	3,91 x10 ⁸	4,01 x10 ⁸	7,32 x10 ⁷	1,47 x10 ⁸	6,43	3,38	643	338	0	0
140	0,710	0,800	7,10 x10 ⁸	8,00 x10 ⁸	6,45 x10 ⁶	3,43 x10 ⁸	5,53	5,45	553	545	0	0
160	1,09	1,34	1,09 x10 ⁹	1,34 x10 ⁹	2,47 x10 ⁶	5,36 x10 ⁸	9,30	2,85	930	285	2780	0
180	1,52	1,88	1,52 x10 ⁹	1,88 x10 ⁹	2,37 x10 ⁶	1,10 x10 ⁹	15,6	13,4	156	1340	n.a. ^o	0
200	1,42	2,28	1,42 x10 ⁹	2,28 x10 ⁹	1,81 x10 ⁶	1,59 x10 ⁹	301,0	17,3	3010	1730	6450	0
220	0,720	2,86	7,20 x10 ⁸	2,86 x10 ⁹	1,30 x10 ⁶	1,78 x10 ⁹	1790,0	16,6	179000	1660	45200	10
250	0,365	3,37	3,65 x10 ⁸	3,37 x10 ⁹	8,53 x10 ⁵	2,09 x10 ⁹	2060,0	20,4	206000	2040	3910	10
280	0,284	3,62	2,84 x10 ⁸	3,62 x10 ⁹	6,02 x10 ⁵	2,29 x10 ⁹	2230,0	32,5	223000	3250	2640	40

^on.a.: nicht auswertbar

Tabelle Anhang A 3: Optischen Dichte (OD₆₀₀) und Stx-Freisetzung (AE_{450nm}/ml) von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933r vor und nach Induktion mit 200 ng/ml NFLX (Experiment, E) und der Kontrolle (K) ohne Induktion.

Zeit (min)	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	AE _{450/ml}	AE _{450/ml}	Zeit (min)	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	AE _{450/ml}	AE _{450/ml}
	EDL933r _K (A)	EDL933r _E (A)	EDL933r _K (A)	EDL933r _E (A)		EDL933r _K (B)	EDL933r _E (B)	EDL933r _K (B)	EDL933r _E (B)
0	0,04	0,038			0	0,056	0,054		
60	0,076	0,068			60	0,077	0,076		
90	0,189	0,185			90	0,178	0,176		
105	0,32	0,313			103	0,283	0,286		
135	0,691	0,647			133	0,82	0,8		
165	1,36	0,98	0,8	1,2	163	1,195	0,875	0,7	2,0
195	1,845	0,79			193	1,72	0,82		
225	2,095	0,62	1,1	4,2	223	2,63	0,71	14,1	22,9
285	2,59	0,47			253	2,92	0,524		
315	3,1	0,54	8,7	19,0	283	3,24	0,484	28,7	79,0
					343	3,6	0,468		
					373	3,6	0,455	35,1	94,2

Tabelle Anhang A 4: Crossing-Point-Werte der quantifizierten cDNA der Kontrollen (cDNA-K1-K3) und cDNA der Experimente (cDNA-E1-E3), Effizienzen der Standardkurven, ΔCt -Werte, die daraus errechnete Effizienz und Mittelwert der Effizienz für die Gene *serC*, *stxA/B₂*, *stxA/B₁*, *recA* und *uvrD*.

Probe	Ct-Wert [#]		Effizienz ⁺ (E)	$\Delta Ct_{(K-E)}$ [*]		$E^{\Delta Ct(K-E)}$ [*]		MW ($E^{\Delta Ct}$) ^o
serC Standardkurve 1								
Lauf	A	B		A	B	A	B	
K1	31,06	31,07	1,58	0,04	1,03	1,028	1,602	1,310
K2	30,61	30,43		-2,96	-3,21	0,258	0,230	0,244
K3	31,42	32,13		-3,52	-2,63	0,200	0,300	0,250
K1`	31,02	30,4						
E2	33,57	33,64						
E3	34,98	34,76						
serC Standardkurve 2								
Lauf	A	B		A	B	A	B	
K1	31,06	31,81	1,52	0,04	1,03	1,017	1,539	1,278
K2	30,61	31,24		-2,96	-3,21	0,290	0,261	0,275
K3	31,42	32,85		-3,52	-2,62	0,229	0,332	0,281
K1`	31,02	30,84						
E2	33,57	34,39						
E3	34,98	35,53						
stxA₂ Standardkurve 1								
	A	B		A	B	A	B	
K1	25,41	22,84	1,84	0,02	-0,27	1,012	0,848	0,930
K2	25,47	22,92		8,48	8,9	176,058	227,446	201,752
K3	25,37	23,99		5,91	6,03	36,734	39,523	38,129
K1`	25,43	23,11						
E2	16,99	14,02						
E3	19,46	17,96						
stxA₂ Standardkurve 2								
	A	B		A	B	A	B	
K1	24,63	23,97	1,78	-0,01	-0,27	0,994	0,856	0,925
K2	24,72	24,09		8,55	9,02	138,386	181,463	159,924
K3	24,61	25,06		5,89	6,03	29,852	32,362	31,107
K1`	24,64	24,24						
E2	16,17	15,07						
E3	18,72	19,03						

ANHANG

Probe	Ct-Wert [#]		Effizienz ⁺ (E)	$\Delta Ct_{(K-E)}$ [*]		$E^{Act(K-E)}$ [*]		MW (E^{Act}) ^o
	A	B		A	B	A	B	
stxB₂ Standardkurve 1								
K1	29,33	26,9	1,75	-0,24	0,48	0,874	1,308	1,091
K2	29,31	27,19		7,8	8,18	78,650	97,286	87,968
K3	29,64	27,2		5,0	3,86	16,413	8,672	12,543
K1`	29,57	26,42						
E2	21,51	19,01						
E3	24,64	23,34						
stxB₂ Standardkurve 2								
K1	29,22	25,66	1,7	-0,24	0,5	0,880	1,300	1,090
K2	29,2	25,89		7,81	8,07	63,068	69,031	66,049
K3	29,54	26,0		5,04	3,81	14,503	7,383	10,943
K1`	29,46	25,16						
E2	21,39	17,82						
E3	24,5	22,19						
stxA₁ Standardkurve 1								
K1	27,4		1,38	0,69		1,249		1,249
K2	27,25			0,44		1,152		1,152
K3	30,61			2,59		2,303		2,303
K1`	26,71							
E2	26,81							
E3	28,02							
stxA₁ Standardkurve 2								
K1	28,8		1,48	0,68		1,306		1,306
K2	27,85			1,31		1,671		1,671
K3	29,7			2,1		2,278		2,278
K1`	28,12							
E2	26,54							
E3	27,6							
stxB₁ Standardkurve 1								
K1	28,88		1,4	0,43		1,156		1,156
K2	28,36			0,33		1,117		1,117
K3	31,59			2,6		2,398		2,398
K1`	28,45							
E2	28,03							
E3	28,99							

Probe	Ct-Wert [#]	Effizienz ⁺ (E)	$\Delta Ct_{(K-E)}$ [*]	$E^{\Delta Ct_{(K-E)}}$ [*]	MW ($E^{\Delta Ct}$) ^o
<i>stxB</i>₁ Standardkurve 2					
K1	30,72	1,55	0,21	1,096	1,096
K2	29,49		1,52	1,947	1,947
K3	31,51		-0,63	0,759	0,759
K1`	30,51				
E2	27,97				
E3	32,14				
<i>recA</i> Standardkurve 1					
K1	21,69	1,47	1,97	2,136	2,136
K2	20,73		2,23	2,361	2,361
K3	20,75		0,07	1,027	1,027
K1`	19,72				
E2	18,5				
E3	20,68				
<i>recA</i> Standardkurve 2					
K1	21,95	1,52	1,66	2,004	2,004
K2	21,22		2,29	2,609	2,609
K3	21,21		-0,1	0,959	0,959
K1`	20,29				
E2	18,93				
E3	21,31				
<i>uvrD</i> Standardkurve 1					
K1	27,08	1,64	0,51	1,287	1,287
K2	26,71		0,15	1,077	1,077
K3	26,19		-1,03	0,601	0,601
K1`	26,57				
E2	26,56				
E3	27,22				
<i>uvrD</i> Standardkurve 2					
K1	-	1,77	-	-	-
K2	29,63		1,99	3,115	3,115
K3	29,15		0,59	1,401	1,401
K1`	28,52				
E2	27,68				
E3	28,60				

[#] Ct-Werte (Crossing Werte) ermittelt durch LightCycler Software

⁺ Effizienz ermittelt durch den Anstieg ($E=10^{-1/\text{Anstieg}}$) der jeweiligen Standardkurven.

^{*} K-E: Differenz von K1-E1; K2-E2; K3-E3

^o Mittelwert der $E^{\Delta Ct}$ (MW $E^{\Delta Ct}$) der Läufe A und B.

Tabelle Anhang A 5: Mittelwert der Effizienzen der einzelnen Quantifizierungsläufe von den jeweiligen Genen und die daraus errechneten relativen Genexpressionraten.

Gen	MW($E^{\Delta Ct}$) ^{o+}			Relative Expression:		
	K1/E1	K2/E2	K3/E3	$R_{E/K(Q)} = E_{Zielgen}^{\Delta Ct} / E_{serC}^{\Delta Ct} \sim$		
<i>serC</i>	1,294	0,260	0,265	-		
<i>stxA₂</i>	0,927	180,838	34,618	0,7	695,6	130,6
<i>stxB₂</i>	1,091	77,009	11,743	0,8	296,2	44,3
<i>stxA₁</i>	1,278	1,412	2,291	1,0	5,4	8,6
<i>stxB₁</i>	1,126	1,532	1,579	0,9	5,9	6,0
<i>recA</i>	2,070	2,485	0,993	1,6	9,6	3,7
<i>uvrD</i>	1,287	2,096	1,001	1,0	8,1	3,8

⁺ Berechneter Mittelwert der Läufe mit Standardkurven (1 und 2) aus MW($E^{\Delta Ct}$) (siehe Tabelle Anhang A 4) des jeweiligen Gens.

~ K-E: K1-E1; K2-E2; K3-E3

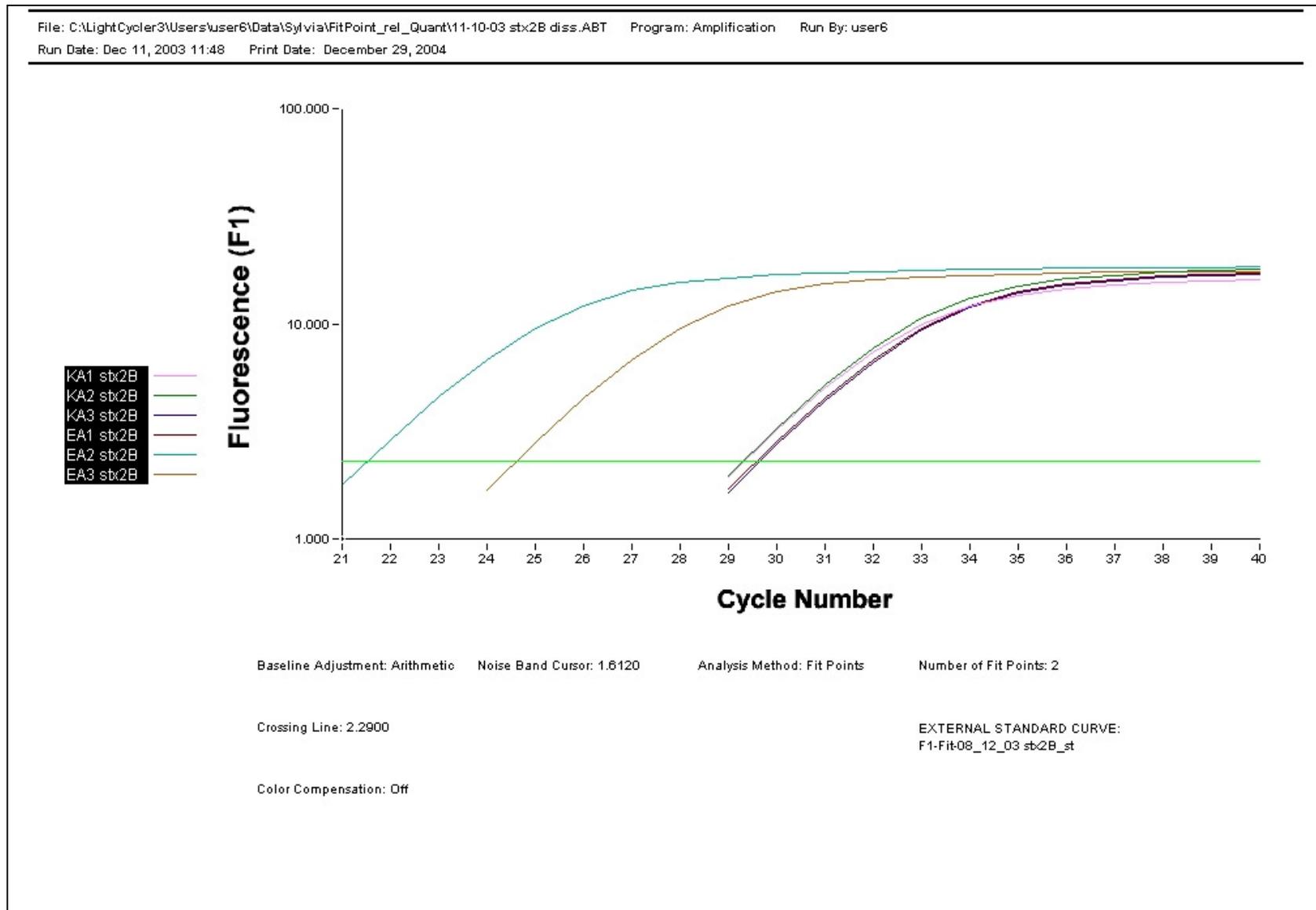


Abbildung Anhang A 1: Quantifizierungslauf der cDNA der Proben K1-K3 und E1-E3 (je 2800 pg) mit den für den *stxB₂* Genbereich spezifischen Primern. X-Achse: Zyklenzahl. Y-Achse: Logarithmus (lg) der Fluoreszenzintensität.

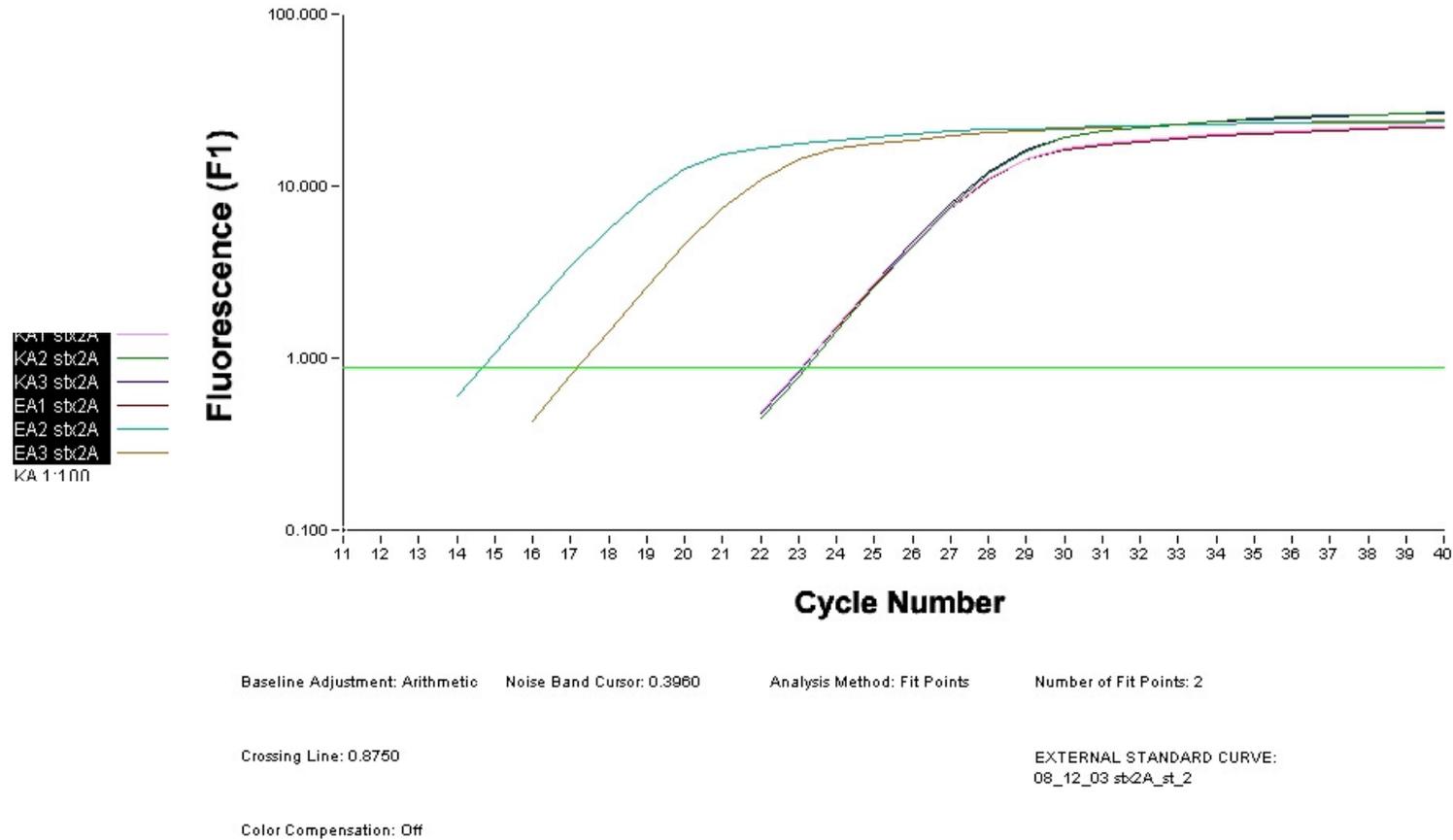


Abbildung Anhang A 2: Quantifizierungslauf der cDNA der Proben K1-K3 und E1-E3 (je 2800 pg) mit den für den *stxA₂* Genbereich spezifischen Primern. X-Achse: Zyklenzahl. Y-Achse: Logarithmus (lg) der Fluoreszenz.

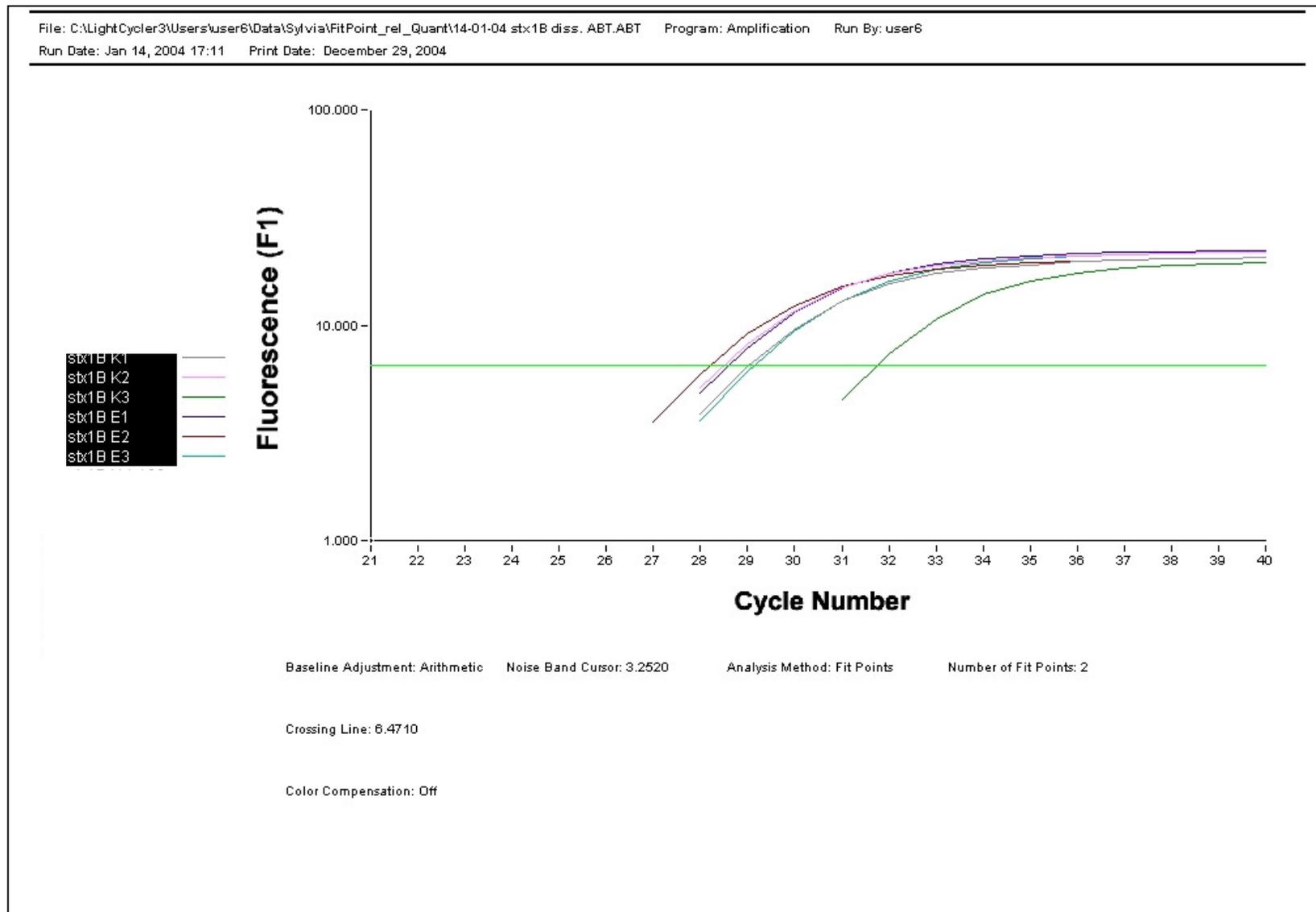


Abbildung Anhang A 3: Quantifizierungslauf der cDNA der Proben K1-K3 und E1-E3 (je 2800 pg) mit den für den *stxB*₁ Genbereich spezifischen Primern. X-Achse: Zyklenzahl. Y-Achse: Logarithmus (lg) der Fluoreszenz.

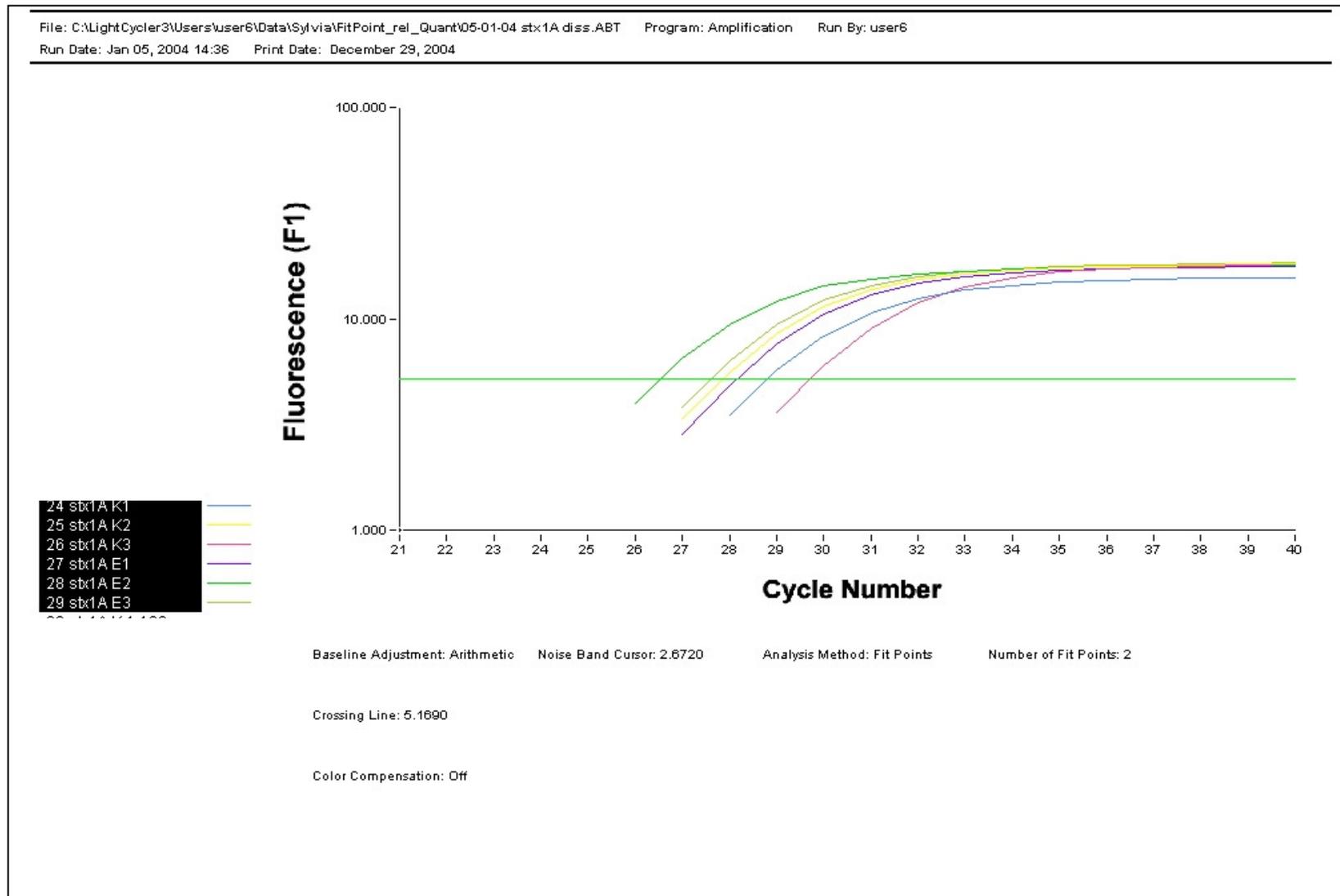


Abbildung Anhang A 4: Quantifizierungslauf der cDNA der Proben K1-K3 und E1-E3 (je 2800 pg) mit den für den *stx*A₁ Genbereich spezifischen Primern. X-Achse: Zyklenzahl. Y-Achse: Logarithmus (lg) der Fluoreszenz.

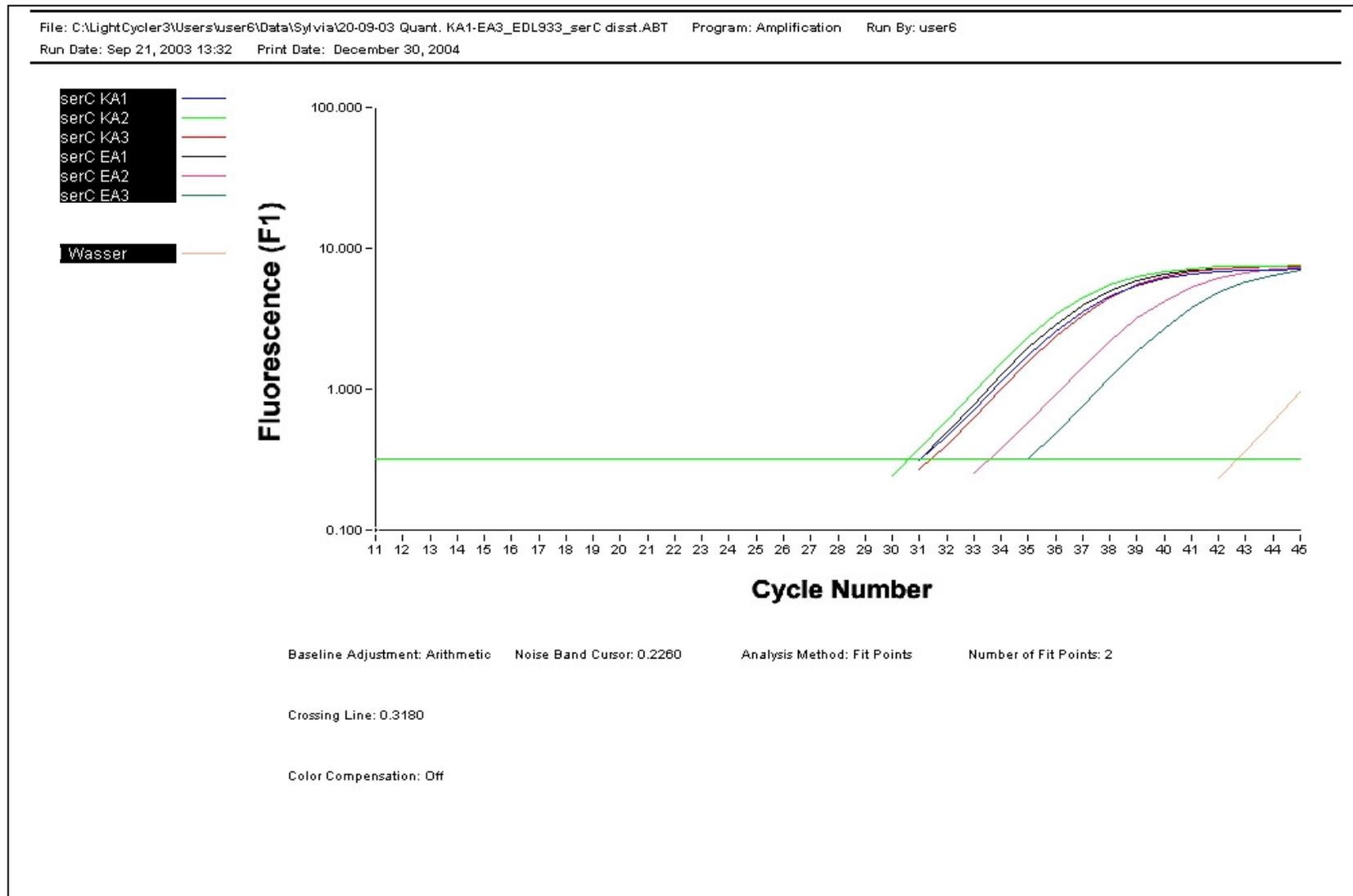


Abbildung Anhang A 5: Quantifizierungslauf der cDNA der Proben K1-K3 und E1-E3 (je 2800 pg) mit den für den *serC* Genbereich spezifischen Primern. X-Achse: Zyklenzahl. Y-Achse: Logarithmus (lg) der Fluoreszenz.

Sonstiges



Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Herold, S., Siebert, J., Huber, A., and Schmidt, H. (2005). Global Expression of Prophage Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL933 in Response to Norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 931-944.

Beutin, L., Kaulfuss, S., Herold, S., Oswald, E., Schmidt H. 2005. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and house keeping genes and pulsed field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol* **43**: 1552-1563

B. Bedenic, H. Schmidt, S. Herold, M. Monaco, V. Plecko, S. Kalenic, S. Katic, J. Skrlin-Subic. (2005). Epidemic and endemic spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase in Dubrava University Hospital, Zagreb. *J Chemother*. In press.

Review:

Herold, S., Karch, H. and Schmidt H. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. Review. *Intern. J. Med. Microbiol.* 294:115-121.

Tagungsbeiträge:

Herold, S., Schmidt, H. (2004). Genaktivität von *E. coli* O157:H7 EDL933 unter Einfluss von Norfloxacin. 6. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und Hygiene. Suhl (Germany)

Herold, S, Schmidt, H. (2004). Norfloxacin steigert die Genaktivität von Stx- und Non-Stx Prophagen bei *E. coli* O157:H7. EHEC Workshop 2004. Wildbad Kreuth (Germany).

Kaulfuss, S., Beutin, L., Herold, S., Oswald, E.; Schmidt, H. (2004). Molecular characterization of *Escherichia coli* O103 strains. Poster presentation. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Münster (Germany).

Herold, S., and Schmidt H. (2004). Norfloxacin increases gene transcription of ten prophages in the genome of *E. coli* O157:H7. Poster presentation. The New Phage Biology. ASM Conference. Key Biscane (USA).

Schmidt, H., Hempel, H., Herold, S., Creuzburg, K., Köhler, B. (2004). Genetic structure and chromosomal integration sites of Shiga toxin encoding phages. Poster presentation. The New Phage Biology. ASM Conference. Key Biscane (USA).

Herold, S., Siebert, J., Huber, A., Schmidt, H. (2003). Transcription profiling of *E. coli* O157:H7. 55. DGHM-Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Dresden (Germany).

Herold, S., Siebert, J., Huber, A., and Schmidt, H. (2003). Transcription profiling of *Escherichia coli* O157:H7. Poster presentation. 5th Symposium on „Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *E. coli* Infections“. Edinburgh (GB)

Kaulfuss, S., Herold, S., Ditzen, A., Schmidt, H., Beutin, L. (2003). Investigation of the relationship between *Escherichia coli* O103 VTEC and EPEC strains by analysis of virulence markers, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and nucleotide sequencing of house-keeping genes (ASTS). Poster presentation. 5th Symposium on „Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *E. coli* Infections“. Edinburgh (GB)

Weitere Veröffentlichungen:

Herold, S. Huber, A., Siebert, J., Schmidt, H. (2003). Expression profiling of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 using the MWG *E. coli* O157 array. Application Note. February 2003, AN033. (www.mwg-biotech.com)

Herold, S., Ditzen, A. (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Kongressbericht. Hygiene und Mikrobiologie (7) Nr. 3 S. 135-137.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sylvia Herold
Anschrift: Mühlgustraße 19
01904 Neukirch
Geburtsdatum, Ort: 02.06.1977 in Bautzen

SCHULBILDUNG

1984–1992 Lessing-Oberschule Neukirch
1992–1996 Städtisches Goethe-Gymnasium Bischofswerda

STUDIUM

1996–2002 Studium der Lebensmittelchemie (Diplom) an der Technischen Universität Dresden
Juli 1998 Abschluss der mündlichen Chemie-Vordiplom-Prüfungen
Juli 2001 Abschluss der mündlichen Lebensmittelchemie-Diplom-Prüfungen
Juli 2001 Anfertigung der Diplomarbeit an der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (LUA) Standort Dresden mit dem Thema „Nachweis und Bestimmung gentechnisch veränderter Organismen in Lebensmitteln“

PROMOTION

seit 15.04.2002 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

...Herrn Prof. Herbert Schmidt für die Bereitstellung des interessanten und innovativen Themas, seiner engagierten Betreuung und der mir stets gewährten Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie der kritischen Durchsicht der Manuskripte.

...Herrn Prof. Thomas Henle für die Betreuung innerhalb des Institutes Lebensmittelchemie der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden.

...Herrn Prof. Enno Jacobs für die Möglichkeit der Bearbeitung und Anfertigung des Promotionsthemas am Institut für Medizinische Hygiene und Mikrobiologie sowie der immer gewährten Unterstützung.

...MWG Biotech AG, insbesondere Andrea Huber und Jutta Siebert für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung während der Etablierung und Auswertung der Arrayversuche.

...allen Angehörigen der Arbeitsgruppe EHEC, insbesondere Frau Stefanie Müksch für die Einweisung in mikrobiologische und molekulargenetische Arbeitstechniken und nicht zu vergessen für die musikalischen Highlights...

...allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für die Unterstützung bei technischen und organisatorischen Fragen sowie für die angenehme, freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung.

...Sandra Wittig für den geduldigen Einsatz bei der Formatierung der Dissertationsschrift....

...Antje Ruppelt für die vielen lustigen Momente im Laboralltag

...meinen lieben Eltern, Bettina und Dieter Herold, für ihre Unterstützung, stetige Hilfe und Motivation.

...und all meinen lieben Freunden ☺

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hiermit erkenne ich Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 20. März 2000 an.

Sylvia Herold

