

**Untersuchungen zur spezifischen Genexpression von
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)
in der Lebensmittelmatrix**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim



Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie

vorgelegt von
Andrea Kroj

aus Arnsberg

2012

Dekan	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person und Prüfer	Prof. Dr. Herbert Schmidt
2. berichtende Person und Prüfer	Prof. Dr. Andreas Kuhn
3. Prüfer	Prof. Dr. Jochen Weiss
Eingereicht am	27. März 2012
Tag der Disputation	15. Juni 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am 24. Mai 2012 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Food-Borne Zoonotic Infections of Humans (FBI-Zoo) Verbundprojekts (01K1 07128), das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wurde. Die Arbeit war Bestandteil des Teilprojekts mit dem Titel „The impact of high risk foods on the emergence, survival and spread of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)“, das unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Schmidt (Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim) stand.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1 Phylogenie der Spezies <i>E. coli</i>	2
1.1.2 Reservoir und Infektion	4
1.1.3 Krankheitsverlauf	5
1.1.4 Therapie.....	6
1.2 Pathogenitätsfaktoren.....	8
1.2.1 Shiga Toxine	9
1.2.2 Plasmid-kodierte Pathogenitätsfaktoren	10
1.2.3 Chromosomale Pathogenitätsfaktoren.....	11
1.3 Bakteriozine.....	13
1.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Stamm EDL933.....	14
1.5 Umweltstress, Stressantwort und Virulenz	15
1.6 Identifizierung von Stress- und Virulenzgenen	18
1.6.1 <i>In vivo</i> -Expressionstechnologie.....	18
1.6.2 Antibiotika-basierte IVET-Systeme	19
1.6.3 IVET- Anwendung im Lebensmittel.....	22
2 Zielsetzung.....	23
3 Material und Methoden	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Enzyme und Desoxyribonukleotidtriphosphate	25
3.1.3 DNA-Größenstandards	25
3.1.4 Oligonukleotide	26
3.1.5 Plasmide	26
3.1.6 Verwendete Bakterienstämme.....	27
3.1.7 Nährmedien und Puffer.....	28
3.1.8 Antibiotika	32
3.2 Kulturtechnische Arbeitsmethoden.....	32
3.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien	32

3.2.2	Induktion der Bakteriozinbildung.....	33
3.3	Molekulargenetische Arbeitsmethoden.....	34
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	34
3.3.2	Isolierung von genomischer DNA.....	34
3.3.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	35
3.3.4	Restriktionsspaltungen von DNA	35
3.3.5	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	36
3.3.6	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	36
3.3.7	Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
3.3.8	Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation durch Elektroporation.....	37
3.3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.3.10	DNA-Sequenzierung	39
3.3.11	Southern Hybridisierung.....	39
3.4	Keimreduziertes Rinderhackfleisch	42
3.4.1	Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl	42
3.4.2	Nachweis von STEC in keimreduziertem Rinderhackfleisch.....	43
3.5	<i>In vivo</i> -Expressionstechnologie (IVET).....	43
3.5.1	Selektion eines Nalidixinsäure-resistenten <i>E.coli</i> -Stammes	43
3.5.2	Konstruktion des Promotor-Selektionsvektors pAK-1	44
3.5.3	Überprüfung der IVET-Systeme basierend auf pKK232-8 und pAK-1....	45
3.5.4	Herstellung einer chromosomalen Genbank des Stammes EDL933	47
3.5.5	Verwendung der IVET-Systeme in Rinderhackfleisch.....	48
3.5.6	DNA-Sequenzanalyse der inserierten EDL933-DNA-Fragmente in den <i>ivi</i> -Plasmiden.....	50
3.6	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen in Rinderhackfleisch.....	51
3.7	Statistische Methoden	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Etablierung einer <i>In vivo</i> -Expressionstechnologie für <i>E. coli</i> in der Matrix Rinderhackfleisch	53
4.1.1	Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pKK232-8 <i>in vitro</i>	53
4.1.2	Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pKK232-8 <i>in vivo</i>	56
4.1.3	Herstellung einer chromosomalen Genbank des Stammes EDL933 in pKK232-8	57

4.1.4	Verwendung des IVET-Systems basierend auf pKK232-8 in Rinderhackfleisch.....	59
4.1.5	DNA-Sequenzanalyse der inserierten Sequenzen in den <i>ivi</i> -Plasmiden basierend auf pKK232-8	62
4.2	Etablierung eines neuen IVET-Systems für <i>E. coli</i> in der Matrix Rinderhackfleisch	70
4.2.1	Konstruktion des Promotor-Selektionsvektors pAK-1	70
4.2.2	Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 <i>in vitro</i>	72
4.2.3	Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 <i>in vivo</i>	73
4.2.4	Herstellung einer chromosomalen Genbank des Stammes EDL933 in pAK-1	75
4.2.5	Verwendung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 in Rinderhackfleisch.....	75
4.2.6	DNA-Sequenzanalyse der inserierten Sequenzen in den <i>ivi</i> -Plasmiden basierend auf pAK-1	79
4.3	Untersuchungen zur Fitness von STEC-Stämmen in Rinderhackfleisch	88
4.3.1	Nachweis von STEC in keimreduziertem Rinderhackfleisch.....	89
4.3.2	Charakterisierung der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	90
4.3.3	Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung der <i>E. coli</i> -Stämme in Rinderhackfleisch.....	94
4.4	Bakteriozinbildung der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	98
5	Diskussion.....	101
5.1	<i>In vivo</i> -Expressionstechnologie	102
5.2	Untersuchungen zur Fitness von STEC Stämmen im Risikolebensmittel Rinderhackfleisch	113
5.3	Bakteriozinbildung der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	118
6	Zusammenfassung.....	120
7	Literaturverzeichnis	123
8	Anhang.....	142

Abkürzungsverzeichnis

A/E-Läsionen	Attaching and Effacing-Läsionen
Amp ^R	Ampicillinresistenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferasegen
Cdt-V	Cytolethal Distending Toxin
Cif	Cycle inhibiting Factor
DAEC	Diffus adhärente <i>Escherichia coli</i>
deion.	deionisiert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gene
EAEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

Abkürzungsverzeichnis

Esp	<i>E. coli</i> secreted protein
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
Exo	Exonuklease
Gb ₃	Globotriaosylceramid
h	Stunde
HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
Iha	IrgA homologous Adhäsion
IVET	<i>In vivo</i> -Expressionstechnologie
<i>ivi</i>	<i>in vivo</i> -induziert
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
M	Mol/l
min	Minute
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
NaAc	Natriumacetat
NaI ^R	Nalidixinsäureresistenz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NleD	Non-LEE-encoded Effector D
OD	Optische Dichte
PAI	Pathogenicity Island

Abkürzungsverzeichnis

PbE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
Sm ^R	Streptomycinresistenz
SSC	Lösung aus Sodium citrate und Sodium chloride
ST	Sequenztyp
Stabw	Standardabweichung
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
SubAB	Subtilase Zytotoxin
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
U	Unit

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolet
V	Volt
VTEC	Vero Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) wurde erstmals 1885 durch den deutschen Kinderarzt Theodor Escherich als stäbchenförmiges und fakultativ anaerobes Bakterium beschrieben, das als kommensales Bakterium zu der natürlichen Mikroflora des menschlichen und tierischen Darmtrakts gehört [Yoon und Hovde, 2008]. Das Bakterium ist mittlerweile ein intensiv untersuchter Modellorganismus und findet ständige Anwendung in der molekularen Biologie, da das Genom 1997 komplett entschlüsselt wurde [Blattner *et al.*, 1997]. Durch Aufnahme von Plasmiden, Transposons, Bakteriophagen und/oder Pathogenitätsinseln haben sich aus harmlosen Stämmen pathogene *E. coli*-Stämme entwickelt. Diese werden anhand ihrer Serogruppe, Pathogenitätsmechanismen, klinischer Symptome oder Virulenzfaktoren unterschieden [Lim *et al.*, 2010]. Die für den Menschen pathogenen Stämme, die intestinale Erkrankungen verursachen können, werden in folgende Pathotypen eingeteilt: enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC) [Yoon und Hovde, 2008]. EHEC wurden erstmals 1982 in den USA als pathogene *E. coli* infolge zweier Ausbrüche von Lebensmittelinfektionen nach dem Verzehr von ungenügend gegartem Fleisch beschrieben. Riley *et al.* [1983] führten diese Ausbrüche, bei denen krampfartige Abdominalschmerzen und wässrige bis blutige Diarrhoe bei den Betroffenen auftraten, auf den Verzehr von Hamburgerfleisch zurück. Der für diese Ausbrüche verantwortliche Serotyp O157:H7 konnte sowohl aus dem Hackfleisch als auch aus den Stuhlproben der Patienten isoliert werden. Seitdem wird dieser Serotyp am häufigsten aus Stuhlproben erkrankter Patienten isoliert, gilt als einer der wichtigsten Erreger von EHEC-Infektionen und ist infolgedessen einer der wichtigsten bakteriellen Lebensmittel-assoziierten Pathogene [Banatvala *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2010]. EHEC bilden eine Untergruppe der Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC), die bei leichten Krankheitsverläufen wässrige bis blutige Diarrhoe verursachen können, jedoch bei schweren Krankheitsverläufen zur hämorrhagischen Colitis (HC) oder zum lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS)

führen können [Karch *et al.*, 2005]. Eine Einteilung der STEC erfolgt aufgrund serotypischer Merkmale. So werden sie anhand ihrer spezifischen Kombination von Lipopolysaccharid (O)- und Flagellen (H)-Oberflächenantigenen verschiedenen Serotypen zugeordnet. Weiterhin gibt das O-Antigen zusätzlich die Serogruppe an [Stenutz *et al.*, 2006]. Insgesamt sind über 200 verschiedene O:H-Serotypen bekannt, die mit der Produktion von Shiga Toxinen (Stx) assoziiert werden. Neben der Serogruppe O157 erlangen u.a. die Serogruppen O26, O103, O111, O113 und O145 als Verursacher von HC, HUS und anderer gastrointestinaler Erkrankungen immer mehr an Bedeutung [Beutin *et al.*, 2004; Käppeli *et al.*, 2011].

1.1.1 Phylogenie der Spezies *E. coli*

E. coli können, wie bereits erwähnt, zum einen der natürlichen Darmflora von Säugetieren und Vögeln angehören, zum anderen jedoch pathogen wirken und Krankheiten bzw. den Tod verursachen. *E. coli*-Stämme sind sowohl phäno- als auch genotypisch stark divers und lassen sich aufgrund ihrer mikrobiologischen und klinischen Merkmale in drei Hauptgruppen einteilen: kommensale *E. coli*, intestinal-pathogene *E. coli* und extraintestinal-pathogene *E. coli* [Russo und Johnson, 2003]. Die Aufklärung der evolutionären Entwicklung dieses Zwiespalts ist Gegenstand verschiedener Untersuchungen, wobei der Zusammenhang zwischen dem Austausch von genetischem Material und der Virulenz als Ursache im Vordergrund steht [Wirth *et al.*, 2006]. Virulenz wird u.a. mit der Gegenwart von Pathogenitätsinseln assoziiert, die durch horizontalen Gentransfer im Laufe der Evolution zwischen den Bakterienpopulationen verbreitet wurden [Hacker und Kaper, 2000]. *E. coli* war das erste Bakterium, das für die Erforschung von Populationen herangezogen wurde. Aus 2600 *E. coli*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft konnte mittels Multilokus-Enzymelektrophorese (MLEE) eine Auswahl von 72 Stämmen getroffen werden, die die *E. coli*-Referenzstammsammlung (ECOR) bilden [Ochman und Selander, 1984]. Diese repräsentiert die genetische Diversität der Spezies und wurde in vier phylogenetische Hauptgruppen (A, B1, B2 und D) eingeteilt. Phylogenetische Bäume, basierend auf den Sequenzen von „housekeeping“-Genen, deuten an, dass sich die Gruppe D früh von den restlichen Gruppen abgezweigt hat und dass die Gruppen A und B1 nah verwandte Gruppen sind, die sich erst spät

separiert haben [Wirth *et al.*, 2006]. Weiterhin erzielten neuere Analysen von kommensalen Stämmen den Hinweis, dass diese in erster Linie den phylogenetischen Gruppen A und B1, und zum Teil der Gruppe D angehören. Stämme, die Virulenzfaktoren enthielten, konnten der Gruppe B2 zugeordnet werden. Diese Daten haben darauf hingedeutet, dass *E. coli*-Stämme der Gruppen A, B1 und D überwiegend die Darmflora bilden und durch Aufnahme von Virulenzfaktoren zu pathogenen Stämmen wurden, die der Gruppe B2 zugeordnet werden können [Duriez *et al.*, 2001]. Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) stellt mittlerweile die am häufigsten genutzte Methode für die Typisierung und Aufklärung phylogenetischer Zusammenhänge von verschiedenen Bakterienspezies dar. Der Sequenzvergleich von „housekeeping“-Genen ermöglicht eine genaue Zuordnung von Isolaten zu bestimmten Sequenztypen (ST) und somit die Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen basierend auf den genetischen Ähnlichkeiten [Maiden, 2006]. So konnte mit Hilfe der MLST neben den vier phylogenetischen Hauptgruppen zwei sogenannte Hybridgruppen (AxB1, ABD) gebildet werden, die sich aufgrund von Polymorphismen von den Hauptgruppen unterscheiden [Wirth *et al.*, 2006]. Weiterhin konnte die Vermutung bestätigt werden, dass EHEC die Virulenzfaktoren zu mehreren Zeitpunkten der Entwicklung erworben haben, da die analysierten Stämme in verschiedenen, voneinander unabhängigen ST auftraten. Eine Aufklärung der phylogenetischen Gruppe, die als Vorfahre für die modernen *E. coli*-Stämme gilt, konnte mit der MLST jedoch nicht erreicht werden [Wirth *et al.*, 2006].

Mit Hilfe der MLST konnte ebenso die Vermutung, dass EHEC aus EPEC entstanden sind, belegt werden. EHEC-Stämme zeigen eine nahe Verwandtschaft zu EPEC-Stämmen, da mehrfach beide Pathotypen einem ST zugeordnet werden konnten [Wirth *et al.*, 2006]. Die Unterscheidung der beiden Typen liegt in der Abwesenheit der Stx in EPEC [Nataro und Kaper, 1998]. Durch die Aufnahme eines Stx-tragenden Bakteriophagen können EPEC- zu EHEC-Stämmen konvertieren [Schmidt *et al.*, 1999]. Gleichzeitig können jedoch ebenso EHEC die Fähigkeit zur Bildung des Stx verlieren [Karch *et al.*, 1992]. So kann ohne Weiteres ein schneller und leichter Wechsel zwischen den beiden Typen erfolgen.

Eine Untersuchung von 202 klinischen Isolaten innerhalb der Serogruppe O157 mit der „multilocus variable number tandem repeat analysis“ (MLVA) konnte zeigen, dass spezifische MLVA-Profile mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert werden

können. Subpopulationen der Serogruppe O157 können mit Hilfe der Methode charakterisiert werden, ebenso können Stämme mit einer evolutionären Beständigkeit bestimmt werden. Eine Einschätzung der Persistenz bestimmter Klone kann somit vorgenommen werden [Jenke *et al.*, 2010]. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt nur begrenzte Daten über den Zusammenhang von evolutionären Verwandtschaftsverhältnissen, die Anwesenheit von Virulenzfaktoren und das vermeintliche Risiko, eine Infektion zu verursachen, zur Verfügung stehen, wurde parallel zu einer MLST durch eine molekulare Analyse von 136 pathogenen *E. coli*-Stämmen eine Abschätzung des Risikopotentials vorgenommen. Die Isolate stammten vom Menschen, von Tieren und aus Lebensmitteln, um einen direkten Vergleich von Isolaten unterschiedlicher Herkunft innerhalb einer Serogruppe anstellen zu können. Es konnte eine hohe genetische Variabilität der Stämme bestätigt werden, jedoch konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit und der Anzahl von bestimmten Virulenzfaktoren und dem Potential einer HUS-Erkrankung nicht nachgewiesen werden. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Effektorgen-positive Stämme generell ein höheres Potential für die Auslösung einer Krankheit besitzen, jedoch konnten Effektorgen-negative Stämme nicht als harmlos eingestuft werden, obwohl diese während einer früheren Studie häufig aus Lebensmitteln isoliert werden konnten [Slanec *et al.*, 2009; Creuzburg *et al.*, 2011].

1.1.2 Reservoir und Infektion

Das Hauptreservoir der STEC bilden landwirtschaftliche Nutztiere, in erster Linie Rinder aber auch Schafe, Schweine, Ziegen und Truthähne sind von Bedeutung. Man geht davon aus, dass STEC in adulten Rindern zur natürlichen Darmflora gehören, da Erkrankungen überwiegend bei jungen Kälbern beschrieben wurden [Busch *et al.*, 2007]. Aufgrund dessen ist die Übertragung auf den Menschen durch kontaminierte Lebensmittel bovinen Ursprungs wie Rindfleisch als Bestandteil von Hamburgern oder Salami, Rohmilch und Rohmilchkäse als besonders hoch einzustufen. Neben Tieren als Reservoir der STEC kann auch eine Übertragung durch frische Lebensmittel wie Wasser, Salat, Spinat und Sprossen stattfinden. Allgemein ist die Kontamination durch Fäkalien der Tiere in den Vordergrund zu stellen. Rohe oder unzureichend gegarte Lebensmittel wie Rinderhackfleisch stellen

einen der wichtigsten Übertragungswege der Pathogene auf den Menschen dar. Weitere Möglichkeiten der Übertragung stellen der Kontakt mit kontaminierten Tieren und die Weitergabe von Person zu Person über Schmierinfektionen dar [Stephan *et al.*, 2008; Madic *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010]. Die geringe Infektionsdosis von 10 bis 100 Keimen und die Säuretoleranz der STEC sind hier besonders hervorzuheben. In *E. coli* O157:H7 wurden drei Säureresistenz-Systeme beschrieben, die mit einer verringerten Infektionsdosis in Verbindung gebracht werden und somit die hohe Infektiosität der Bakterien durch Überleben des niedrigen pH-Wertes im menschlichen Magen bedingen [Nataro und Kaper, 1998; Busch *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2010].

1.1.3 Krankheitsverlauf

Die Verläufe der Krankheit können von asymptomatisch bis hin zum Tod der Patienten variieren. Der symptomatische Verlauf beginnt meist nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen mit wässrigen Durchfällen und krampfartigen, abdominalen Schmerzen, die bei manchen Patienten von Erbrechen und einem kurzen Fieberschub begleitet werden. Bei schweren Verläufen kann sich anschließend eine hämorrhagische Colitis entwickeln, einhergehend mit blutigem Stuhl und starken abdominalen Schmerzen. Die meisten Patienten überstehen die HC ohne Folgeerkrankungen, etwa 10% der Patienten entwickeln jedoch das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen gekennzeichnet ist. Bei den an HUS erkrankten Patienten handelt es sich vor allem um kleine Kinder unter 10 Jahren oder ältere Menschen. Nach Einführung der Dialyse als hilfreiche Behandlungsmethode konnte die Mortalitätsrate verringert, jedoch Folgeerkrankungen nicht verhindert werden. Unter den betroffenen Kindern verbleibt ein Anteil von 3-5%, die sterben, und 12-30%, die Folgeerkrankungen wie Nierenversagen, Hypertonie oder Veränderungen des zentralen Nervensystems ausbilden [Nataro und Kaper, 1998; Bambauer *et al.*, 2010]. Neben dem HUS kann die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) als Folgeerkrankung auftreten, deren pathologisches Erscheinungsbild nahezu identisch mit dem des HUS ist, jedoch in erster Linie bei Erwachsenen vorkommt. Die Patienten sind häufig fiebrig und zeigen

neurologische Symptome [Paton und Paton, 1998]. Laut dem „Epidemiologischen Bulletin“ des Robert Koch-Instituts (RKI) [06/2011] wurden seit Einführung der Meldepflicht in den Jahren 2001 bis 2010 im jährlichen Mittel 992 EHEC-Erkrankungen in Deutschland gemeldet. Der ermittelte Altersmedian lag bei 4 Jahren und beide Geschlechter waren annähernd gleich stark betroffen. Hierbei ist laut RKI die registrierte Häufigkeit sehr von der Inanspruchnahme labordiagnostischer Möglichkeiten abhängig. In den USA werden im Gegensatz zu Deutschland jährlich etwa 73.000 Infektionen registriert [Lim *et al.*, 2010].

1.1.4 Therapie

Die Therapie ist schwierig, da Ätiologie und Pathogenese des HUS bislang nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Gabe von Antibiotika wird sehr kontrovers diskutiert. Während einige Studien gezeigt haben, dass die Gabe von Antibiotika eine erhöhte Freisetzung der Stx induzieren und somit die Möglichkeit einer Erkrankung an HUS erhöhen, zeigen andere Studien, dass der Einsatz von Antibiotika einen Schutz vor der Ausbildung eines HUS ergeben können [Panos *et al.*, 2006]. Das Verabreichen von Medikamenten, die die Darmmotilität hemmen, wird ebenfalls als kontra-induzierend angesehen, da die Ausscheidung der Pathogene verzögert wird [Noris und Remuzzi, 2005]. Für die Behandlung der Patienten steht deshalb zurzeit noch keine endgültige Therapie der Ursache zur Verfügung [Bambauer *et al.*, 2010]. Neben der Dialyse ist lediglich eine Behandlung der Symptome der Diarrhoe durch Flüssigkeitsgabe und Kontrolle des Elektrolythaushaltes möglich [Tarr *et al.*, 2005]. Bei 70% der Patienten erfolgt die Behandlung durch eine Transfusion mit Erythrozyten, 50% benötigen eine Dialyse und 25% zeigen neurologische Symptome wie Schlaganfall, Epilepsie und Bewusstlosigkeit [Noris und Remuzzi, 2005]. Der Einsatz einer Plasmainfusion oder einer Plasmapherese bei HUS-Patienten mit neurologischen Symptomen oder mit atypischen Symptomen wird als förderlich angesehen. Bislang gibt es keinen fundierten Nachweis, dass die Anwendung der Methode adulten Patienten einen Vorteil verschafft [Scheiring *et al.*, 2008]. Eine erste Studie gibt jedoch einen Hinweis darauf, dass eine verbesserte Nierenfunktion bei Kleinkindern erzielt werden kann [Kim *et al.*, 2011]. Eine weitere Studie, die 45 Kinder mit einer HUS-Erkrankung über einen Zeitraum von 9-11 Jahren begleitet hat,

konnte zeigen, dass der frühe Einsatz von Angiotensin-konvertierenden Enzym-Inhibitoren zu einer positiven Auswirkung auf die Spätfolgen der Krankheit, vor allem der Ausbildung von Nierenschäden, ergeben [Caletti *et al.*, 2004].

Die beste Möglichkeit einer HUS-Erkrankung vorzubeugen, besteht in der Vermeidung des Kontakts mit STEC, z. B. durch die Vermeidung des Kontakts mit erkrankten Personen [Tarr *et al.*, 2005]. Weiterhin empfiehlt das RKI, dass Kinder, Schwangere, ältere und immunsupprimierte Menschen Produkte tierischen Ursprungs nur im durchgegartem Zustand verzehren sollten. Auf die Einhaltung von Hygienemaßnahmen sollte ebenfalls geachtet werden. Gerade bei Kindern ist darauf zu achten, dass nach Kontakt mit Tieren die Hände gewaschen werden. Ebenso sollte bei dem Transport, der Lagerung und der Verarbeitung von Lebensmitteln vor allem tierischer Herkunft auf eine optimale Hygiene Wert gelegt werden. Weiterhin ist es besonders wichtig, dass bei der labordiagnostischen Untersuchung einer Gastroenteritis im Kindesalter eine EHEC-Infektion berücksichtigt wird [RKI, 2008]. Die Entwicklung schneller Nachweismethoden steht hier im Vordergrund, um eine korrekte Therapie ohne kontraproduktive Behandlungen der Patienten, wie z.B. durch die Gabe von Antibiotika schnellstmöglich zu gewährleisten [Paton und Paton, 1998].

Als wichtiger Ansatzpunkt für neue Therapien bei einer Infektion mit EHEC wird die Neutralisierung des Stx im Darm angesehen. Ein vielversprechendes Stx-bindendes Agens ist „Synsorb®Pk“, das nach oraler Verabreichung freies Stx im Darmlumen binden kann, jedoch nicht das aus dem Darm bereits absorbierte Stx [Paton und Paton, 1998]. Klinische Studien zu diesem Therapieansatz konnten jedoch keine Reduktion der HC- oder HUS-Ausbrüche nachweisen [Trachtmann *et al.*, 2003]. „Starfish“, ein weiteres Stx-bindendes Agens, wird intravenös verabreicht. Es konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass es einen Schutz gegen letale Dosen von Stx1 vermitteln kann. Eine modifizierte Version, genannt „Daisy“, konnte in demselben Modell einen Schutz gegen letale Dosen von Stx1 und Stx2 erzielen [Mulvey *et al.*, 2003]. Eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung des HUS basiert auf dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die A-Untereinheit des Stx2. Es konnte in Mäusen und Ferkeln gezeigt werden, dass die Gabe des Antikörpers zu einem frühen Zeitpunkt einer Diarrhoe-Erkrankung letale Komplikationen verhindert [Tzipori *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2010]. Aufgrund der

erlangten Erkenntnisse wird vermutet, dass der Einsatz von monoklonalen Antikörpern bei Patienten ebenfalls eine HUS-Erkrankung verhindern kann [Jeong *et al.*, 2010]. Während des HUS-Ausbruchs in Deutschland im Jahr 2011 wurde neben der Dialyse und der Plasmapherese für die Therapie der Patienten das Präparat Eculizumab eingesetzt. Der monoklonale anti-C5 Antikörper verhindert die Spaltung des Komplementproteins C5 und unterbindet somit die Zerstörung der roten Blutkörperchen [Ohanian *et al.*, 2011; Kemper, 2012].

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für eine Therapie besteht in der Reduktion des Rezeptors Globotriaosylceramid (Gb₃), an den das Stx2 an der Zelloberfläche bindet. Erste Erkenntnisse konnten zeigen, dass eine Inhibierung der Gb₃-Synthese in humanen Nierenepithelzellen den zytotoxischen Effekt des Stx2 unterbinden kann. In einem Rattenmodell konnte die Mortalität des HUS jedoch lediglich auf 50% reduziert werden [Silberstein *et al.*, 2011]. Die Entwicklung eines zellpermeablen Peptids, das intrazellulär an das Stx2 bindet und dieses in seiner Wirkung inhibiert, kann eine weitere Therapiemöglichkeit darstellen. Eine Studie an jungen Pavianen konnte zeigen, dass eine intravenöse Verabreichung des Proteins der Letalität des Stx2 entgegenwirkt [Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011].

1.2 Pathogenitätsfaktoren

Die Virulenz der STEC beruht auf zahlreichen Pathogenitätsfaktoren, die auf Plasmiden oder im Chromosom der STEC kodiert sind. Daher besteht die Pathogenität nicht ausschließlich auf der Produktion der Stx, sondern auch auf der Expression von weiteren Toxinen, wie z.B. dem „Cytotoxigenen distending Toxin V“ (Cdt-V) und dem Subtilase Zytotoxin SubAB, die ebenfalls zur Pathogenität der STEC beitragen können. Neben SubAB sind weitere Virulenzfaktoren wie das Enterohämolysin oder die Serinprotease EspP auf Plasmiden kodiert. Im Chromosom liegen die Faktoren auf Pathogenitätsinseln, aber auch über das Genom verteilt, vor. Da die STEC eine große Anzahl an Pathogenitätsfaktoren besitzen, wird im Weiteren lediglich auf einige Faktoren eingegangen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit von Bedeutung sind.

1.2.1 Shiga Toxine

Die Stx gelten als Hauptvirulenzfaktor der STEC, da sie durch ihre hohe Zytotoxizität schwere Krankheitssymptome verursachen können. Erstmals wurde diese Wirkung von Konowalchuk *et al.* [1977] beschrieben. Wenige Jahre später wurde das Toxin mit dem hämolytisch-urämischem Syndrom assoziiert [Karmali *et al.*, 1983]. Da das Toxin in seiner Struktur und Wirkung dem von *Shigella dysenteriae* Typ 1-produzierten Toxin sehr ähnlich war, wurde es als Shiga-ähnliches Toxin benannt [O'Brien *et al.*, 1983; Nataro und Kaper, 1998]. Die Stx sind auf temperenten, lambdoiden Bakteriophagen innerhalb des STEC-Genoms kodiert und können aufgrund ihrer Wirkung und Sequenzunterschiede in zwei Hauptgruppen, als Stx1 und Stx2 bezeichnet, eingeteilt werden. Dabei besitzt Stx1 eine nahezu identische Sequenz zu dem Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 und kann serologisch nicht von diesem unterschieden werden. Stx2 ist in seiner Aminosäure-Sequenz etwa 50% identisch zu Stx1, besitzt eine höhere toxische Wirkung und wird in erster Linie mit schweren Krankheitsverläufen wie HC und HUS in Verbindung gebracht [Noris und Remuzzi, 2005; Lim *et al.*, 2010]. STEC können entweder eine der beiden Stx-Varianten tragen oder beide in Kombination [Lim *et al.*, 2010]. Stx haben eine konservierte Struktur und gehören zu den AB₅-Holoenzymen, die aus einer A-Untereinheit und fünf identischen B-Untereinheiten besteht. Nachdem das Pentamer der B-Untereinheit die Bindung an den Hauptrezeptor Globotriaosylceramid (Gb₃) auf der eukaryotischen Zelloberfläche der Wirtszelle vermittelt hat, wird die enzymatisch aktive A-Untereinheit durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in das Cytoplasma der Zelle aufgenommen. Dort wird das Toxin durch retrograden Transport über den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) geleitet. Nachdem die A-Untereinheit im ER in ihre beiden Bestandteile A1 und A2 gespalten wurde, wird die enzymatisch aktive A1-Untereinheit in das Cytosol entlassen. Dort interagiert sie mit der 60S-Untereinheit der Ribosomen durch Abspalten eines Adenin-Restes an der 28S rRNA aufgrund ihrer N-Glycosidase-Aktivität. Infolgedessen wird die Proteinsynthese irreversibel inhibiert und der Tod der eukaryotischen Zelle herbeigeführt [Nataro und Kaper, 1998; Sandvig *et al.*, 2010]. Es ist weiterhin beschrieben, dass die Stx in Leukozyten und Epithel-, Endothel-, Nerven- und Lymphzellen zur Apoptose führen können [Tesch, 2010]. Der genaue Mechanismus

der Stx-Translokation zu verschiedenen Geweben ist bislang nicht gänzlich aufgeklärt [Lim *et al.*, 2010].

1.2.2 Plasmid-kodierte Pathogenitätsfaktoren

Subtilase Zytotoxin

Das Subtilase Zytotoxin (SubAB) wurde auf dem Plasmid pO113 eines STEC O113:H21 gefunden und ist wie Stx ein AB₅-Toxin. Die A-Untereinheit ist eine Subtilase-ähnliche Serinprotease, die nach ihrem Transport zum ER das essentielle ER-Chaperon BiP, einen Hauptregulator des ER, spaltet. Daraus folgt, dass die durch Bip-vermittelte „unfolded protein response“ gestört wird und u.a. ein Abbau von fehlerhaften Proteinen sowie ein Verhindern der Apoptose nicht weiter möglich ist. Dies führt letztendlich zum Tod der eukaryotischen Zelle. SubAB wirkt nachweislich toxischer auf Verozellen als Stx und verursacht erhebliche histologische Schäden in Gehirn, Nieren, Leber und Milz [Paton *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007].

Serinprotease

Neben SubAB können weitere Pathogenitätsfaktoren auf Virulenzplasmiden gefunden werden. Hierzu gehört die sekretierte Serinprotease EspP, die zur Familie der Autotransporter gehört und auf dem großen Plasmid der STEC O157:H7 gefunden wurde. Das Protein wird als großer Vorläufer synthetisiert und während der Sekretion am C- und N-Terminus prozessiert. Während der N-Terminus die enzymatische Aktivität vermittelt, ist der C-Terminus für den Transport durch die äußere Membran der Bakterienzelle verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Protease fähig ist, Pepsin A und den humanen Gerinnungsfaktor V zu spalten. Somit kann EspP mit den Symptomen einer HC in Verbindung gebracht werden [Brunner *et al.*, 1997]. Dziva *et al.* [2007] konnten zeigen, dass EspP einen Einfluss auf die Adhärenz an primäre intestinale Epithelzellen von Rindern und die intestinale Kolonisierung von Kälbern hat. In einer aktuellen Studie konnte demonstriert werden, dass EspP das EHEC-Hämolysin Hly spaltet. Es wird vermutet, dass die Interferenz

zwischen den Effektoren eine zusätzliche Regulation der Virulenz im Wirt darstellt [Brockmeyer *et al.*, 2011].

1.2.3 Chromosomale Pathogenitätsfaktoren

Pathogenitätsinseln

Im Chromosom der STEC sind weitere Virulenzfaktoren in sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI) kodiert. Diese bei pathogenen Bakterien vorkommenden PAI sind gekennzeichnet durch eine Größe von bis zu 200 kb und das Vorhandensein von einem oder mehreren Virulenzgenen sowie mobilen genetischen Elementen, die zu einer gewissen genetischen Instabilität führen. Weiterhin zeigen PAI einen höheren G/C-Gehalt im Gegensatz zum Kerngenom des Bakteriums auf und sind häufig in direkter Nachbarschaft zu tRNA-Genen lokalisiert [Schmidt und Hensel, 2004]. Die bekannteste und eng mit Pathogenität assoziierte Pathogenitätsinsel ist der „locus of enterocyte effacement“ (LEE). Dieser wurde erstmals 1998 in dem EPEC-Stamm E2348/69 beschrieben und besitzt eine Größe von 35,6 kb mit 41 offenen Leserahmen (ORF) [Elliott *et al.*, 1998]. Der LEE kann in EPEC, STEC, aber auch in *Citrobacter rodentium* gefunden werden. Die PAI kodiert ein Typ III-Sekretionssystem (T3SS), das Effektorproteine in das Cytosol der eukaryotischen Zelle injiziert, die „*E. coli* secreted proteins“ (Esp) und die „*E. coli* attaching and effacing“ (*eae*)-Gene. Die *eae*-Gene sind für die Bildung von Intimin, einem Adhäsin, zuständig, das zusammen mit seinem ebenfalls LEE-kodierten Rezeptor Tir (translocated intimin receptor) die Anheftung der Bakterien an die eukaryotische Zelle vermitteln. Insgesamt sind pathogene Bakterien durch die im LEE kodierten Virulenzgene fähig, an die eukaryotische Zelle zu adhären und die charakteristischen „attaching and effacing“ (A/E)-Läsionen im humanen Darmepithel auszubilden [Lim *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011]. Diese sind gekennzeichnet durch die Zerstörung der Mikrovilli und eine Reorganisation des Zytoskeletts der eukaryotischen Zelle. Es kommt zu einer Ausbildung von aktinreichen, sockelartigen Strukturen unter der adhärenierten Bakterienzelle [Nataro und Kaper, 1998]. Der LEE in *E. coli* Stamm EDL933 hat eine Größe von 43,4 kb und beinhaltet im Gegensatz zu EPEC einen P4-ähnlichen Prophagen. In diesem sind zu den 41 ORFs der EPEC 13 zusätzliche ORFs lokalisiert.

Neben dem LEE können STEC die „Tellurite Resistance and Adherence-Conferring“ Insel (TAI) tragen. Diese kodiert neben den vier Tellurit-Resistenzgenen das Eisen-abhängig regulierte Gen *iha*, das Adhärenz an eukaryotische Zellen vermittelt. Dieses Gen ist in seiner Sequenz anderen Adhäsinen zwar nicht ähnlich, es konnte jedoch *in vitro* eine Adhärenz an HeLa-Zellen nachgewiesen werden [Tarr *et al.*, 2000].

Außerhalb des LEE kodierte Effektorproteine

Außerhalb des LEE konnten zahlreiche Gene für Effektorproteine gefunden werden, die nicht auf der Pathogenitätsinsel lokalisiert sind, jedoch durch dessen T3SS sekretiert werden. Zu diesen als „Non-LEE-encoded Effector“ (*nle*) bezeichneten Genen zählt *nleD*, das in einer O-Insel lokalisiert ist, in die Wirtszelle translokalisiert wird und essentiell für die vollständige Kolonisation des Rinderdarms ist [Dziva *et al.*, 2004; Marchés *et al.*, 2005]. EspM wird ebenfalls durch das T3SS translokalisiert und induziert eine Umordnung des Zytoskeletts und der „tight junctions“ der eukaryotischen Zelle [Simovitch *et al.*, 2010]. Ein weiterer Faktor, der außerhalb des LEE im Genom eines lambdoiden Prophagen identifiziert wurde, ist der „Cycle Inhibiting Factor“ (Cif), ein bakterielles Zyklomodulin. Dieser wurde in dem *E. coli* O103:H2 Stamm E22, einem Kaninchen-Pathogen, identifiziert und induziert neben der Umordnung des Aktin-Zytoskeletts der eukaryotischen Zelle die Hemmung des Zellzyklus im Übergang der G2- zur M-Phase ähnlich dem Cdt-V [Marchès *et al.*, 2003].

Cytolethal Distending Toxin V

Das „Cytolethal Distending Toxin V“ (Cdt-V) ist ebenfalls auf einem Phagen kodiert und trägt neben den Stx zur Pathogenität der STEC bei [Janka *et al.*, 2003]. Cdt-V kommt vor allem bei Sorbitol-fermentierenden STEC O157:H⁻ und zudem häufig in den Serotypen O91:H21 und O113:H21 vor. Das zu den Holotoxinen gehörende Toxin wird durch die drei Gene *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* kodiert. Während CdtA und CdtC für die Bindung an die Zielzelle und den intrazellulären Transport des Toxins verantwortlich sind, ist CdtB die enzymatisch aktive Untereinheit, die im Zellkern

durch eine DNase I- ähnliche Aktivität die DNA der Wirtszelle schädigt. Daraus folgt ein Arrest des Zellzyklus in der G₁- oder G₂-Phase, eine gestreckte Zellmorphologie und schließlich der Tod der eukaryotischen Zelle [Janka *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2004]. Bielaszewska *et al.* [2005] konnten feststellen, dass das Toxin *in vitro* humane Endothelzellen irreversibel schädigt. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass dieses Toxin insbesondere in Stämmen, die kein Intimin besitzen, an der Pathogenität der STEC beteiligt ist [Cergole-Novella *et al.*, 2007].

1.3 Bakteriozine

Mikroorganismen können verschiedene Verteidigungssysteme gegen andere Organismen in ihrer Umgebung besitzen. Diese beinhalten die Produktion der klassischen Antibiotika, Nebenprodukte des Metabolismus, lytisch-wirkende Substanzen und eine Anzahl von Exotoxinen und Bakteriozinen. Die Gruppe der Bakteriozine stellt dabei die Familie der Verteidigung dar, die die größte Diversität besitzt [Riley und Wertz, 2002]. Es ist bekannt, dass *E. coli* zwei Typen von Bakteriozinen bilden kann. Die erste Klasse umschreibt die Colizine, eine stark diverse Gruppe. Colizine werden als Folge eines Stresses während der SOS-Antwort der Zelle gebildet und sind Plasmid-kodiert. Dabei liegen stets zwei eng miteinander verbundene Gene vor: Ein Gen kodiert das Toxin und ein weiteres Gen kodiert die Immunität der Zelle gegen das Toxin. Das produzierte Colizin wird aus der Zelle ausgeschleust, bindet an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle und veranlasst nach dessen Import den Tod der Zielzelle. Dies kann erfolgen durch die Bildung von Kanälen in der zytoplasmatischen Membran, durch die unspezifische Degradierung der DNA oder durch die Inhibierung der Proteinsynthese. Die zweite Klasse von Bakteriozinen beschreibt die Mikrozine, die weniger gut erforscht sind. Sie sind im Chromosom oder auf einem Plasmid kodiert, und basieren, wie für die Bakteriozine beschrieben, auf zwei zusammenhängenden Genen. Mikrozine werden unter spezifischen Bedingungen gebildet, wie z.B. einem Eisenmangel. Mikrozine binden an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle, die in die Aufnahme von Eisen involviert sind. Die Art und Weise, wie die Zelle getötet wird, ist nicht endgültig geklärt. Einige Mikrozine führen zu einer Störung des Membranpotentials der Zielzelle [Gordon und O'Brien, 2006]. Es wird vermutet, dass die Produktion eines oder

mehrerer Colizine die Pathogenität der *E. coli* O157 durch Inhibierung der natürlichen Darmflora verstärken kann [Bradley *et al.*, 1991; Hofinger *et al.*, 1998]. Auch *E. coli* der Serogruppen O6, O26, O44, O55, O111, O114, O119, O125 und O126 sind bekannt für die Bildung von Colizinen [Bradley, 1991]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass Vertreter der Serogruppe O103 ebenfalls ein Colicin bilden können [Karama *et al.*, 2008].

1.4 *Escherichia coli* O157:H7 Stamm EDL933

Der in dieser Arbeit im Vordergrund stehende *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 wurde 1982 nach dem Ausbruch Lebensmittel-bedingter hämorrhagischer Colitis aus Rinderhackfleisch isoliert und das Genom von Perna *et al.* [2001] sequenziert. Aus diesem Grund wird er oftmals als Referenzstamm für Untersuchungen herangezogen. Der direkte Vergleich der erlangten Sequenz mit der von *E. coli* K-12 Stamm MG1655, einem Laborstamm, zeigte ein gemeinsames Rückgrat der beiden Stämme von 4,1 Mb. Mit einer Größe von 5528 kb kodiert der Stamm EDL933 5.416 Gene. Er besitzt 1.387 O157-spezifische Gene, die in den danach benannten O-Inseln zu finden sind und 26% des Genoms ausmachen. Die insgesamt 177 O-Inseln des Stammes EDL933 enthalten Virulenzfaktoren, Prophagengene und Gene unbekannter metabolischer Funktion. Insgesamt können 561 Gene einer Funktion zugeordnet werden, weitere 338 Gene liegen in Clustern, die phagen-assoziiert sind und Überreste von Phagen genom darstellen [Perna *et al.*, 2001]. Von den 18 identifizierten lambdoiden Prophagen und Prophagenelementen ist lediglich der Stx2-kodierende Phage BP-933W lytisch, die anderen cryptisch im Genom vorhanden [Plunkett *et al.*, 1999]. Das zweite Phagen-kodierte Toxin Stx1 liegt auf dem Phagen CP-933V [O'Brien *et al.*, 1984]. Insgesamt kann aufgrund des Vergleichs der beiden Stämme davon ausgegangen werden, dass ein gemeinsamer Vorfahre vor 4,5 Millionen Jahren existiert hat, aus dem sich die beiden Stämme entwickelt haben. Der Stamm EDL933 hat durch die Aufnahme der bereits erwähnten Phagen ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren aufgenommen und sich durch horizontalen Gentransfer, wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, von dem Laborstamm abgetrennt [Reid *et al.*, 2000].

1.5 Umweltstress, Stressantwort und Virulenz

E. coli besitzt die Fähigkeit ein weites Spektrum von Habitaten zu besiedeln, in denen die Bakterien verschiedenen, teilweise schnell wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Hierzu zählen pH-Wert, Verfügbarkeit von Nährstoffen, Temperatur, oxidativer Stress und Osmolarität. Allgemein kann umweltbedingter Stress als ein externer Faktor definiert werden, der einen nachteiligen Effekt auf das physiologische Wohlergehen der Bakterienzelle maßgeblich durch Reduktion der Wachstumsrate hat. In extremeren Umständen kann er sogar zum Tod der Zelle führen [McMahon *et al.*, 2007]. Um sich an diese Stressbedingungen anpassen und in ihnen überleben zu können, hat *E. coli*, wie die meisten Bakterien, eine Reihe von Mechanismen entwickelt, zu denen in erster Linie die generelle Stressantwort gehört [Farrell und Finkel, 2003]. Unter Normalbedingungen belegt der vegetative Sigma-Faktor RpoD (σ^{70}) die Sigma-Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase und vermittelt als „housekeeping σ factor“ die Expression essentieller Gene durch Erkennung ihrer Promotor-Region und Initiation der Transkription [Burgess *et al.*, 1969; Ishihama, 2000]. Der *E. coli* Sigma-Faktor RpoD erkennt dabei zwei kurze DNA-Sequenzen, die als die -10 (5'-TATAAT-3') und -35 Region (5'-TTGACA-3') bekannt sind [Paget und Helmann, 2003]. Diese Konsensus-Sequenz variiert zwischen den verschiedenen Sigma-Faktoren und ergibt durch ihre spezifische Erkennung eine geregelte Genexpression [deHaseth *et al.*, 1998]. In *E. coli* sind insgesamt sieben Sigma-Faktoren bekannt, die jeweils einen Teil von Genen mit spezifischen Funktionen regulieren [Ishihama, 2000]. Der alternative Sigma-Faktor RpoS (σ^{38}) stellt hierbei den Hauptregulator der generellen Stressantwort dar. Er ist für die Transkription von etwa 10% aller *E. coli*-Gene während des Wachstums im Übergang zur Stationären Phase und unter verschiedenen Stressbedingungen wie Hyperosmolarität, oxidativem Stress, UV-Strahlung oder niedrigen pH-Werten verantwortlich [Hengge-Aronis, 2002; Weber *et al.*, 2005]. Der Regulator als maßgebliche Informationsvermittelnde Einheit verknüpft dabei komplexe Signalnetzwerke mit regulatorischen Kaskaden, die letztendlich die Expression von zahlreichen Strukturgenen, die mit der Stressantwort verknüpft sind, kontrollieren [Hengge-Aronis, 2002]. Ein weiterer wichtiger Sigma-Faktor ist der alternative Sigma-Faktor RpoH (σ^{32}), der infolge eines Hitze-Stresses die Expression von mindestens 26 sogenannten Hitzeschock-Proteinen (Hsp), die einer hitzebedingten Zerstörung von Proteinen entgegenwirken,

vermittelt [Chuang und Blattner, 1993]. Diese kodieren u.a. für molekulare Chaperone, die durch Hitze denaturierte Proteine binden und diesen zu einer korrekten Faltung und Aggregation verhelfen [Matsuoka und Shimizu, 2011]. Der alternative Sigma-Faktor RpoN (σ^{54}) ist im Wesentlichen verantwortlich für die Transkription von Genen, die während eines Stickstoffmangels mit dessen Verwertung im Zusammenhang stehen. Es konnte ebenfalls eine Rolle bei der Verwertung von Kohlenstoffquellen und der Synthese von Flagellen nachgewiesen werden [Reitzer und Schneider, 2001]. Die verbleibenden Sigma-Faktoren RpoE, RpoF und Fecl, auf die hier nicht näher eingegangen wird, sind für die Expression von Genen verantwortlich, die in die Synthese von Flagellen, dem extrazytoplasmatischen Stress und dem Eisentransport involviert sind [Kundu *et al.*, 1997; Ishihama, 2000]. Eine Übersicht der Sigma-Faktoren, den zugehörigen Genen und deren Expression kann der Tabelle 2.1 entnommen werden.

Tabelle 2.1. Sigma-Untereinheiten der bakteriellen RNA-Polymerase

Sigma-Faktor	Gen	Expression
σ^{70}	<i>rpoD</i>	unter Normalbedingungen
σ^{54}	<i>rpoN</i>	bei Stickstoffmangel
σ^{38}	<i>rpoS</i>	generelle Stressantwort
σ^{32}	<i>rpoH</i>	bei Hitzestress
σ^{28}	<i>rpoF</i>	Synthese von Flagellen
σ^{24}	<i>rpoE</i>	bei extrazytoplasmatischem Stress
σ^{19}	<i>fecl</i>	Eisentransport

Auch im Lebensmittel oder während der Verarbeitung von Lebensmitteln sind Pathogene verschiedenen Stressfaktoren wie Hitze, Kälte oder Säure ausgesetzt. Viele moderne Konservierungsmethoden, die im Lebensmittel Anwendung finden, um das Bakterienwachstum zu verlangsamen oder zu hemmen, basieren auf der Verwendung von einem oder mehreren Stressfaktoren. Ein gehemmtes Wachstum geht allerdings nicht mit der Einstellung der metabolischen und/oder der genetischen Aktivität der Zelle einher. Im Gegenteil, Zellen, die unter Stress stehen, versuchen den Stress durch phäno- und genotypische Anpassungen zu reduzieren [Storz und

Hengge-Aronis, 2000]. So ist die Übertragung von *E. coli* O157:H7 durch fermentierte und saure Lebensmittel wie Apfelwein, fermentierte Würste, Yoghurt oder Mayonnaise möglich [King *et al.*, 2010]. Der alternative Sigma-Faktor RpoN ist als ein wichtiger Regulator von Virulenzgenen und der Stressresistenz in vielen Bakterienarten bekannt. Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls für *E. coli* O157:H7 festgestellt werden, da eine Regulation des LEE und der Säureresistenz durch RpoN nachgewiesen werden konnte [Riordan *et al.*, 2010]. Die Ausbildung einer Säureresistenz steigert nicht nur die Fähigkeit der Pathogene, in sauren Lebensmitteln überdauern zu können, sondern kann gleichzeitig eine erhöhte Toleranz gegenüber anderen Stressfaktoren, z.B. während der Lebensmittelverarbeitung oder der Passage des Magen-Darm-Trakts, ergeben. Dieses Phänomen wird als „cross protection“ bezeichnet. Die Adaption an verschiedene Stressbedingungen wird für die hohe Virulenz von *E. coli* O157:H7 verantwortlich gemacht, da eine Passage des Gastrointestinaltrakts ermöglicht wird [Smith, 2003; King *et al.* 2010; Lim *et al.*, 2010; Riordan *et al.*, 2010]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass subletale Konservierungsmethoden in *E. coli* allgemein zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz führen [McMahon *et al.*, 2007].

Ein Zusammenhang des Sigma-Faktors RpoS mit der Virulenz von *E. coli* O157:H7 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Der Sigma-Faktor scheint einen Effekt auf die Expression von LEE-kodierten Genen, das Enterohämolysin-Operon und die Fimbrien-Gene, die für die Kolonisation der Bakterien von Bedeutung sind, zu haben [Dong und Schellhorn, 2010]. Weiterhin konnte im Stamm EDL933 nachgewiesen werden, dass 10% der RpoS-regulierten Gene innerhalb von O-Inseln lokalisiert sind [Dong und Schellhorn, 2009]. Da bislang jedoch kein geeignetes Tiermodell für die Analyse aller Aspekte einer *E. coli*-Pathogenese während eines HUS zur Verfügung steht, ist die Erforschung der genauen Rolle des RpoS während der Pathogenese erschwert [Kazmierczak *et al.*, 2005]. Ebenso scheint der Effekt von RpoS auf die Expression von Genen innerhalb des LEE Stamm-spezifisch zu variieren [Dong und Schellhorn, 2009].

Über den Effekt eines Hitzeschocks (HS) auf die Genexpression innerhalb der O-Inseln oder auf dem Plasmid pO157 der *E. coli* O157 ist bislang wenig bekannt. So haben Carruthers und Minion [2009] die Genexpression des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 unter erhöhten Temperaturbedingungen bei 50°C untersucht, um

einen Einblick in die Antwort der Bakterien auf Transkriptionsebene zu erhalten. Unter den 82 hochregulierten Genen konnten Gene der generellen Hitzeschock-Antwort gefunden werden, jedoch auch zwei LEE-kodierte Gene und 23 Gene, die in O-Inseln lokalisiert sind. Zwölf der Gene waren auf Bakteriophagen kodiert, eine erhöhte Expression der Stx konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wird als unwahrscheinlich angesehen, dass die hochregulierten O157-spezifischen Gene in direkter Verbindung mit der generellen HS-Antwort der Zelle stehen. Vielmehr könnte deren erhöhte Expression während eines HS einem weiteren Zweck, wie der Pathogenese, dienen [Carruthers und Minion, 2009].

1.6 Identifizierung von Stress- und Virulenzgenen

Mithilfe verschiedener Methoden ist es experimentell möglich, die Biochemie und Molekularbiologie von Bakterien zu untersuchen. So können Einblicke in ihre Wahrnehmung und Reaktion auf eine bestimmte Umgebung und ihre Vermehrung in dieser erlangt werden. Techniken wie Microarray- oder Proteomanalysen ermöglichen ein gesteigertes Verständnis von Wachstum und Überleben von Pathogenen in tierischen oder humanen Wirten, in der Umwelt und in Lebensmitteln. Da diese Techniken lediglich die Untersuchung der Genexpression *in vitro* unter vereinfachten Bedingungen zulassen, ist es erforderlich, dass komplexere Modelle für die Erforschung von *in vivo*-Vorgängen, z.B. im Lebensmittel oder in heterogenen mikrobiellen Populationen, entwickelt werden. Techniken wie die *In vivo*-Expressions-technologie (IVET) oder die Signaturmarkierte Mutagenese (MST) bieten eine Möglichkeit für die Erforschung der bakteriellen Genexpression unter solchen Bedingungen [Dudley, 2008]. Da in dieser Arbeit die IVET im Vordergrund steht, wird in erster Linie auf diese Methode im Folgenden näher eingegangen.

1.6.1 *In vivo*-Expressionstechnologie

Bei der *In vivo*-Expressionstechnologie handelt es sich um eine „promoter trap“-Methode, die erstmals im Jahr 1993 veröffentlicht wurde [Mahan *et al.*, 1993]. Sie basiert auf der selektiven Anreicherung von bakteriellen Genen über deren

Promotoren, die *in vivo* induziert werden und somit für das Wachstum unter bestimmten Umweltbedingungen wichtig sind. Die Möglichkeit, Gene pathogener Bakterien in einem *In vivo*-Modell experimentell identifizieren zu können, gibt Aufschluss über die Fähigkeit der Pathogene, einen Wirt zu kolonisieren und Schäden oder Krankheit zu verursachen. Somit erlaubt diese Methode, die bakterielle Antwort auf den direkten Kontakt mit dem Wirt zu studieren [Chiang *et al.*, 1999]. Die Originalmethode wurde in einem Mausmodell angewendet, in dem bakterielle Gene von *Salmonella enterica* Serovar Thyphimurium identifiziert wurden, die mit der Infektion und der Pathogenität der Bakterien in Verbindung gebracht werden konnten. Die damalige Methode basierte auf einem „suicide vector“ mit einem promotorlosen *purA-lacZY*-Operon als Reportergen. In diesem Vektor wurde eine chromosomale Genbank des Pathogens erstellt und durch Konjugation in eine Purin-auxotrophe Mutante des Wildtyps transferiert, um eine homologe Rekombination zu erzielen. Anschließend wurden die auxotrophen Mutanten in Mäuse injiziert und es konnten die Mutanten positiv selektiert werden, die die Auxotrophie durch einen aktiven Promotor vor dem Selektionsgen komplementieren konnten [Mahan *et al.*, 1995; Angelichio und Camilli, 2002]. Die Methode wurde ebenfalls erfolgreich in einem weiteren Mausmodell für die Identifizierung von Virulenzgenen in *Pseudomonas aeruginosa* angewendet [Wang *et al.*, 1996].

1.6.2 Antibiotika-basierte IVET-Systeme

Da die Komplementierung einer Auxotrophie nicht in allen mikrobiologischen Systemen angewendet werden konnte, wurde basierend auf dem bereits beschriebenen grundlegenden Prinzip eine weitere Variante der IVET entwickelt, die Rekombinations-unabhängig ist und auf einem Plasmid basiert. Diese Variante enthält als Reportergen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol, das dem Wirt oder der verwendeten Matrix gezielt zugeführt werden kann, um eine Selektion von *in vivo*-induzierten Genen in jedem beliebigen System zu ermöglichen [Chiang *et al.*, 1999]. Die erste Anwendung der Antibiotika-basierten IVET erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Mahan [1995] und führte zu einer Identifizierung von weiteren Virulenzgenen in *Salmonella thyphimurium* im Mausmodell und in kultivierten Makrophagen. Diese IVET-Variante war weiterhin hilfreich, um Stress-

und Virulenzgene in *Yersinia enterocolitica* in einem Mausmodell ausfindig zu machen [Young und Miller, 1997]. Auch für *E. coli* wurde dieses System erfolgreich in einem Mausmodell angewendet. Khan und Isaacson [2002] untersuchten einen pathogenen *E. coli*-Stamm der Serogruppe O25, der aus einem Patienten mit Sepsis isoliert werden konnte. Sie identifizierten und charakterisierten 95 Gene, die während der Persistenz im Wirt und des Infektionsprozesses von Bedeutung waren. Das Plasmid, das ihrer Arbeit zugrunde lag, war der Promotor-Selektionsvektor pKK232-8. Eine Plasmidkarte des Vektors ist in der Abbildung 2.1 und eine schematische Darstellung des IVET-Systems in Abbildung 2.2 aufgezeigt. Die Arbeitsgruppe um Hunt [2001] entwickelte einen Promotor-Selektionsvektor, der auf einer promotorlosen Kanamycinresistenz basierte. Sie konnten mit Hilfe des Vektors *in vivo*-induzierte Gene von *Pasteurella multocida* in einem Mausmodell identifizieren, die während des Infektionsverlaufs eine Rolle spielten. Die Antibiotika-basierte IVET wurde jedoch nicht nur in verschiedenen Mausmodellen für die Identifizierung von *in vivo*-induzierten Genen verwendet, sondern u.a. auch für *Xanthomonas campestris* in Rübenkeimlingen und für *Yersinia ruckeri* in Regenbogenforellen [Osbourn *et al.*, 1987; Fernández *et al.*, 2004].

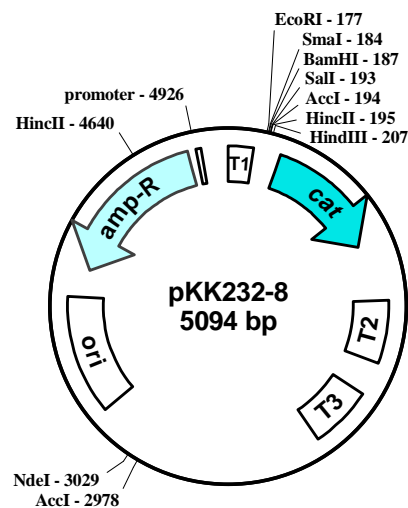


Abbildung 2.1: Promotor-Selektionsvektor pKK232-8, modifiziert nach Brosius [1984]. Der Vektor wurde für Promotorstudien konstruiert und besitzt ein promotorloses Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*) stromabwärts der „multiple cloning site“. Der Vektor beinhaltet Transkriptionsstopps aus dem *rrnB*-Operon aus *E. coli*, den Replikationsursprung (*ori*) aus dem Plasmid pBR322 und ein Ampicillinresistenz-Gen (*amp-R*).

Da das IVET-System die Anreicherung von stark exprimierten Genen begünstigt, schwach oder nur vorübergehend exprimierte Gene jedoch vernachlässigt, wurde dieses Problem durch eine weitere Veränderung der Methode gelöst. Die Resolvase-IVET (RIVET) basiert auf einer Rekombinase als Reporter gen, die nach Klonierung eines aktiven Promotors und Integration in das Wirtsgenom exprimiert wird und spezifisch eine Resistenzkassette, die von sogenannten „res sites“ umgeben ist, aus dem Zielgenom entfernt. So wird die Detektion von Promotoren ermöglicht, die während der Infektion nur kurz aktiv sind [Chiang *et al.*, 1999]. Die RIVET wurde u.a. erfolgreich für die Identifizierung von Virulenz-assoziierten Genen in *Vibrio cholerae* verwendet, die nach Infektion von Mäusen exprimiert wurden [Camilli und Mekalanos, 1995]. Auch konnte sie für den Gram-positiven Stamm *Staphylococcus aureus* genutzt werden [Lowe *et al.*, 1998].

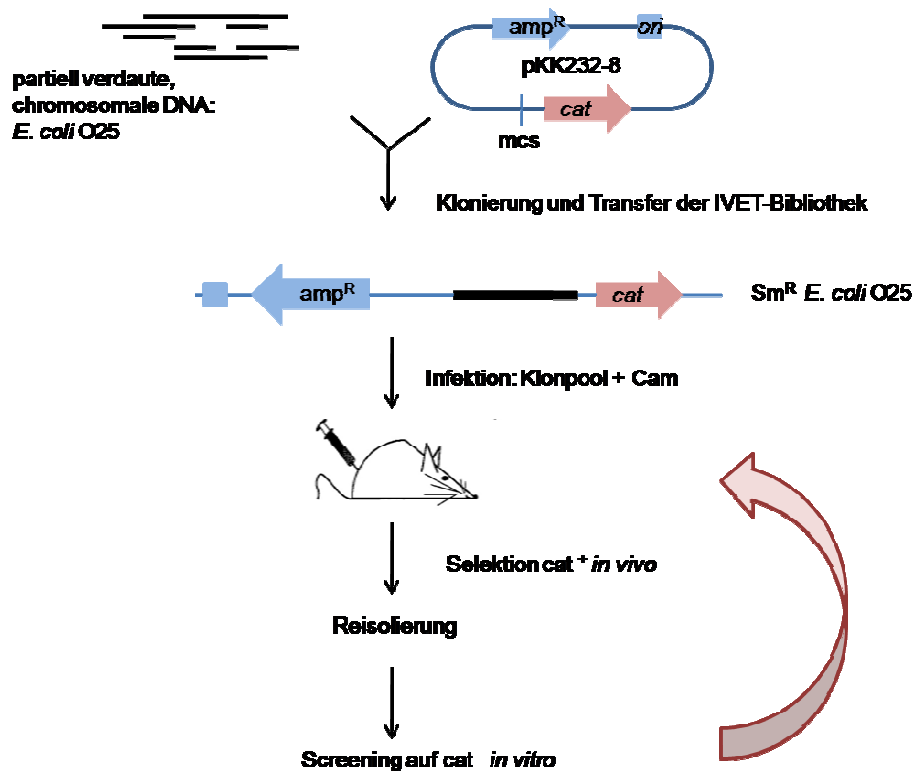


Abbildung 2.2: IVET-System, modifiziert nach Khan und Isaacson [2002]: Die Genbank des *E. coli* O25 Stammes wurde in eine Streptomycin-resistente (Sm^R) Mutante des Stammes transferiert. Die Anreicherung erfolgte in einem Mausmodell unter Zugabe des Chloramphenicols (Cam) in Intervallen. *In vitro* Chloramphenicol-sensitive Klone wurden wiederholt für die Infektion der Mäuse verwendet.

1.6.3 IVET- Anwendung im Lebensmittel

Wie bereits beschrieben konnten verschiedene IVET-Systeme in erster Linie erfolgreich im Tiermodell angewendet werden. Für die Untersuchung der Genexpression im Lebensmittel wurde diese Methode bislang jedoch selten herangezogen. Eine Untersuchung der Expression von Persistenz- und Virulenz-assoziierten Genen apathogener bzw. pathogener *E. coli*-Stämme wurde im Lebensmittel bislang nicht durchgeführt. Dal Bello *et al.* [2005] verwendeten einen *Lactobacillus reuteri* Stamm während der Fermentation eines Sauerteiges und konnten mithilfe der Methode Gene identifizieren, die als Antwort auf die Umgebung exprimiert wurden. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte ebenfalls durch Anwendung eines IVET-Systems Gene eines *Lactobacillus sakei* Stammes ermitteln, die während einer Rohwurst-Fermentation von Bedeutung waren [Hüfner *et al.*, 2007]. Die Untersuchung *in vivo*-induzierter *E. coli*-Gene im Lebensmittel ist somit essentiell, um die Übertragung pathogener Stämme auf den Menschen weiter aufzuklären.

2 Zielsetzung

Das zentrale Thema dieser Arbeit war die Untersuchung der spezifischen Genexpression des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 im Lebensmittel. Da das Risikolebensmittel Rinderhackfleisch eine Hauptquelle für EHEC-Infektionen darstellt, sollten in der vorliegenden Arbeit bakterielle Mechanismen, die einer erfolgreichen Persistenz der Bakterien in der Matrix zugrunde liegen, detektiert werden. Das EHEC-Genom enthält zahlreiche Gene mit unbekannter Funktion, unter denen Stress- und Virulenzfaktoren vermutet werden. Mit Hilfe der *In vivo*-Expressionstechnologie (IVET) sollte untersucht werden, ob solche Gene und weitere Stress-, Persistenz- und Virulenz-assoziierte Gene des Stammes, die während des Wachstums in Hackfleisch exprimiert werden, identifiziert werden können. Dabei basierte das in dieser Arbeit gewählte IVET-System auf dem Promotor-Selektionsvektor pKK232-8, der eine promotorlose Chloramphenicol-resistenz für die Selektion von Promotoren besitzt. Durch die Detektion der in Hackfleisch *in vivo*-induzierten Promotoren und somit der zugehörigen Gene sollten Erkenntnisse für die Entwicklung effektiver Strategien zur Kontrolle der Pathogenen im Lebensmittel gewonnen werden. Ein Augenmerk sollte dabei auf dem Einfluss der Temperatur liegen. Das IVET-System sollte unter erhöhten Temperaturbedingungen bei 42°C durchgeführt werden, um den Einfluss dieses Stress-Faktors, der während eines Garvorgangs auf die Bakterien im Lebensmittel einwirkt, zu studieren. Durch die Untersuchung des Pathogens auf genomischer Ebene sollten Rückschlüsse auf die Stress-Antwort, die das Überleben der Bakterien im Lebensmittel sichern, gezogen werden.

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten 23 *E. coli*-Stämme der Serogruppen O26, O103 und O157 auf ihre Fitness in der Matrix Rinderhackfleisch untersucht werden. Es sollte der Vermutung nachgegangen werden, ob pathogene Isolate aus Patienten mit HUS-Erkrankung einen Vorteil gegenüber Isolaten aus Lebensmitteln mit tierischem Ursprung und Isolaten aus Tieren in der Matrix besitzen. Die Fähigkeit der Stämme in diesem Risikolebensmittel zu überleben, sich zu vermehren und sich über das Lebensmittel zu verbreiten sollte analysiert werden. Es sollte gezeigt werden, ob pathogene Stämme eine stärkere Konkurrenzfähigkeit besitzen.

Dabei sollten die Stämme zunächst auf die Anwesenheit von zehn Virulenzfaktoren geprüft werden, um eine erste Abschätzung ihres Risikopotentials erstellen zu können. Nachfolgend sollten die Stämme auf ihr Wachstum in Hackfleisch bei 15°C, 20°C und 37°C verglichen werden. Die ersten beiden Temperaturen sollten dabei Bedingungen simulieren, die während der fehlerhaften Lagerung von Hackfleisch auftreten können. Mit der Methode des Hemmhoftests sollte abschließend geklärt werden, welche Stämme einen Vorteil durch Bildung einer Bakterien-hemmenden Substanz gegenüber anderen Stämmen erlangen können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Becton Dickinson, Biomol, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Das sterile DNase- und RNase-freie destillierte Wasser UltraPure™ wurde von der Firma Invitrogen bezogen und für die Arbeiten mit DNA sowie für die Herstellung von Enzym- und Antibiotika-lösungen verwendet.

3.1.2 Enzyme und Desoxyribonukleotidtriphosphate

Restriktionsenzyme	Fermentas, Promega
T4 DNA Ligase	Fermentas
DF Taq-Polymerase	Genaxxon Bioscience
Exonuklease I	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma-Aldrich

3.1.3 DNA-Größenstandards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (250-10000bp)	Fermentas
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (80-1000bp)	Fermentas

3.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden vom Hersteller (Eurofins MWG Operon) als Lyophilisat geliefert und in sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Stammlösung besaß eine Konzentration von 100 pmol/µl und wurde für die Arbeitslösungen auf 30 pmol/µl für die PCR bzw. 10 pmol/µl für die Sequenzierung verdünnt. Für die Herstellung der Oligonukleotide zur Vervollständigung der inserierten EDL933-Sequenz in den Vektoren pKK232-8 und pAK-1 diente die durch den Primer SP1 bzw. SP2 erlangte DNA-Sequenz als Matritze für das „Primer walking“-Verfahren.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und PCR-Bedingungen sind im Anhang in den Tabellen A4.4 und A5 aufgeführt.

3.1.5 Plasmide

Die Genkarte des in dieser Arbeit neu konstruierten Plasmids befindet sich unter der Abbildung 4.6.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pKK232-8	Promotor-Klonierungsvektor, Amp ^R , Cam	Brosius, 1984
pK18	Klonierungsvektor, Kan ^R	Pridmore, 1987
pAK-1	Promotor-Klonierungsvektor, Amp ^R , Kan	diese Arbeit

3.1.6 Verwendete Bakterienstämme

Zusätzlich zu den hier in Tabelle 3.2 aufgelisteten Stämmen wurden weitere *E. coli*-Isolate aus der Stammsammlung des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim verwendet. Diese sind in dem entsprechenden Kapitel 4.3 in der Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
C600	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21</i>	Appleyard, 1954
EDL933	O157:H7, <i>stx1, stx2, eae-γ</i>	O'Brien <i>et al.</i> , 1984
HB101	F ⁻ , <i>mcrB, mrr, hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻), recA13, leuB6, ara-14, proA2, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rpsL20 (Sm^r), supE44, λ⁻</i>	Boyer <i>et al.</i> , 1969
HB101 Nal ^R	F ⁻ , <i>mcrB, mrr, hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻), recA13, leuB6, ara-14, proA2, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rpsL20 (Sm^r), supE44, λ⁻, Nal^r</i>	diese Arbeit
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG, rfb-50, rph-1</i>	Bachmann, 1987

3.1.7 Nährmedien und Puffer

Für die Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Nährmedien

Luria-Bertani-Medium	Bacto™Trypton	1,0% (w/v)
(LB-Medium):	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1,0% (w/v)

Vor dem Autoklavieren wurde das Medium mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Für feste Medien wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar-Agar, für Weichagar 0,7% (w/v) zugesetzt.

Super Optimal Broth	Bacto™Trypton	2,0% (w/v)
ergänzt mit Glukose	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
(SOC-Medium):	KCl	2,5 mM
	NaCl	10 mM

Dem Medium wurden nach dem Autoklavieren folgende Substanzen sterilfiltriert zugegeben:

Glukose	20 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Material und Methoden

modifizierte Trypticase-	Caseinpepton	1,5% (w/v)
Soja-Bouillon, Neogen	Sojamehl	0,5% (w/v)
(mTSB-Medium):	NaCl	0,5% (w/v)

zusätzlich:

Gallensalze Nr. 3	1,5% (w/v)
K ₂ HPO ₄	1,5% (w/v)

Das Medium wurde mit 1M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Sorbitol-MacConkey-	Caseinpepton	17% (w/v)
Agar, Sifin (SMAC):	Fleischpepton	3% (w/v)
	Sorbit	10% (w/v)
	Natriumchlorid	5% (w/v)
	Gallensalze Nr. 3	1,5% (w/v)
	Agar	12% (w/v)
	Neutralrot	0,03% (w/v)
	Kristallviolett	0,001% (w/v)

50-fach Tris-Acetat-	Tris-HCl	2 M
EDTA-Puffer	EDTA (pH 8,0)	0,1 M
(TAE-Puffer):	Eisessig	5,71% (v/v)

Material und Methoden

PBS:	NaCl	170,0 mM
	KCl	3,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	13 mM

Die Lösung wurde mit 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Ladepuffer:	Glycerin	70% (v/v)
	Bromphenolblau	0,2% (w/v)
	Xylencyanol	0,02% (w/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	EDTA (pH 7,5)	25 mM

Puffer für die Isolierung von Plasmiden

Lösung 1:	Glukose	50 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	EDTA	10 mM
Lösung 2:	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
Lösung 3:	Kaliumacetat	3 M
	Eisessig	11,5% (v/v)

Puffer für die Isolierung von genomischer DNA

STET-Puffer:	Saccharose	233 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	20 mM
	Triton X-100	5% (v/v)
	Lysozym	1,8 mg/ml

Puffer und Lösungen für die Hybrisierung

Denaturierungslösung:	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Neutralisierungslösung:	NaCl	1,5 M
	Tris-HCl (pH 7,5)	1 M
20x-fach SSC:	Natriumcitrat	0,3 M
	NaCl	3 M

3.1.8 Antibiotika

Die Stammlösungen der Antibiotika Ampicillin (Roth), Kanamycin (Sigma), Novobiocin (Sigma) und Nalidixinsäure (Sigma) wurden in sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser (UltraPure™, Invitrogen) hergestellt. Chloramphenicol (Sigma) wurde in 100% (v/v) Ethanol und Norfloxacin (ICN Bio-medicas) in 100% (v/v) Eisessig gelöst.

Tabelle 3.3: Verwendete Antibiotika und deren Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100	100
Chloramphenicol	20	20
	80	80
Kanamycin	50	50
	200	200
Nalidixinsäure	20	20
Norfloxacin	2,5	0,5
Novobiocin	4,5	18

3.2 Kulturtechnische Arbeitsmethoden

3.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Nuair, Class II, Integra Biosciences). Die Kultivierung der Bakterien erfolgte dabei auf festem LB-Medium oder in LB-Flüssigkulturen bei 37°C, ggf. unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (siehe Tabelle 3.3). Die Herstellung von Übernachtskulturen erfolgte durch Einreiben einer Bakterienkolonie in 2-10 ml LB-

Medium, ggf. mit dem entsprechenden Antibiotikum, und der Inkubation auf einem Schüttelinkubator bei 180 rpm (KS 4000i control, IKA®).

Die dauerhafte Lagerung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerinkonserven. Der zu konservierende Stamm wurde auf LB-Medium, ggf. mit dem entsprechenden Antibiotikum, fraktioniert ausgestrichen und nach der Inkubation über Nacht vorsichtig in 2 ml sterilem PBS resuspendiert. 400 µl der Bakteriensuspension wurden mit 600 µl 80% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und in einem sterilen Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

3.2.2 Induktion der Bakteriozinbildung

Die Induktion der Bakteriozinbildung erfolgte mit Norfloxacin (nach Gordon *et al.*, 1998, modifiziert). Hierzu wurde 1 ml einer Übernachtskultur des Teststammes zu 10 ml frischem LB-Flüssigmedium gegeben und für 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 µg/ml Norfloxacin wurde erneut für 4 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert, 1,5 ml Kultur in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres steriles Eppendorfgefäß überführt und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C maximal für eine Woche.

Für den Nachweis der Bakteriozinbildung wurden LB-Agarplatten mit 3 ml Weichagar und 100 µl Übernachtskultur von *E. coli* K-12 überschichtet. Nach dem Trocknen der Platten wurden 25 µl des sterilfiltrierten Überstandes auf Plättchen gegeben und diese auf die Platten aufgelegt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C konnten am nächsten Tag die Hemmhöfe ausgewertet werden.

Für den Test auf Bakteriophagen in den Überständen wurde eine LB-Agarplatte mit 100 µl Übernachtskultur von *E. coli* K-12 und 10 µl des Überstandes überschichtet. Die Plaque-bildende Einheiten (PbE) wurden nach einer Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht bestimmt. Weiterhin wurden die Überstände 2 Tage bei -80°C gelagert, um mögliche Phagen zu inaktivieren (nach Gordon *et al.*, 2006), und anschließend erneut 25 µl auf eine mit *E. coli* K-12 überschichtete LB-Agarplatte gegeben. Nach einer Inkubation der Platten über Nacht wurden diese auf Plaques geprüft.

3.3 Molekulargenetische Arbeitsmethoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für Klonierungen oder Sequenzanalysen wurden für Plasmide mit geringer Kopienzahl 25 ml, für Plasmide mit hoher Kopienzahl 2 ml Übernachtskultur geerntet. Die Präparation der Plasmide erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Überprüfung nach einer Transformation wurden die Plasmide mittels alkalischer Lyse (nach Birnboim & Doly, 1979, modifiziert) präpariert. Hierzu wurden 2 ml Übernachtskultur für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 µl Lösung 1 (siehe Abschnitt 3.1.7) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 (siehe Abschnitt 3.1.7) wurde vorsichtig invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung 3 (siehe Abschnitt 3.1.7) zugegeben, vorsichtig invertiert, 5 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 750 µl 100% (v/v) Ethanol zugegeben und für 30 min bei -20°C inkubiert. Die anschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 30 min führte zur Sedimentation der DNA. Nach einem Waschschriff mit 70% (v/v) Ethanol wurde erneut für 8 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.3.2 Isolierung von genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA wurden 2 ml Übernachtskultur bei 6.000 rpm für 10 min zentrifugiert, das Bakterienpellet mit 1 ml 150 mM NaCl-Lösung gewaschen und nochmals 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl STET-Puffer (siehe Abschnitt 3.1.7) resuspendiert, die entstehende Suspension 5 min bei RT inkubiert, auf 100°C für 1 min erhitzt und danach direkt 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 30 µl 10% (w/v) SDS und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde für 1 h bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl RNase A

(100 mg/ml) und 200 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 37°C. Für die Extraktion der DNA wurde der Ansatz mit 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Extraktion 3-4 Mal wiederholt, bis die wässrige Phase klar wurde. Für die Fällung der DNA wurden 1 ml 100% (v/v) Ethanol und 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 7,2) zugegeben und 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C. Nach Waschen des Pellets mit 70% (v/v) Ethanol wurde dieses getrocknet und in 80 µl sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser gelöst.

3.3.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm in Quarzküvetten (GeneQuant™ pro, Amersham Biosciences). Die Reinheit wurde dabei durch den Quotienten von 260/280 nm angegeben und sollte für DNA bei einem optimalen Wert von 1,8 liegen [Maniatis *et al.*, 1982].

3.3.4 Restriktionsspaltungen von DNA

Die DNA-Restriktionen erfolgten nach Herstellerangaben mit dem für das jeweilige Enzym empfohlenen 10x Enzympuffer (Endkonzentration 1x) und sterilem Wasser in einem Gesamtvolumen von 10-100 µl. Bei Verwendung von zwei Restriktionsenzymen wurde der Puffer genutzt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität nach Angabe des Herstellers zeigten. Die Zugabe des Enzyms (1-5 U) erfolgte zum Schluss. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei optimaler Temperatur des jeweiligen Enzyms für 15-120 min.

3.3.5 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Für die RFLP wurden 8,5 µl PCR-Produkt mit 1 µl des entsprechenden 10x Enzym-puffers und 0,5 µl (5U) des Enzyms für 2 h bei der nach Herstellerangabe entsprechenden Temperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese unter Verwendung eines 2%igen Agarosegels für 1,5 h bei 130 V durchgeführt.

3.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA erfolgte nach einer Restriktion und nach der Ligation vor einer Elektrotransformation mittels Ethanol-Fällung. Hierzu wurden 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol 100% (v/v) Ethanol zugegeben, 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zur Sedimentation der DNA zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 70% (v/v) Ethanol wurde erneut bei 13.000 rpm für 8 min und 4°C zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in 10-30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser gelöst.

Nach Auftrennung von DNA in einer Agarosegelelektrophorese wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet, um die gewünschten DNA-Fragmente aus der Gelmatrix zu extrahieren. Die Eluierung der DNA erfolgte in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser.

War eine Aufreinigung von PCR-Produkten notwendig, wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert. Im Vorfeld einer Sequenzierung wurden 5 µl des PCR-Produkts mit 2 µl SAP und 0,5 µl Exonuklease I versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 80°C.

3.3.7 Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung der freien 5'-Enden von linearisierter Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 U Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas) und dem zugehörigen 10x Puffer (Endkonzentration 1x). Nach Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 37°C wurde das Enzym für 15 min bei 65°C hitzei naktiviert.

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20-40 µl, wobei die Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:3 verwendet wurden. Zu dem Gemisch wurden steriles Wasser, 10x T4-DNA-Ligasepuffer (Endkonzentration 1x) und 2,5 U T4-DNA-Ligase gegeben. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 4 h bei RT.

3.3.8 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation durch Elektroporation

Für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurden 50 ml LB-Flüssigmedium mit 500 µl Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert. Nachdem die Zellen 15 min auf Eis standen wurde 15 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die pelletierten Zellen zweimal mit eiskaltem, sterilem deionisiertem Wasser (50 ml bzw. 25 ml) und einmal mit 2 ml eiskaltem, sterilem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl eiskaltem, sterilem 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Portionen aufgeteilt.

Für die Elektroporation wurden 40 µl elektrokompetente Zellen mit 2-10 µl DNA vorsichtig auf Eis gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2mm, Bio-Rad) überführt. Die Küvette mit dem Ansatz wurde 1 min auf Eis stehen gelassen und anschließend die Elektroporation durchgeführt. Sie erfolgte bei 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV und 5,2 bzw. 5,3 ms des elektrischen Impulses (Gene Pulser, Bio-Rad). Nach der Pulsauslösung wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben und der Ansatz in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 180 rpm zur Regeneration der Zellen wurden 100 µl und die restlichen 900 µl mit

einem sterilen Spatel auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht.

3.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 25 µl für den Nachweis eines Gens bzw. 50 µl für eine Klonierung vor einer Sequenzierung und für die Herstellung der Hybridisierungs-Sonden. Für einen Standard-Reaktionsansatz (siehe Tabelle 3.4) wurden 25-100 ng aufgereinigte DNA bzw. 2,5 µl einer Bakteriensuspension (eine Einzelkolonie eingerieben in 50 µl sterilem 150 mM NaCl) als Template-DNA verwendet. Die DNA-Amplifikationen erfolgten in einem Thermocycler der Firma Biometra (T1 Thermal Cycler).

Tabelle 3.4: Standard-Reaktionsansatz für eine PCR

PCR-Reagenzien	Volumen (25 µl)
10x Puffer (S)	2,5 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,5 µl
Forward-primer	0,5 µl
Reverse-primer	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl
Template-DNA	2,5 µl
Steriles Wasser UltraPure™	18,3 µl

Es wurden folgende Standardbedingungen für die PCR eingesetzt: Der erste Schritt erfolgte für 5 min bei 94°C, dann wurden 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt (30 sec, 94°C), einem Annealingschritt (60 sec, Temperatur siehe Tabelle A5) und einem Elongationsschritt (72°C, Zeit je nach Länge der Zielsequenz, siehe Tabelle A5) durchgeführt. Beendet wurde die PCR mit einem Elongationsschritt von 5 min bei 72°C. Die verwendeten Oligonukleotide, deren Parameter sowie abweichende PCR-Bedingungen können den Tabellen A4.4 und A5 entnommen werden.

Für die Überprüfung der PCR-Produkte wurden 5 µl mit 2 µl Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 130 V in 1x TAE-Puffer. Abschließend erfolgte das Anfärben des Agarosegels in einem Ethidiumbromidbad (10 mg/ml) und die Dokumentation mittels UV-Licht (Alphamager®, Biozym).

3.3.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte im Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim mit Hilfe des Kapillar-Sequenzers CEQ™8000 Genetic Analysis System (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld). Sie basierte auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [1977]. Die entstandene Sequenz wurde mit der BioEdit Sequence Alignment Software nach Hall [1999] ausgewertet und anschließend mit Hilfe des Blast-Algorithmus mit der in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) hinterlegten Sequenzen verglichen. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang Tabelle A4.4 aufgeführt.

3.3.11 Southern Hybridisierung

Herstellung der Sonden

Für die Dot-Blot- und Koloniehybridisierung wurden die PCR-Produkte (s. Anhang Tabelle A5) einer Gelelektrophorese (1%, 130 V, 1 h) unterzogen, mittels Gelextraktion (QIAEXII, Qiagen) aufgereinigt und anschließend eine weitere PCR durchgeführt. Die daraus entstandenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) und die Konzentration mit Hilfe des Photometers bestimmt. Die DIG-DNA-Markierung erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem Endvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers. Die für die Sondenherstellung empfohlene

Menge an DNA sollte 10 ng- 3 µg betragen. Für die Markierung wurden 15 µl des aufgereinigten PCR-Produktes eingesetzt, wenn die erforderliche Menge an DNA in diesem Volumen erreicht wurde. Nach Erhitzen des PCR-Produktes für 10 min auf 100°C wurden 2 µl 10x Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP Labeling Mix und 1 µl Klenow Enzym zugegeben und für 20 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und Erhitzen auf 65°C für 10 min abgestoppt. Die Lagerung der Sonden erfolgte bei -20°C.

Dot-Blothybridisierung

Als Negativkontrolle wurde genomische DNA des *E. coli* Stammes C600 und als Positivkontrolle 50 ng unmarkiertes PCR-Produkt der jeweiligen Sonde verwendet. Es wurden jeweils 500 ng DNA auf eine Transfermembran (BiodyneA, 0,2 µm, Pall GmbH) aufgetragen und nach kurzem Trocknen an der Luft 5 min in Denaturierungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.7) geschwenkt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 10 min in Neutralisationspuffer (siehe Abschnitt 3.1.7) wurde die Membran 30 sec in 10-fach SSC (siehe Abschnitt 3.1.7) gewaschen und auf ein in 10-fach SSC getränktes Whatman-Papier (Whatman GmbH) überführt. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde sie für 3 min auf den Transilluminator (365 nm) gelegt. Anschließend wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre (Biometra) überführt und vorgewärmter Hybridisierungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.7; 20 ml/100 cm², 68°C) zugegeben. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Drehen für 1 h bei 68°C im Hybridisierungsinkubator (OV2, Biometra). Die Hybridisierungslösung wurde verworfen und das Hybridisierungs-Sonden-Gemisch zugegeben. Für die Herstellung des Hybridisierungs-Sonden-Gemischs wurden 6 µl der jeweiligen Sonde mit 44 µl sterilem deionisiertem Wasser für 5 min bei 95°C aufgekocht, kurz auf Eis abgekühlt und 4 ml auf 68°C vorgewärmter Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C unter ständigem Drehen im Hybridisierungsinkubator. Die Waschschrte und die Detektion erfolgten nach Angaben des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“-Protokolls der Firma Roche Diagnostics GmbH. Dabei wurden die verwendeten Mengen an Puffer für die jeweilige Größe der Membranen berechnet. Durch Zugabe der Farbsubstratlösung erfolgte die Detektion. Nach 1-5 h war ein Farbumschlag erkennbar und die Reaktion

wurde durch Waschen mit sterilem deion. Wasser für 5 min abgestoppt. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgte durch Fotografieren der Membran.

Koloniehybridisierung

Für das Verfahren der Koloniehybridisierung wurden die LB-Mediumplatten mit den zu untersuchenden Kolonien mindestens 30 min bei 4°C vorgekühlt. Anschließend wurde eine Nylonmembran (0,2 µm, Ø 80 mm, Pall GmbH) für 1 min auf die LB-Mediumplatten gelegt, um den Transfer von Koloniematerial auf die Membran zu ermöglichen. Um eine spätere Zuordnung der Signale zu den Ausgangskolonien auf der LB-Mediumplatte zu ermöglichen, wurde die Membran an einer Stelle eingeschnitten und die zugehörige Stelle an der LB-Mediumplatte markiert. Als Positivkontrolle wurden 50 ng unmarkiertes PCR-Produkt der jeweiligen Sonde auf den Rand der Membran aufgetropft. Nach kurzem Trocknen der Kontrolle wurde die Membran für 15 min mit der Kolonieseite nach oben auf ein mit Denaturierungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.7) getränktes Whatman-Papier gelegt. Anschließend wurde sie auf ein mit Neutralisierungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.7) getränktes Whatman-Papier überführt und für 5 min dort belassen. Nach einem kurzen Zwischenschritt auf einem mit 10-fach SSC (siehe Abschnitt 3.1.7) getränktem Whatman-Papier wurde die feuchte Membran für 3 min auf einen Transilluminator (365 nm) gelegt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Anschließend erfolgte die Entfernung der Zelltrümmer durch Inkubation der Membran in 3-fach SSC, 0,1% SDS in einer Hybridisierungsröhre für 50 min bei 68°C unter ständigem Drehen im Hybridisierungsinkubator. Nach kurzem Waschen in sterilem deion. Wasser wurde die Membran in eine neue, mit Ethanol gespülte Hybridisierungsröhre überführt und für 60 min mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.7) bei 68°C im Hybridisierungsinkubator unter ständigem Drehen prähybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde verworfen und das Hybridisierungs-Sonden-Gemisch zu der Membran gegeben. Für die Herstellung des Hybridisierungs-Sonden-Gemischs wurden 6 µl der jeweiligen Sonde mit 44 µl sterilem deion. Wasser für 5 min bei 95°C aufgekocht, kurz auf Eis abgekühlt und 10 ml auf 68°C vorgewärmter Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C unter ständigem Drehen im Hybridisierungsinkubator. Die Waschschrirte, die Detektion und die Dokumentation erfolgten wie oben beschrieben.

3.4 Keimreduziertes Rinderhackfleisch

Das für die Versuche verwendete, keimreduzierte Rinderhackfleisch wurde im Fachbereich Fleischtechnologie am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim hergestellt. Die für die Herstellung des Hackfleisches aus einem Stück Rindfleisch (Kernbug bzw. Schulter-Oberschale) verwendeten Hilfsmittel wurden vor Verwendung mit 70% (v/v) Ethanol sterilisiert, um das Einbringen von zusätzlichen Mikroorganismen zu verhindern. Nach Entfernen der äußeren, Keim-belasteten Schicht des Fleisches wurde das Kernstück in einem desinfizierten Fleischwolf zerkleinert. Das so entstandene Hackfleisch wurde direkt in 18 g (+/- 0,05 g) Portionen aufgeteilt und in Aluminiumfolie bei -20°C gelagert.

3.4.1 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl

Um die aerobe Gesamtkeimzahl im verwendeten Hackfleisch vor Versuchsbeginn zu bestimmen, wurden zwei 18 g-Portionen über Nacht bei 4°C aufgetaut und jeweils mit 80 ml PBS in einem Rotilabo-Homogenisierbeutel mit Seitenfilter (Roth) versetzt. Das Homogenisieren (Stomacher 400 circulator, Seward) erfolgte für 2 min bei 230 rpm. Danach wurde das durch die Membran von dem Homogenisat abgetrennte Filtrat, das die aus dem Hackfleisch gelösten Bakterien enthielt, entnommen und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurden 100 µl und 1000 µl des Filtrats mit Hilfe steriler Spatel in einer Doppelbestimmung auf LB- und SMAC-Medium ausplattiert. Nach einer Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht konnten die Kolonien ausgezählt und die unter aeroben Bedingungen gewachsenen Kolonie-bildenden Einheiten pro g (KbE/g) Hackfleisch bestimmt werden.

3.4.2 Nachweis von STEC in keimreduziertem Rinderhackfleisch

Die Überprüfung des Hackfleisches auf enthaltene STEC erfolgte anhand des „Horizontalen Verfahrens für den Nachweis von *E. coli* O157 in Lebensmitteln“ [Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG)", Beuth Verlag, modifiziert].

Hierfür wurde im Dreifachansatz eine 18 g-Portion des Hackfleisches über Nacht bei 4°C aufgetaut und anschließend in einem Rotabilo Homogenisierbeutel mit Seitenfilter (Roth) mit 162 ml mTSB und Novobiocin (20 mg/l mTSB) versetzt. Nach Homogenisieren für 2 min bei 230 rpm wurde das Homogenisat in einen 500 ml Weithals-Erlenmeyerkolben überführt und die Anreicherung für 6 h bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Für die Positiv- und Negativkontrolle wurden vor dem Homogenisieren ca. 1-5 KbE/g Hackfleisch *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 bzw. *E. coli* C600 zugegeben. Nach der Anreicherung wurden jeweils 10 ml der Kulturen entnommen und für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1,5 ml mTSB aufgenommen, 150 µl davon auf SMAC- und LB-Medium ausplattiert und für 24 bzw. 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch Abstreichen der Platten mit einem sterilen Wattestäbchen und Einreiben der Bakterien in 1 ml sterile 0,9%iger NaCl-Lösung eine Bakterienlösung hergestellt. 50 µl der Lösung wurden 1:10 in sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser verdünnt und eine Standard-PCR mit den Oligonukleotidpaaren KS7/KS8 (*stx*_{1B}) und LP43/LP44 (*stx*_{2A}) aus der Tabelle A5 durchgeführt.

3.5 *In vivo*-Expressionstechnologie (IVET)

3.5.1 Selektion eines Nalidixinsäure-resistenten *E.coli*-Stammes

Für die Durchführung der IVET in der Matrix Rinderhackfleisch war ein *E. coli*-Stamm notwendig, der eine Antibiotikaresistenz besitzt. Mit Hilfe dieser Resistenz sollte der Laborstamm von der im Hackfleisch autochthonen Mikrobiota abgegrenzt werden. Der in den vorliegenden Versuchen verwendete *E. coli*-Laborstamm HB101 wurde dem Antibiotikum Nalidixinsäure ausgesetzt, um eine spontane Resistenz

aufgrund des auf die Zelle einwirkenden Selektionsdrucks zu erzielen. Dies erfolgte beginnend mit 5 µg Antibiotikum pro ml LB-Medium bis hin zu 20 µg Antibiotikum pro ml LB-Medium [nach Schmidt *et al.*, 1999, modifiziert]. Hierbei erfolgte die Kultivierung der Bakterien abwechselnd in Flüssigkultur und auf festem Medium. Abschließend wurde die erhaltene Mutante zwei bis drei Mal auf festem LB-Medium mit einer Nalidixinsäure-Konzentration von 20 µg/ml LB-Medium passagiert.

3.5.2 Konstruktion des Promotor-Selektionsvektors pAK-1

Der Austausch der Resistenz im Vektor pKK232-8 erfolgte durch die Amplifikation des Aminoglykosidphosphotransferase (*aphII*)-Gens aus dem Vektor pK18, das die Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, mit Hilfe des Oligonukleotidpaars kan-for/kan-rev (siehe Tabelle A4.4) in einer Standard-PCR (siehe Abschnitt 3.3.9). Das PCR-Produkt wurde mit HindIII und PglI inkubiert (siehe Abschnitt 3.3.4), einer Ethanol-fällung unterzogen (siehe Abschnitt 3.3.6), in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser aufgenommen und abschließend die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3). Der Vektor pKK232-8 wurde parallel hierzu mit den beiden Restriktionsendonukleasen HindIII und NcoI inkubiert, ebenfalls einer Ethanol-fällung unterzogen, in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Nach erfolgter Ligation (siehe Abschnitt 3.3.7) und Ethanol-fällung (siehe Abschnitt 3.3.6) wurde die DNA in 20 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser gelöst. Der *E. coli* Stamm HB101 Nal^R wurde abschließend mit der Plasmid-DNA aus der Ligation elektrotransformiert (siehe Abschnitt 3.3.8). Durch Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.3.10) wurde die Insertion und die Sequenz des Resistenzgens in dem neuen Vektor, benannt als pAK-1, überprüft. Das Kanamycinresistenz-vermittelnde Gen *aphII* wird in dieser Arbeit mit *kan* bezeichnet.

3.5.3 Überprüfung der IVET-Systeme basierend auf pKK232-8 und pAK-1

Die Klonierung des Laktose (lac)-Promotors aus dem Vektor pK18 in die „multiple cloning site“ (mcs) der Vektoren erfolgte durch Hydrolyse des Vektors pK18 mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI (siehe Abschnitt 3.3.4). Nach Auftrennung der Fragmente in einer Agarosegelelektrophorese (1%, 130 V, 1 h) wurde das entsprechende DNA-Fragment aus der Gelmatrix extrahiert (siehe Abschnitt 3.3.6), in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert und abschließend die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3). Der Vektor pKK232-8 bzw. pAK-1 wurde mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisiert (siehe Abschnitt 3.3.4), mittels SAP dephosphoryliert (siehe Abschnitt 3.3.7), durch eine Ethanol-fällung aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.3.6), in 30µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen und zum Schluss die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3). Nach der Ligation der beiden Vektoren mit dem Fragment aus pK18 (siehe Abschnitt 3.3.7) wurde die DNA durch eine Ethanol-fällung aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.3.6), in 20 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen und der *E.coli* Stamm HB101 NaI^R mit den Plasmiden aus der Ligation elektrotransformiert (siehe Abschnitt 3.3.8). Für die Selektion der gewünschten Klone nach der Elektrotransformation wurde LB-Medium verwendet, das neben den Antibiotika Ampicillin und Nalidixinsäure auch Chloramphenicol bzw. Kanamycin enthielt, um die Expression des Selektionsgens nachweisen zu können. Die entstandenen Plasmide wurden mit pKK-L und pAK-L bezeichnet.

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden Übernachtskulturen von *E. coli* HB101 NaI^R/ pKK232-8, pKK-L, pAK-1 bzw. pAK-L in 50 ml frischem LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,05 verdünnt. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen für 24 h. Nach 2 h wurde das Chloramphenicol bzw. Kanamycin zu den entsprechenden Kulturen zugegeben. Zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 8 und 24 h wurde die optische Dichte bei 600 nm und die Lebendzellzahl der Kultur bestimmt. Hierzu wurden 100 µl der Kultur abgenommen, eine Verdünnungsreihe in PBS erstellt und geeignete Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung auf LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure ausplattiert. Nach der Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht konnten die Kolonien ausgezählt und die Kolonie-

bildenden Einheiten (KbE) pro ml Kultur bestimmt werden. Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Um die Funktionalität der Vektoren pKK232-8 und pAK-1 ebenfalls in der Matrix Hackfleisch zu bestätigen, wurden Übernachtskulturen der oben aufgeführten *E. coli*-Stämme in 50 ml frischem LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,05 verdünnt. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9. Eine 18 g-Portion des Hackfleisches wurde in einem Rotilabo-Homogenisierbeutel mit Seitenfilter (Roth) mit Ampicillin, Nalidixinsäure und Chloramphenicol bzw. Kanamycin in PBS (siehe Abschnitt 3.1.7) in einem Gesamtvolumen von 1 ml durch Homogenisieren für 30 sec bei 230 rpm (Stomacher 400 circulator, Seward) versetzt. Weiterhin wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Kulturen in PBS erstellt, um nach dem Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung und der Inkubation über Nacht die Lebendzellzahl der Kultur und somit die Bakterienanzahl, die zur Inokulation des Hackfleisches verwendet wurde, zu bestimmen. Die Inokulation der Stämme in das Hackfleisch erfolgte mit etwa 100 KbE/g durch Vermengen mit der Hand für 1 min. Die Inkubation des Hackfleisches erfolgte mit einer Schichtdicke von etwa 0,5 cm, um eine abweichende Kerntemperatur zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C wurden die Stämme durch Zugabe von 80 ml PBS und Homogenisieren bei 230 rpm für 2 min wieder aus dem Hackfleisch isoliert. 10 ml des Filtrats hinter dem Seitenfilter wurden aus dem Homogenisierbeutel entnommen und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Nach Erstellung einer seriellen Verdünnungsreihe in PBS wurden geeignete Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung auf LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure ausplattiert, die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die KbE/g Hackfleisch bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

3.5.4 Herstellung einer chromosomalen Genbank des Stammes EDL933

Für das IVET-System wurde eine Genbank des Stammes EDL933 in dem Promotor-Selektionsvektor pKK232-8 bzw. pAK-1 erstellt. Hierzu wurde die chromosomale DNA zunächst einem partiellen Verdau mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI unterzogen. Hierzu wurden 10 µg DNA mit 10 U des Enzyms, dem 10x Enzympuffer (Endkonzentration 1x) und sterilem Wasser in einem Volumen von 50 µl gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Reaktionsgemisch 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Nach Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarosegel bei 130 V für 1 h, wurden die gewünschten Fragmente zwischen 0,5 und 1 kb aus der Gelmatrix extrahiert (siehe Abschnitt 3.3.6). Die chromosomalen DNA-Fragmente wurden in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser eluiert und abschließend die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3).

Für die anschließende Klonierung der chromosomalen DNA-Fragmente in den entsprechenden Vektor wurden 1,5 µg des Plasmids mit 5 U der Restriktionsendonuklease BamHI, dem 10x Enzympuffer (Endkonzentration 1x) und sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser in einem Volumen von 40 µl für 2 h bei 37°C inkubiert, um eine Linearisierung des Plasmids zu erhalten. Anschließend wurde für die Dephosphorylierung des linearisierten Plasmids zur Vermeidung von Religanten in der Ligation 10 U Shrimp Alkaline Phosphatase und der zugehörige 10x Enzympuffer (Endkonzentration 1x) zugegeben und mit sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 1 h wurde der Ansatz für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Um den Ansatz aufzureinigen, schloss sich eine Ethanol-fällung an. Die gefällte DNA wurde in 30 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser gelöst und die Konzentration mit dem Photometer bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3).

Der mit BamHI linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde mit den chromosomalen Sau3AI-Fragmenten des Stammes EDL933 in einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 gemischt und inkubiert. Hierzu wurden 100 ng Vektor, 300 ng EDL933-Fragmente, 5 U T4-DNA-Ligase und der entsprechende 10x Puffer (Endkonzentration 1x) mit sterilem Wasser in einem Volumen von 25 µl 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor der Elektrotransformation wurden durch eine Ethanol-fällung die Ligationsansätze von der Ligase und dem Ligasepuffer gereinigt, um bekannte negative Auswirkungen bei der Transformation zu verhindern (siehe Abschnitt 3.3.6). Die gefällte DNA wurde anschließend in 20 µl sterilem DNase- und RNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen. Für die Erstellung der Gen-bank wurde der Ligationsansatz geteilt und zwei Aliquots der kompetenten Zellen für die Elektrotransformation verwendet (siehe Abschnitt 3.3.8).

3.5.5 Verwendung der IVET-Systeme im Rinderhackfleisch

Für die Durchführung des IVET-Systems im Rinderhackfleisch wurde eine 18 g-Portion des keimreduzierten Hackfleisches aufgetaut und mit 100 µg/g Ampicillin, 20 µg/g Nalidixinsäure und 80 µg/g Chloramphenicol in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS (siehe Abschnitt 3.1.7) durch Homogenisieren bei 230 rpm für 30 sec (Stomacher 400 circulator, Seward) in einem Rotilabo-Homogenisierbeutel mit Seitenfilter (Roth) vermengt. Weiterhin wurde ein Aliquot der Genbank von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 in dem entsprechenden Promotor-Selektionsvektor aufgetaut, in 50 ml flüssiges LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml Nalidixinsäure gegeben und für 1 h stehend bei 37°C zur Erholung der Zellen inkubiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von etwa 1 h bei 37°C und 180 rpm wurde eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 erreicht. 50 µl der Kultur wurden abgenommen und mit 950 µl PBS versetzt. Für das IVET-System basierend auf dem Vektor pKK232-8 wurde für die Inokulation des Hackfleisches keine weitere Flüssigkeit verwendet. Für das IVET-System basierend auf dem Vektor pAK-1 wurden weitere 10 ml PBS für die Inokulation zugegeben. Die Inokulation des Hackfleisches erfolgte durch ein Vermengen mit der Hand für 1 min. Weiterhin wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Kultur in PBS erstellt, um nach dem Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung die Lebendkeimzahl der Kultur und somit die Bakterienanzahl, die zur Inokulation des Hackfleisches verwendet wurde, zu bestimmen. Die Inkubation des inokulierten Hackfleisches erfolgte unter aeroben Bedingungen für 5 bzw. 10 h bei 42°C und einer Schichtdicke von etwa 0,5 cm, um eine abweichende Kerntemperatur zu verhindern. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 80 ml PBS im Falle der IVET mit pKK232-8 bzw. 20 ml PBS im Falle der IVET

mit pAK-1 und Homogenisieren bei 230 rpm für 2 min wieder aus dem Hackfleisch isoliert. Hierfür wurde nach dem Homogenisieren 10 ml des Filtrats hinter dem Seitenfilter aus dem Homogenisierbeutel entnommen und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Nach Erstellung einer seriellen Verdünnungsreihe in PBS wurden geeignete Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung auf LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure ausplattiert, die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die KbE/g bestimmt. Die geeigneten Verdünnungsstufen, die etwa 200-300 Einzelkolonien pro Platte ergaben, wurden 80-fach ausplattiert.

Für die Identifizierung und Selektion von *in vitro*-aktiven Promotoren wurden mit Hilfe von sterilen Zahnstochern die erhaltenen Einzelkolonien parallel auf LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure bzw. Ampicillin, Nalidixinsäure und Chloramphenicol ausgestrichen. Dies erfolgte mit Hilfe eines Rasters, um die entsprechend parallel ausgestrichenen Kolonien zuordnen zu können. Es wurde die Anzahl an Einzelkolonien überprüft, die notwendig war, um mit etwa 1×10^4 KbE/g *in vitro*-sensitiver Klone weiterarbeiten zu können. Nach einer Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden alle *in vitro* Chloramphenicol-resistenten Kolonien ausselektiert. Dies erfolgte durch das Einreiben der *in vitro* Chloramphenicol-sensitiven Kolonien in LB-Flüssigmedium und Zentrifugation bei 6.000 rpm für 5 min. Nach Lösen des Bakterienpellets in 1 ml sterilem 10% (v/v) Glycerin wurden 300 µl-Aliquots bei -80°C gelagert. Ein Aliquot der vereinigten Kolonien wurde für die erneute Inokulation einer weiteren Hackfleischportion und deren Inkubation unter denselben Voraussetzungen verwendet. Insgesamt wurden drei von den hier beschriebenen Selektionsrunden durchgeführt. Nach der dritten Runde wurden 1.000 Einzelkolonien auf LB-Medium mit den oben beschriebenen Antibiotika ausgestrichen und für die Isolierung der enthaltenen Plasmide verwendet.

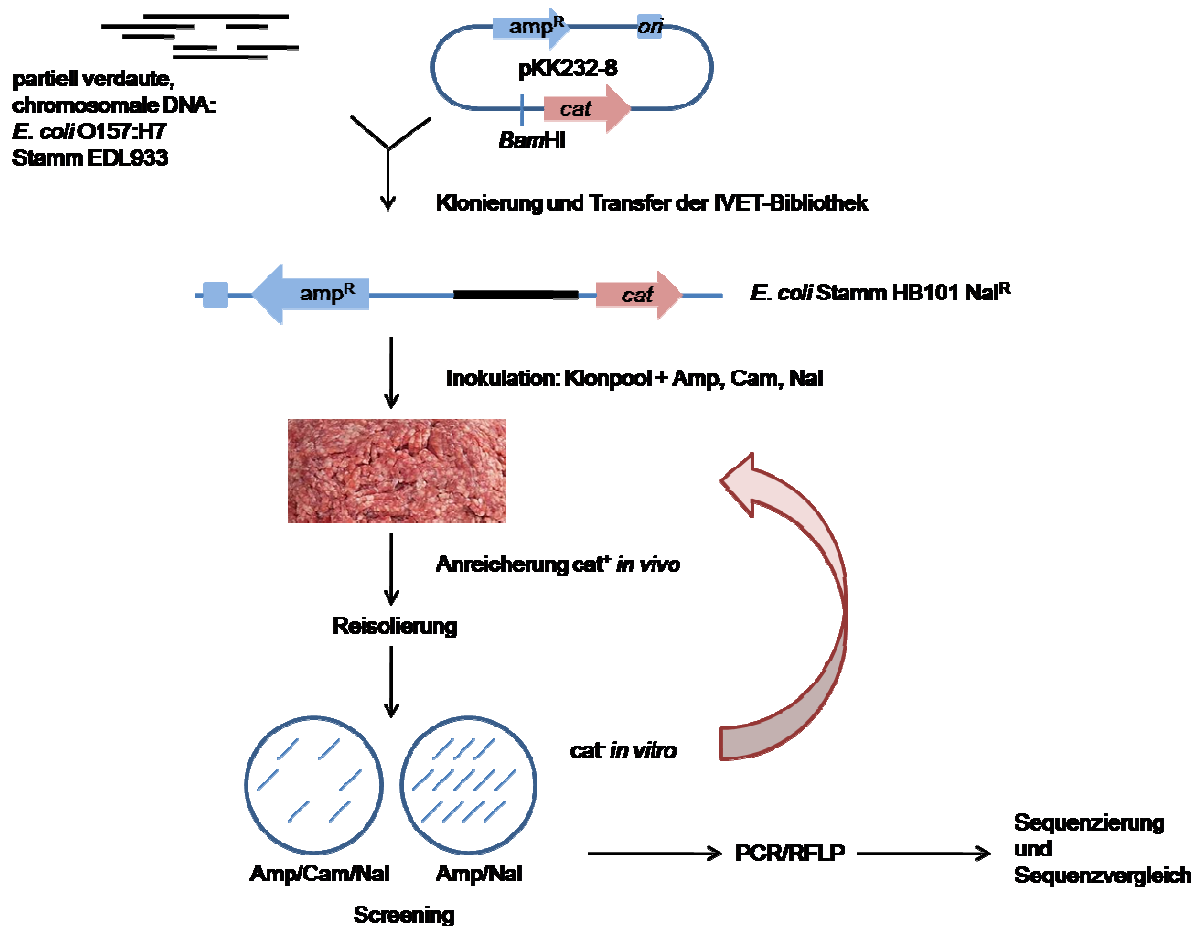


Abbildung 3.1: Darstellung des IVET-Systems in Rinderhackfleisch am Beispiel des Vektors pKK232-8: Die Genbank des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 wurde in eine Nalidixinsäure-resistente Mutante des *E. coli* Stammes HB101 transferiert. Die Anreicherung erfolgte in keimreduziertem Rinderhackfleisch. *In vitro* Chloramphenicol-sensitive Klone wurden wiederholt für die Inokulation des Hackfleisches verwendet.

3.5.6 DNA-Sequenzanalyse der inserierten EDL933-DNA-Fragmente in den *ivi*-Plasmiden

Für die Analyse der inserierten EDL933-Fragmente in den rekombinanten Plasmiden nach der letzten Anreicherung während des IVET-Systems im keimreduzierten Rinderhackfleisch wurden diese isoliert (siehe Abschnitt 3.3.1) und in einer Standard-PCR (siehe Abschnitt 3.3.9) mit dem Oligonukleotidpaar pKK232-8-for/SP1 bzw. pKK232-8/SP2 (siehe Tabelle A4.4) als Template-DNA verwendet. Es wurden folgende Bedingungen für die PCR verwendet: Der erste Schritt erfolgte 5 min bei

94°C, dann wurden 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt (30 sec, 94°C), einem Annealingschritt (60 sec, 53°C) und einem Elongationsschritt (72°C, 90 sec) durchgeführt. Beendet wurde die PCR mit einem Elongationsschritt von 5 min bei 72°C. Die Größe des entstandenen PCR-Produkts wurde in einer Agarosegelelektrophorese (2%, 130 V, 1,5 h) abgeschätzt. Nach Einteilung der PCR-Produkte basierend auf der abgeschätzten Größe wurden die Produkte gleicher Größe durch einen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (siehe Abschnitt 3.3.5) miteinander verglichen. PCR-Produkte mit einem identischen Restriktionsmuster nach erfolgter Agarosegelelektrophorese (2%, 130 V, 1,5 h) wurden als gleich angenommen. Die Plasmide, die den Produkten entsprachen, wurden erneut isoliert (siehe Abschnitt 3.3.1) und für die Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.3.10) mit dem Oligonukleotid SP1 bzw. SP2 verwendet. Die entstandene Sequenz wurde ausgewertet (siehe Abschnitt 3.3.10) und durch einen Vergleich mit dem Genom von *E. coli* Stamm K12 in der Internet-Datenbank EcoCyc [Keseler *et al.*, 2009] auf enthaltene Promotoren untersucht.

3.6 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen in Rinderhackfleisch

Für das Wachstum verschiedener EHEC/EPEC/STEC-Isolate in Rinderhackfleisch wurde in Dreifachbestimmung eine 18g-Portion des keimreduzierten Hackfleisches (siehe Abschnitt 3.4) aufgetaut und mit den entsprechenden Stämmen beimpft. Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme wurden in 50 ml frischem LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9 unter Standardbedingungen inkubiert und mit etwa 100 KbE/g in einem Gesamtvolumen von 2 ml PBS durch Vermengen mit der Hand für etwa 1 min in das Hackfleisch in einem Rotilabo-Homogenisierbeutel mit Seitenfilter (Roth) inokuliert. Die Inkubation des Hackfleisches erfolgte mit einer Schichtdicke von etwa 0,5 cm, um eine abweichende Kerntemperatur zu verhindern, und für 5 h bei 37°C, 48 h bei 15°C und 48 h bei 20°C. Es wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Kultur in PBS erstellt, um nach dem Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung auf LB-Medium und der Inkubation über Nacht die Lebendzellzahl der Kultur und somit die Bakterienanzahl, die zur Inokulation des Hackfleisches verwendet wurde, zu bestimmen. Die Isolierung der Bakterien aus dem Hackfleisch erfolgte durch Zugabe

von 80 ml PBS und Homogenisieren bei 230 rpm für 2 min (Stomacher 400 circulator, Seward). 10 ml des Filtrats hinter dem Seitenfilter wurde aus dem Homogenisierbeutel entnommen und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Nach Erstellung einer seriellen Verdünnungsreihe in PBS wurden geeignete Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung auf LB-Medium ausplattiert, die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die Kb E/g bestimmt. Daraufhin wurden die Platten einer Verdünnungsstufe ausgewählt, deren Kolonieanzahl zwischen 30 und 300 lagen. Diese Kolonien wurden mit Hilfe eines festgelegten Rasters auf frisches LB-Medium überimpft und 10-15 h bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte mit Hilfe einer Kolonie-Hybridisierung (siehe Abschnitt 3.3.11) bestimmt werden, welche Kolonien dem eingesetzten *E. coli*-Stamm zugeordnet werden konnten. Die Wachstumsversuche wurden mindestens drei Mal durchgeführt.

3.7 Statistische Methoden

Die Daten aus den durchgeführten Versuchen wurden als arithmetische Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Die Berechnung aller Werte erfolgte mit Hilfe von Excel (MS Office 2007).

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde der zweiseitige Student's t-test für unabhängige Proben herangezogen. Als signifikant gilt ein p-Wert < 0,05. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit der Überschreitung der berechneten Statistik basierend auf den erlangten Ergebnissen unter 5%.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer *In vivo*-Expressionstechnologie für *E. coli* in der Matrix Rinderhackfleisch

Da bislang nur wenig über die Genexpression der STEC im Lebensmittel bekannt war und die Stämme über zahlreiche Gene mit bislang unbekannter Funktion verfügen, sollten in dieser Arbeit Persistenz-, Stress- und Virulenz-assoziierte Gene des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 identifiziert werden, die während der Persistenz und der Vermehrung der pathogenen Bakterien im Risikolebensmittel Rinderhackfleisch exprimiert werden. Die Erforschung dieses Zoonoseerregers während seiner Übertragung durch Lebensmittel vom Tier auf den Menschen ist ein wichtiges Anliegen zukünftiger Forschungsarbeiten [Dudley, 2008]. Dabei ist die Methode der IVET eine vielversprechende Technik, um dieses Ziel erreichen zu können. Die Etablierung eines IVET-Systems für *E. coli* in der Matrix Rinderhackfleisch unter Verwendung einer Antibiotikaresistenz als Reporter für die Genexpression erfolgte basierend auf dem Promotor-Selektionsvektor pKK232-8 mit einer promotorlosen Chloramphenicolresistenz (siehe Abbildung 2.1).

4.1.1 Überprüfung des IVET- Systems basierend auf pKK232-8 *in vitro*

Nach Klonierung eines aktiven Promotors stromaufwärts in die „multiple-cloning-site“ (mcs) vor das Selektionsgen eines Promotor-Selektionsvektors, wird dieses exprimiert, und die Zellen können sich in Anwesenheit des selektiv wirkenden Stoffes vermehren. Um die Funktionalität des hier gewählten Systems vor dem Einsatz in der Matrix Hackfleisch *in vitro* überprüfen zu können, wurde der Promotor des Laktose (lac)-Operons aus dem Vektor pK18 in die mcs des Vektors pKK232-8, wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, eingefügt. Das rekombinante Plasmid mit einer Größe von 6.037 bp wurde mit pKK-L bezeichnet. Der in dieser Arbeit erstellte Nalidixinsäure-resistente (Nal^R) *E. coli* Laborstamm HB101 (siehe Abschnitt 3.5.1), der eine schnelle Selektion der Mutante auf LB-Medium mit Nalidixinsäure zulässt, wurde anschließend mit den beiden Plasmiden pKK232-8 und pKK-L transformiert. Ein Ausstrich der erhaltenen Stämme auf LB-Medium mit Chloramphenicol ergab,

dass der Stamm HB101 NaI^R/pKK232-8 nicht resistent war. Das Plasmid pKK-L vermittelte die Resistenz durch Expression der Chloramphenicolresistenz und ein Wachstum des Stammes *E. coli* HB101 NaI^R/pKK-L auf LB-Medium mit Chloramphenicol war gegeben. Daraufhin wurde der Einfluss von verschiedenen Chloramphenicolkonzentrationen auf das Wachstum der Stämme wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben, untersucht. Hiermit sollte gezeigt werden, ob sich innerhalb der gewählten Inkubationszeit eine spontane Resistenz gegen Chloramphenicol bilden konnte. Hierzu wurden Übernachtkulturen der beiden Stämme in frischem LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure verdünnt und unter Standardbedingungen inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe des Chloramphenicols in der für Medien verwendeten Standardkonzentration von 20 µg/ml und der vierfachen Menge von 80 µg/ml, um den Effekt einer höheren Konzentration zu untersuchen. Parallel hierzu diente der *E. coli* Stamm HB101 NaI^R/pKK232-8 als Referenz, die ohne Zugabe des Chloramphenicols zum Vergleich mitgeführt wurde. Die optische Dichte und die Lebendkeimzahl, ermittelt als koloniebildende Einheiten pro ml Kultur (KbE/ml), wurden in zweistündigem Abstand bis zum Zeitpunkt nach acht Stunden bestimmt. Eine abschließende Bestimmung erfolgte nach 24 Stunden. Die daraus resultierenden Wachstumskurven sind in der Abbildung 4.1 und die Daten im Anhang Tabelle A2.1 dargestellt. In der Abbildung 4.1 sind die ermittelten Lebendkeimzahlen (y-Achse) und die OD₆₀₀-Werte (sekundäre y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen. Bereits zwei Stunden nach Zugabe beider Konzentrationen des Chloramphenicols konnte die bakteriostatische Wirkung durch ein Stagnieren der optischen Dichte und der Lebendkeimzahl in der Kultur HB101 NaI^R/pKK232-8 festgestellt werden. Bei einer Chloramphenicolkonzentration von 20 µg/ml konnte zum Zeitpunkt 24 Stunden jedoch ein Anstieg der optischen Dichte und der Lebendkeimzahl dieser Kultur beobachtet werden. Dieser Effekt war nach Zugabe von 80 µg/ml des Antibiotikums nicht zu erkennen. Hier stagnierte das Wachstum über den gesamten Zeitraum der Messung. Im Gegensatz hierzu zeigte die Kultur HB101 NaI^R/pKK-L nach Zugabe des Chloramphenicols ein vergleichbares Wachstum wie die Referenz ohne Zugabe des Antibiotikums. Hier fand keine Hemmung des Bakterienwachstums statt. In beiden Kulturen erfolgte das Bakterienwachstum über die exponentielle bis hin zur stationären Phase. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass der Vektor pKK232-8 nach Insertion eines aktiven Promotors in die „multiple cloning site“ stromaufwärts vor das Selektionsgen eine

Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol vermitteln kann. Eine Expression der Resistenz ohne Insertion eines Promotors war nicht möglich. Weiterhin hat sich eine Konzentration von 20 µg/ml Chloramphenicol als nachteilig erwiesen, da bei der Inkubation über einen längeren Zeitraum ein Anstieg der Lebendkeimzahl nachgewiesen werden konnte. Die Erhöhung der Chloramphenicolkonzentration führte während des hier gewählten Zeitraums zu einem stärkeren inhibitorischen Effekt.

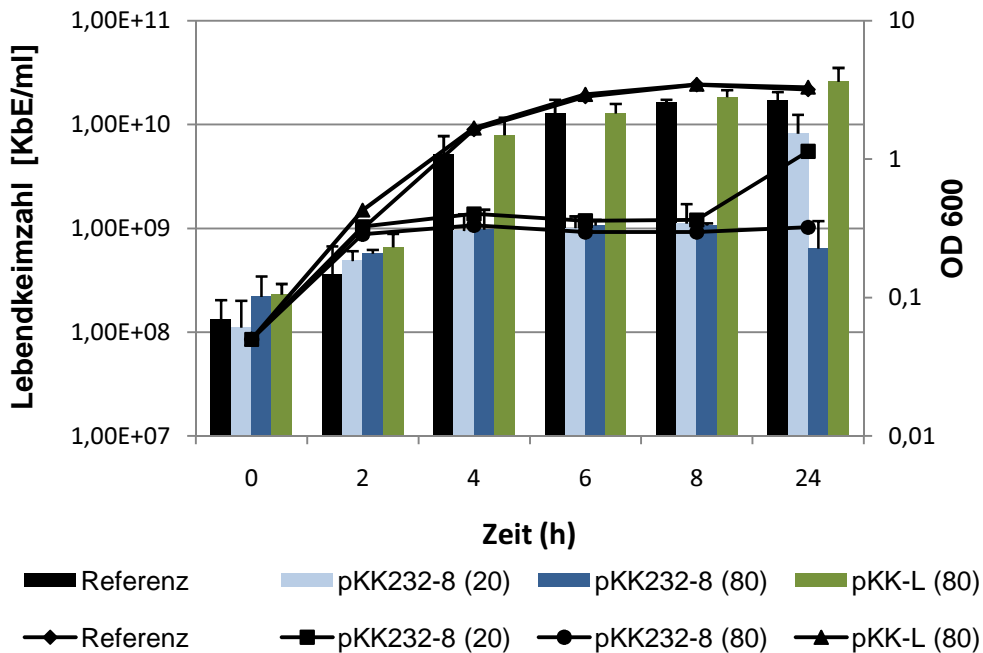


Abbildung 4.1: Wachstumskurven in LB-Medium mit Bestimmung der optischen Dichte und der Lebendkeimzahl [KbE/g] der *E. coli* Stämme HB101 $\text{NaI}^R/\text{pKK232-8}$ und HB101 $\text{NaI}^R/\text{pKK-L}$ nach Zugabe von 20 bzw. 80 µg/ml Chloramphenicol. Die ermittelten Lebendkeimzahlen sind mit farbigen Balken und die OD_{600} -Werte durch Linien mit Symbolen dargestellt. Die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen sind durch Balken gekennzeichnet. Referenz: *E. coli* Stamm HB101 $\text{NaI}^R/ \text{pKK232-8}$ ohne Zugabe von Chloramphenicol.

4.1.2 Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pKK232-8 *in vivo*

Nachdem die Funktionalität des Vektors pKK232-8 im LB-Medium bestätigt werden konnte, war für die in dieser Arbeit angestrebten Anwendung der Methode *in vivo* im Weiteren erforderlich, dass die Funktion des IVET-Systems auch in der Matrix Hackfleisch abgeklärt wurde. Das keimreduzierte Rinderhackfleisch (siehe Abschnitt 3.4) wurde vor Versuchsbeginn auf die enthaltene mesophile aerobe Gesamtkeimzahl untersucht (siehe Abschnitt 3.4.1). Diese betrug $8,9 \times 10^2$ KbE/g Hackfleisch, wobei keine Keime auf dem SMAC-Agar nachgewiesen werden konnten. Dies wies auf die Abwesenheit von Vertretern der von Enterobacteriaceae hin. Für alle weiteren Versuche, die mit dem IVET-System in Zusammenhang standen, wurde diese Hackfleisch-Charge verwendet.

Übernachtskulturen der bereits im vorigen Versuch verwendeten Stämme wurden in frischem LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure verdünnt und bis zu einer OD_{600} von etwa 0,8 unter Standardbedingungen inkubiert. 100 ± 5 KbE/g wurden anschließend für die Inokulation der 18 g-Portionen des keimreduzierten Hackfleisches eingesetzt. Nach der Inkubation des inokulierten und mit Ampicillin, Nalidixinsäure und Chloramphenicol versetzten Hackfleisches für fünf Stunden bei 37°C , wurden die Bakterien aus dem Hackfleisch isoliert (siehe Abschnitt 3.5.5). Aus den Werten der Inokulation und Reisolierung konnte das relative Wachstum bestimmt werden (Quotient aus der Reisolierung und dem entsprechenden Wert der Inokulation). Zum Vergleich wurde wiederum die Referenz HB101 $\text{Nal}^R/\text{pKK232-8}$ ohne Zugabe von Chloramphenicol mitgeführt. Die zugehörigen Daten sind in der Abbildung 4.2 und im Anhang Tabelle A2.2 dargestellt. In Abbildung 4.2 fällt auf, dass die Referenz ein um den Faktor 5,3 erhöhtes, relatives Wachstum im Gegensatz zu dem Stamm HB101 $\text{Nal}^R/\text{pKK232-8}$ in dem mit Chloramphenicol behandelten Hackfleisch zeigte. Das Wachstum des Stammes HB101 $\text{Nal}^R/\text{pKK232-8}$ wurde, wie zuvor in LB-Medium gezeigt, durch das Antibiotikum gehemmt. Eine Vermehrung der Zellen in Anwesenheit des Chloramphenicols konnte jedoch verzeichnet werden, so dass die bakteriostatische Wirkung auf die Zellen schwächer als im Medium war. Weiterhin fiel auf, dass der Stamm HB101 $\text{Nal}^R/\text{pKK-L}$ ein um den Faktor 4,8 erhöhtes relatives Wachstum im Vergleich zur Referenz zeigte. Hier konnte ein stärkeres Wachstum der Zellen im Hackfleisch detektiert werden. Der

Vektor pKK-L mit inseriertem, aktivem Promotor konnte somit ein Wachstum im Hackfleisch unter Anwesenheit des Chloramphenicols vermitteln. Insgesamt konnte in den durchgeführten Vorversuchen in Medium und in Hackfleisch die Funktionalität des IVET-Systems bestätigt werden. Die Chloramphenicolresistenz wurde erst nach Einfügen eines aktiven Promotors in die „multiple cloning site“ durch das Plasmid vermittelt.

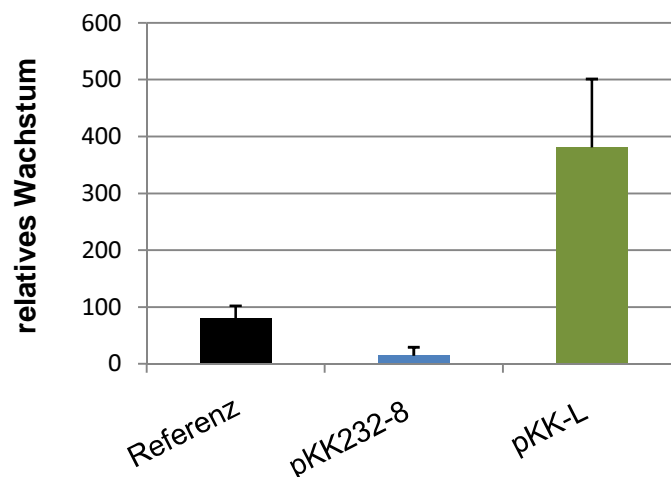


Abbildung 4.2: Relatives Wachstum der *E. coli* Stämme HB101 NaI^R/pKK232-8 und HB101 NaI^R/pKK-L unter Zugabe von 80 µg/g Chloramphenicol in Hackfleisch. Die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen sind durch Balken gekennzeichnet. Referenz: *E. coli* HB101 NaI^R/pKK232-8 ohne Zugabe von Chloramphenicol.

4.1.3 Herstellung einer chromosomalen Genbank des Stammes EDL933 in pKK232-8

Für den Einsatz des IVET-Systems in keimreduziertem Rinderhackfleisch wurde im Vorfeld eine Genbank der chromosomalen DNA von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 in dem Promotor-Selektionsvektor pKK232-8 erstellt (siehe Abschnitt 3.5.4). Zunächst mussten die optimalen Bedingungen für den partiellen Verdau mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI ermittelt werden. Die gewünschte Größe der Fragmente für die Klonierung betrug 0,5-1 kb. Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, wurde die optimale Inkubationsdauer auf 15 min festgelegt. Hier konnte der größte Anteil an Fragmenten mit dieser Größe erzielt werden. Anschließend wurde die mit

Sau3AI verdaute DNA in den mit BamHI linearisierten Vektor kloniert und der *E. coli* Stamm HB101 Nal^{R} mit den rekombinanten Plasmiden transformiert. Für die Bestimmung der durchschnittlichen Größe der inserierten Fragmente und den Anteil an Plasmiden mit inserierter DNA wurde ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen Sall und EcoRI durchgeführt. Die Genbank bestand aus etwa $4,6 \times 10^4$ Klonen, die ein inseriertes DNA-Fragment mit einer durchschnittlichen Größe von 0,7 kb trugen. Daraus folgte eine theoretisch 5,8-fache Wiederholung des EDL933-Genoms mit einer Größe von 5528 kb durch die erstellte Genbank. Durch einen Ausstrich von 400 zufällig gewählten Einzelkolonien der Genbank auf LB-Medium mit Chloramphenicol konnte der Anteil an *in vitro*-resistenten Klonen bestimmt werden. Dieser lag bei 24%.

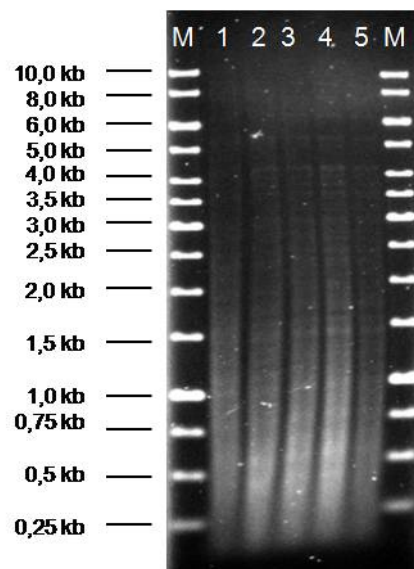


Abbildung 4.3: Partieller Verdau der chromosomalen DNA des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI unter Verwendung verschiedener Inkubationszeiten. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel bei einer Spannung von 30 V für 16 h. Das Anfärben erfolgte in Ethidiumbromid. M: 1 kb DNA-Ladder; 1: 3 min; 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 15 min; 5: 20 min.

4.1.4 Verwendung des IVET-Systems basierend auf pKK232-8 in Rinderhackfleisch

Zu Beginn der IVET wurde das keimreduzierte Rinderhackfleisch, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, mit Ampicillin, Chloramphenicol und Nalidixinsäure versetzt und mit 10^6 KbE/g der Genbank inokuliert. Die Anreicherung erfolgte für fünf Stunden bei 42°C . Nach der Inkubation im Hackfleisch konnten zwischen $1,2$ und $1,7 \times 10^7$ KbE/g aus dem Hackfleisch isoliert werden. Nach der Isolierung aus dem Hackfleisch wurden die erhaltenen Einzelkolonien parallel auf LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure und auf LB-Medium mit Ampicillin, Nalidixinsäure und Chloramphenicol ausgestrichen. In Abbildung 4.4 ist ein paralleler Ausstrich auf die aufgeführten Antibiotika zu sehen. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, konnten die *in vitro* Chloramphenicol-sensitiven Klone durch den parallel durchgeführten Ausstrich auf LB-Medium ohne Chloramphenicol für den weiteren Ablauf des Versuches erhalten bleiben. Die *in vitro* Chloramphenicol-sensitiven Klone wurden anschließend zusammen in eine weitere Anreicherung im Hackfleisch unter denselben Bedingungen eingesetzt. Eine Übersicht des Ablaufes des IVET-Systems ist in Abbildung 3.1 zu sehen. Die Daten der Inokulation und Isolierung nach Inkubation von den insgesamt drei durchgeführten Anreicherungen sind in der Tabelle 4.1 aufgeführt. Das Wachstum der Zellen zeigte hier in den drei Runden der Anreicherung bzw. Selektion im Hackfleisch kaum Unterschiede. Der zwischen den Anreicherungen durchgeführte Ausstrich der Kolonien parallel auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ist ebenfalls in Tabelle 4.1 dargestellt. Es wurde nach Isolierung der Zellen aus dem Hackfleisch jeweils die Anzahl an Einzelkolonien parallel auf LB-Medium mit und ohne Chloramphenicol getestet, die nötig war, um mit etwa 1×10^4 *in vitro*-sensitiven Klonen weiterarbeiten zu können. Wie aus der Tabelle 4.1 hervorgeht, hat der Anteil an *in vitro*-resistenten Klonen gegen das Antibiotikum Chloramphenicol nach der ersten Inkubation im Hackfleisch 24,1% betragen. Dies zeigte keinen Anstieg zu den ursprünglich 24% *in vitro*-resistenter Klone in der Genbank an. Dieser Anteil verringerte sich nach der zweiten Anreicherung auf 5,9% und abschließend auf 1,9%.

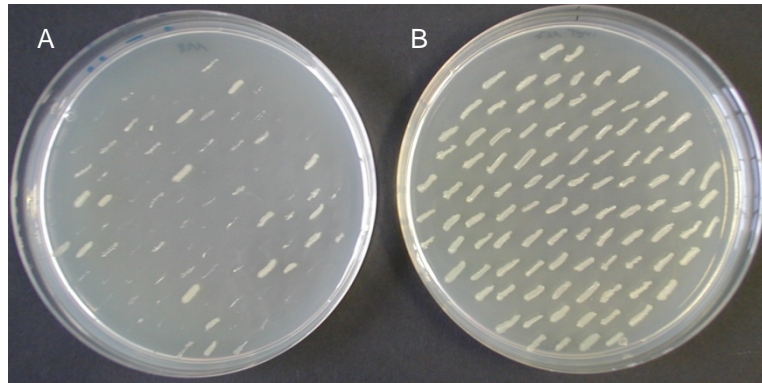


Abbildung 4.4: Paralleler Ausstrich am Beispiel von 100 Einzelkolonien nach der Isolierung der Genbank-Klone aus dem Hackfleisch auf LB-Medium mit und ohne Chloramphenicol. A) LB-Medium mit Chloramphenicol; B) LB-Medium ohne Chloramphenicol.

Tabelle 4.1: Anwendung des IVET-Systems basierend auf pKK232-8 in Hackfleisch: A) Daten zur Inokulation und Isolierung nach Inkubation der Genbank-Klone während der drei Anreicherungen im Hackfleisch; B) Paralleler Ausstrich der aus dem Hackfleisch isolierten Einzelkolonien der Genbank-Klone auf LB-Medium mit und ohne Chloramphenicol. Angabe des jeweiligen Anteils in Prozent in Klammern.

A

Anreicherung	Inokulation (KbE/g)	Isolierung (KbE/g)
1	$8,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$
2	$7,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
3	$4,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$

B

Anreicherung	Kolonien gesamt	Anteil Cam ^R	Anteil Cam ^S
1	13.621	3.279 (24,1)	10.342 (75,9)
2	11.021	654 (5,9)	10.367 (94,1)
3	1.000	19 (1,9)	981 (98,1)

Für die nachfolgende Amplifikation der inserierten EDL933-DNA wurden 500 Klone aus den insgesamt 1.000 Genbank-Klonen nach der dritten Anreicherung verwendet, um die rekombinanten Plasmide zu isolieren. Da zehn der 500 Klone *in vitro* Wachstum auf LB-Medium mit Chloramphenicol zeigten, wurden diese vernachlässigt und insgesamt 490 Klone für die Präparation der DNA herangezogen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend als template-DNA in eine Standard-PCR mit dem Oligonukleotidpaar pKK232-8-for/SP1 (siehe Tabelle A4.4) eingesetzt. Die Größe der PCR-Produkte wurde in einer Gelelektrophorese (2% Agarose, 130 V, 1,5 h) durch Vergleich mit dem 1kb-Ladder abgeschätzt. Eine Auflistung der Größe der PCR-Produkte ist in der Tabelle 4.2 dargestellt. Wie in der Tabelle zu erkennen ist, wurden Produkte mit einer Größe von 500 bis 1100 bp vermehrt gefunden. Die 250 in der Tabelle 4.2 aufgeführten PCR-Produkte mit einer Größe von 400 bis 1100 bp wurden einer RFLP mit der Restriktionsendonuklease BsuRI unterzogen (siehe Abschnitt 3.3.5). Unverdaute Produkte wurden in eine weitere RFLP mit der Restriktionsendonuklease Sau3AI eingesetzt. Brachte die RFLP gleiche Bandenmuster nach erfolgter Agarosegelelektrophorese hervor, so konnte vermutet werden, dass es sich um dieselbe inserierte chromosomale DNA-Sequenz handelte. In Abbildung 4.9 ist ein Beispiel für eine RFLP der PCR-Produkte dargestellt. Es konnte ein Bandenmuster vier Mal, ein Muster drei Mal und sieben Muster zwei Mal gefunden werden. Drei weitere Plasmide, dessen Muster lediglich ein Mal vorlag, wurden zufällig für die Sequenzierung ausgewählt.

Tabelle 4.2: Amplifikation der inserierten EDL933-DNA in den *ivi*-Plasmiden basierend auf pKK232-8. Angegeben ist die in einer Elektrophorese abgeschätzte Größe und die Anzahl der erhaltenen PCR-Produkte.

Größe der PCR-Produkte (bp)	Anzahl der PCR-Produkte
<200	15
200-350	50
400-550	60
600-750	107
800-950	57
1000-1100	26
1200-1300	17
>1300	23

4.1.5 DNA-Sequenzanalyse der inserierten Sequenzen in den *ivi*-Plasmiden basierend auf pKK232-8

Die in Abschnitt 4.1.4 ausgewählten 24 rekombinanten Plasmide wurden erneut isoliert mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ und für die Sequenzierung mit dem Oligonukleotid SP1 verwendet. Konnte die inserierte DNA-Sequenz nicht komplett ermittelt werden, so wurde von der mit SP1 erhaltenen Sequenz ausgehend ein neues Oligonukleotid für das „Primer-walking“-Verfahren erstellt. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang Tabelle A4.4 zu finden. Die nach der Sequenzierung vorliegenden Sequenzen wurden mit dem Softwareprogramm BioEdit [Hall, 1999] ausgewertet und anschließend mit Hilfe des Blast-Algorithmus mit der in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) hinterlegten Sequenzen verglichen.

Die Identifizierung von bekannten Promotoren in der Sequenz erfolgte durch einen Vergleich mit dem *E. coli* Stamm K-12 Genom in der „BioCyc collection of pathway/genome Databases“ (<http://www.biocyc.org>). Die auf diese Weise identifizierten Gene und deren Genprodukte sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die skizzierte Darstellung in Abbildung 4.5 zeigt die Position des identifizierten Fragments im Genom des EDL933 sowie enthaltene Promotoren und deren Sigma-Faktoren, soweit diese im Stamm K-12 bekannt sind. Zudem sind die entsprechenden Positionen der Fragmente im EDL933-Genom, sowie die Orientierung des inserierten Fragments im Plasmid pKK232-8 im Anhang Tabelle A2.3 aufgeführt.

Die durch Sequenzierung identifizierten *in vivo*-induzierten (*ivi*) Gene bzw. die entsprechenden rekombinanten Plasmide mit inserierter EDL933-DNA wurden lediglich ein Mal gefunden. Eine Anreicherung und eine damit zusammenhängende, mehrfache Wiederholung von Plasmiden konnte in den hier analysierten Klonen nicht festgestellt werden. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den Referenzsequenzen der *E. coli* Stämme K-12 und EDL933 ergab zudem, dass lediglich in vier der 24 Sequenzen eine mögliche Promotorregion identifiziert werden konnte. 20 rekombinante Plasmide enthielten Sequenzen aus dem Stamm EDL933 aus der Mitte eines Gens, ohne Genanfang oder Zwischen-Gen-Bereiche. Bei drei der vier Promotorregionen handelte es sich um Gene deren Promotorsequenzen bislang nicht bekannt sind.

Ergebnisse

Tabelle 4.3. Identifizierte Gene des Stammes EDL933 nach erfolgter IVET basierend auf pKK232-8 bei 42°C im Hackfleisch.

Funktion	<i>ivi</i>-Plasmid	Gen	Genprodukt
Transport	2.63	<i>acrF_1</i>	Acridin-Efflux-Pumpe, UE
	1.78	<i>artQ</i>	Arginin-Transporter, UE
	3.50	<i>gntT</i>	Glukonat-Transporter
	4.100	<i>mtlA</i>	Mannitol-PTS-Permease, UE
Energie- metabolismus	4.83	<i>aceB</i>	Malatsynthase A
	3.90	<i>hyfB</i>	Hydrogenase 4, UE B
Biosynthese Cofaktoren/ Nukleotide/AS/FS	5.18	<i>accA</i>	Acetyl-CoA-Carboxyltransferase, UE α
	2.17	<i>entE</i>	Enterobactinsynthase, UE E
	3.86	<i>thrC</i>	Threoninsynthase
	2.53	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide-Synthase
Makromolekül- synthese	1.25	<i>dnaN</i>	DNA-Polymerase III, UE β
	5.88	<i>rho</i>	Transkriptionsterminations-Faktor Rho
	1.85	<i>rimJ</i>	N-Acetyltransferase des ribosomalen Protein S5-Alanins
putativ	2.73	<i>ybdK</i>	Carboxylat-Amin-Ligase
	1.95	<i>ybeU</i>	tRNA-Ligase
	2.66	<i>ybjW*</i>	Hydroxylamin-Reduktase
	2.23	<i>ydhE</i>	Multidrug-Efflux-Transporter
	3.31	<i>ydiD</i>	Acyl-CoA-Synthase
	2.69	<i>yhbL*</i>	Isoprenoidbiosynthese-Protein
	1.11	<i>yicl</i>	Alpha-Xylosidase
	3.56	<i>sfmD</i>	Protein der äußeren Membran mit Exportfunktion
unbekannt	2.75	Z2224*	Permease eines Transporters
	5.45	<i>yrfD</i>	hypothetisches Protein
	2.20	Z0338*	hypothetisches Protein

UE: Untereinheit; AS: Aminosäuren; FS: Fettsäuren; *mit Promotorregion

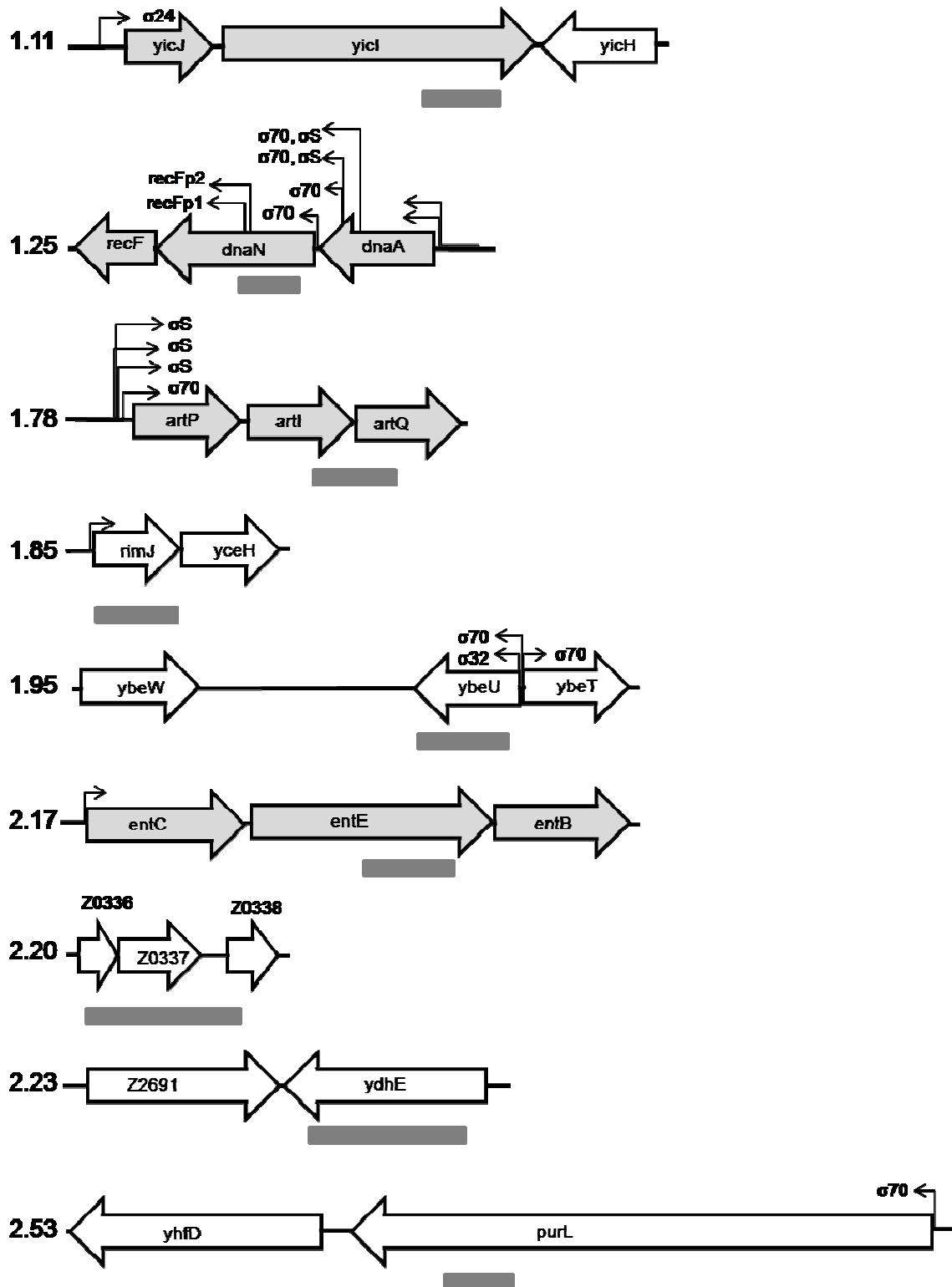
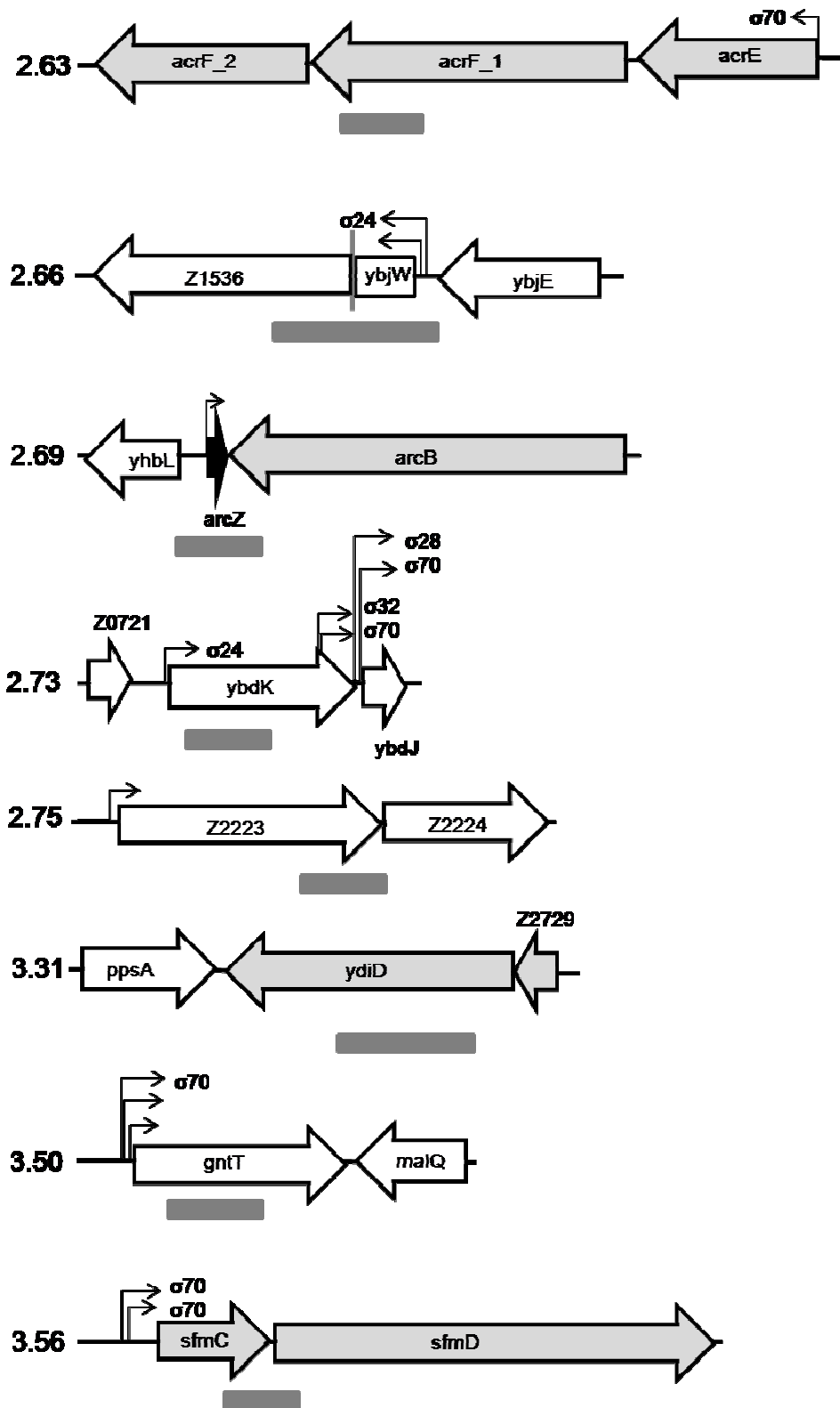
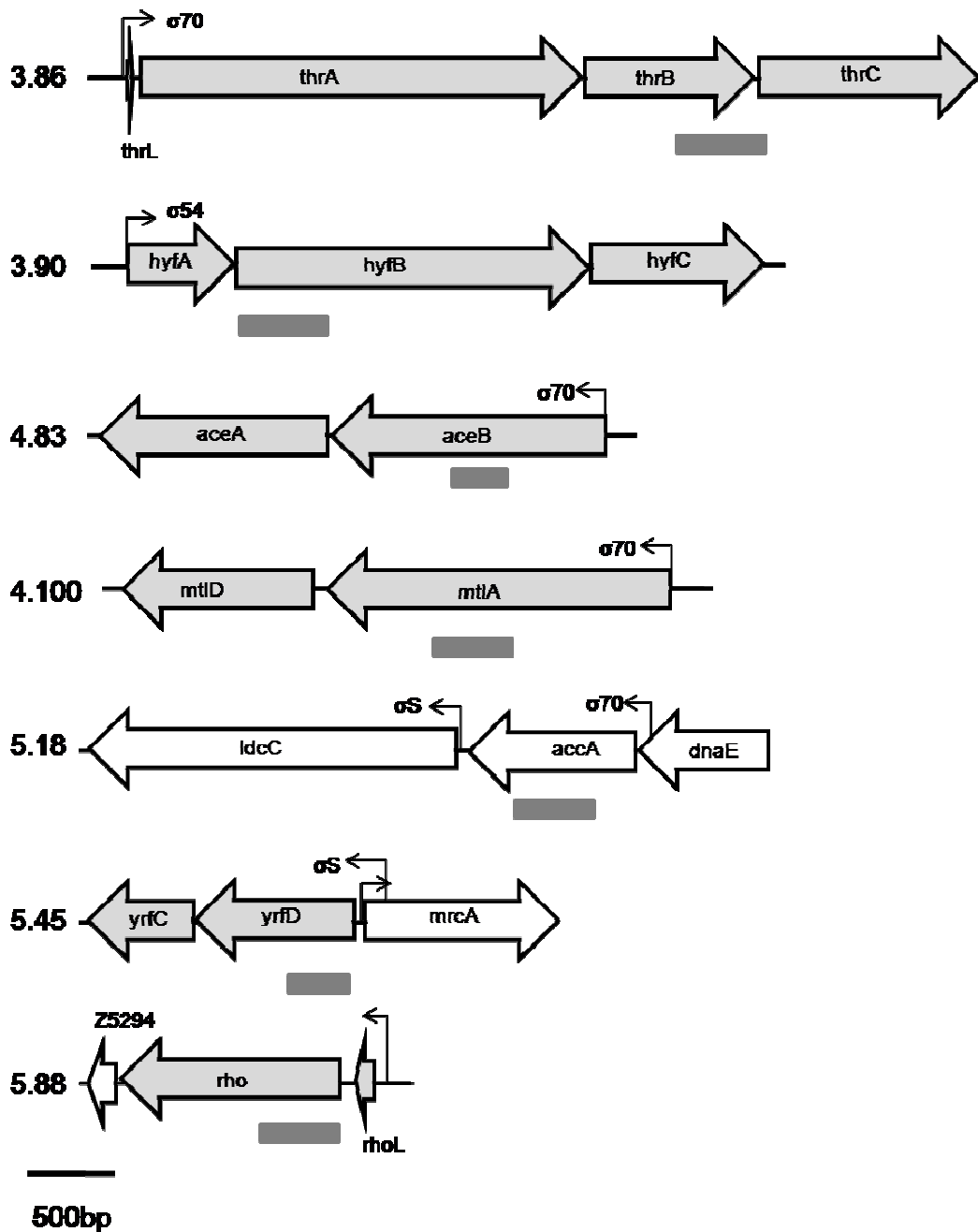


Abbildung 4.5: Darstellung der inserierten EDL933-Fragmente in den *ivi*-Plasmiden basierend auf pKK232-8. Abgebildet sind die identifizierten Fragmente als graue Balken mit den zugehörigen Genen und deren Umgebung. Die Promotoren mit Sigma-Faktoren sind als Pfeile dargestellt und wurden aus dem *E. coli* Stamm K-12 übernommen. Operons sind grau dargestellt. Schwarz dargestellte Gene sind im Stamm EDL933 nicht beschrieben und wurden aus dem Stamm K-12 übernommen.

Fortsetzung **Abbildung 4.5:**



Fortsetzung **Abbildung 4.5:**



Wie in der Abbildung 4.5 zu erkennen ist, lag der mögliche *ybjW*-Promotor, der hier identifiziert werden konnte, in reverser Richtung in dem entsprechenden rekombinanten Plasmid *ivi* 2.66 vor. *ybjW* kodiert für ein putatives, zytoplasmatisches Hybridcluster-Protein mit einer Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität. Die zweite Promotorregion im Plasmid *ivi* 2.75 gehörte zu Z2224, das eine putative Permease kodiert. Hier konnten keine weiteren Informationen im Vergleich zum Stamm K-12

gefunden werden. Der Promotor lag, wie aus Abbildung 4.5 hervorgeht, in korrekter Richtung in dem Plasmid vor. Die dritte, mögliche Promotorsequenz gehörte zu dem Gen für das hypothetische Protein Z0338, das auf dem Prophagen CP-933I kodiert ist und dessen Funktion bislang nicht bekannt ist. Die Promotorregion lag ebenfalls in dem zugehörigen rekombinanten Plasmid *ivi* 2.20 in korrekter Orientierung vor. Weiterhin konnte im Plasmid *ivi* 2.69 eine Promotorregion stromaufwärts von *yhbL* im Vergleich zum Stamm K-12 gefunden werden. In dem Stamm K-12 kodiert *arcZ*, lokalisiert zwischen *elbB* (*yhbL*) und *arcB*, eine kleine RNA mit regulatorischer Funktion. *arcZ* ist im Stamm EDL933 bislang nicht beschrieben. Wie aus der Abbildung 4.5 hervorgeht, kann *arcZ* zwischen den Genen *yhbL* und *arcB* im Stamm EDL933 lokalisiert werden. Die Sequenz des Promotors und des zugehörigen Gens konnten basierend auf dem Sequenzvergleich mit dem Genom der Stämme K-12 und EDL933 identifiziert werden. Der Promotor lag in korrekter Orientierung in dem rekombinanten Plasmid vor. Die Sequenz des entsprechenden inserierten EDL933-Fragments in dem Plasmid *ivi* 2.69 mit Augenmerk auf den Promotor ist im Anhang A3 aufgeführt.

Wie der Tabelle 4.3 und der Abbildung 4.5 zu entnehmen ist, gehörten die übrigen chromosomalen Fragmente des Stammes EDL933 ohne ersichtliche Promotorsequenz Proteinen unterschiedlicher Funktion an, auf die im Folgenden jeweils nur kurz ohne nähere Beschreibung der Funktion eingegangen wird. Es konnten vier Gene nach der Anreicherung gefunden werden, die Proteine kodieren, die in der inneren Zellmembran lokalisiert sind und mit dem Transport von Molekülen durch diese assoziiert werden können. *acrF_1* (*ivi* 2.63) kodiert das N-terminale Fragment des Transmembranproteins der Akridin-Efflux-Pumpe AcrF und *artQ* (*ivi* 1.78) kodiert ein integrales Membranprotein, das den Transport von L-Arginin vermittelt. Hier wurde zwar der Übergang von *artI* zu *artQ* kloniert, zu erkennen in Abbildung 4.5, jedoch gehört *artQ* zu einem Operon dessen Gene unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen, der hier nicht identifiziert werden konnte. Das dritte Gen kodiert für den Transporter GntT (*ivi* 3.50), der zur Familie der Glukonat-Transporter gehört und für die Aufnahme von Glukonat mit hoher Affinität zuständig ist. MtlA (*ivi* 4.100), das vierte membran-assoziierte Protein, gehört dem Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase-System (PTS) an. MtlA als Untereinheit der Mannitol-PTS-Permease veranlasst die Aufnahme von extrazellulärem Mannitol in die Zelle.

Wie der Tabelle 4.3 weiterhin zu entnehmen ist, konnten zwei Gene ermittelt werden, die mit dem Energiemetabolismus der Zelle in Verbindung gebracht werden können. Die Malatsynthase A, kodiert durch das Gen *aceB* (*ivi* 4.83), gehört dem Glyoxylatzyklus an und kondensiert Glyoxylat zu Malat. Das zweite Gen kodiert die Hydrogenase 4-Untereinheit HyfB (*ivi* 3.90), die ein Membranprotein der inneren Zellmembran ist und dessen Gen zu einem großen Operon gehört. Dieses bildet in Kooperation mit der Formiat-Dehydrogenase H einen Formiat-Hydrogenlyase-Komplex, der Formiat im Cytosol abbaut.

Durch die Sequenzanalyse konnten vier weitere Gene identifiziert werden, die für Proteine aus verschiedenen Biosynthesewegen kodieren (siehe Tabelle 4.3). Das erste Gen *accA* (*ivi* 5.18) kodiert ein Protein, das zum Acetyl-Coenzym A (CoA)-Carboxylase Komplex gehört, der Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, der ersten Vorstufe der Entstehung von Fettsäuren, carboxyliert. Enterobactin, das Siderophor von *E. coli*, konnte hier ebenfalls gefunden werden. Es wird unter Beteiligung der Enterobactinsynthase gebildet. *entE* (*ivi* 2.17) ist als eine der Untereinheiten des Enzyms an der Biosynthese von Enterobactin beteiligt. Die Threoninsynthase ThrC, kodiert durch *thrC* (*ivi* 3.86), die ebenfalls unter den gegebenen Bedingungen gefunden wurde, katalysiert den letzten Schritt des L-Threonin-Biosyntheseweges, in dem die Aminosäure Threonin aus Phosphohomoserin entsteht. *purL* (*ivi* 2.53) als Untereinheit der Formylglycin-amideribonucleotid-amidotransferase ist an der *de novo*-Synthese von Purin-Nukleotiden beteiligt.

Drei Gene konnten nach Auswertung der Sequenzen der Synthese von Makromolekülen zugeordnet werden (Tabelle 4.3). So vermittelt die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III, kodiert durch *dnaN* (*ivi* 1.25), die Bindung des Enzyms an die DNA für eine erfolgreiche Replikation. Die Aktivität eines ebenfalls identifizierten Transkriptionsterminations-Faktors, kodiert durch *rho* (*ivi* 5.88), ist nicht nur auf die Terminierung der Transkription von RNA zuständig, sondern fungiert ebenso als ein globaler Regulator der Genexpression. *rimJ*, das dritte ermittelte Gen enthalten in dem Plasmid *ivi* 1.85, kodiert eine Alanin-Acetyltransferase, die für das ribosomale Protein S5 spezifisch ist.

Neben den bereits erwähnten, putativen Genen *ybjW* und *yhbL* konnten sieben weitere Gene mit bislang ungeklärter Funktion gefunden werden. Wie der Tabelle 4.3 zu entnehmen ist, sind *ybdK* (*ivi* 2.73) und *ybeU* (*ivi* 1.95) putative Ligasen, *ydiD* (*ivi*

3.31) eine putative Synthase und *yicl* (*ivi* 1.11) eine putative Xylosidase. Die drei Gene *ydhE*, *sfmD* und Z2224 (*ivi* 2.23/ 3.56/ 2.75), die ebenfalls durch Sequenzvergleich identifiziert wurden, konnten einer möglichen Transportfunktion zugeordnet werden. Neben dem bereits beschriebenen, hypothetischen Protein Z0338 konnte das hypothetische Protein YrfD (*ivi* 5.45) gefunden werden.

Insgesamt zeigte die Auswertung der Sequenzanalyse, dass unter den gewählten Bedingungen keine Anreicherung von Klonen mit *in vivo* aktiven Promotoren erzielt wurde. Es konnte somit die Vermutung aufgestellt werden, dass das bakteriostatische Selektionsantibiotikum für die Verwendung der Methode im Hackfleisch ungünstig erschien. Weiterhin konnte vermutet werden, dass die Löslichkeit des Chloramphenicols in Alkohol zu einer nicht homogenen Verteilung des Stoffes in der wässrigen Matrix Hackfleisch führte. Eine Wirkung des Stoffes auf alle eingesetzten Zellen der Genbank konnte somit angezweifelt werden. Ebenso konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass eine Inkubationszeit von fünf Stunden einen zu kurzen Zeitraum für die Anreicherung von Zellen darstellte.

4.2 Etablierung eines neuen IVET-Systems für *E. coli* in der Matrix Rinderhackfleisch

4.2.1 Konstruktion des Promotor-Selektionsvektors pAK-1

Da sich in den vorhergehenden Versuchen, beschrieben in Abschnitt 4.1, die Verwendung eines Alkohol-löslichen und gleichzeitig bakteriostatischen Antibiotikums in einer IVET in Hackfleisch als nachteilig erwiesen hatte, sollte die Methode für die Anwendung in dieser Matrix optimiert werden. Hierzu wurde das bakteriostatisch-wirkende Selektionsgen für die Chloramphenicolresistenz gegen die bakteriozid-wirkende Kanamycinresistenz ausgetauscht. Aufgrund dessen und der Löslichkeit des Kanamycins in Wasser anstatt in Ethanol sollte eine verbesserte Selektion während der Anreicherung in Hackfleisch erreicht werden und unerwünschte Klone stärker selektiert werden.

Der Austausch des Resistenzgens erfolgte, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, durch die Hydrolyse des Vektors pKK232-8 mit den beiden Restriktionsendonukleasen HindIII und NcoI zur Deletion eines 575 bp großen Fragments, das das Chloramphenicol-Acetyltransferasegen enthält. Das Gen für die Kanamycinresistenz ohne den zugehörigen Promotor wurde mit Hilfe einer Standard-PCR mit dem Primerpaar kan-f/ kan-r (siehe Tabelle A4.4) aus dem Vektor pK18 amplifiziert. Anschließend erfolgte der Verdau des entstandenen PCR-Produkts mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und PstI, deren Erkennungssequenzen in den Oligonukleotiden enthalten waren. Nach Ligation des Produkts mit 806 bp in das geschnittene und dephosphorylierte Plasmid entstand der Vektor pAK-1. Die Überprüfung des Plasmids erfolgte durch Sequenzanalyse mit den Oligonukleotiden pKK232-8-for und kan-r (siehe Tabelle A4.4) und ist im Anhang A1 aufgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Basen 1011-1018 bei der Klonierung der PstI-Schnittstelle in die NcoI-Schnittstelle deletiert wurden und das Plasmid somit eine Größe von 5.317 bp besaß. Da diese Deletion auf genomischer Ebene keinen Einfluss auf die korrekte Funktion des Plasmids hatte, wurde mit diesem Konstrukt weitergearbeitet. Eine Genkarte des neu konstruierten Vektors pAK-1 ist in Abbildung 4.6 aufgezeigt.

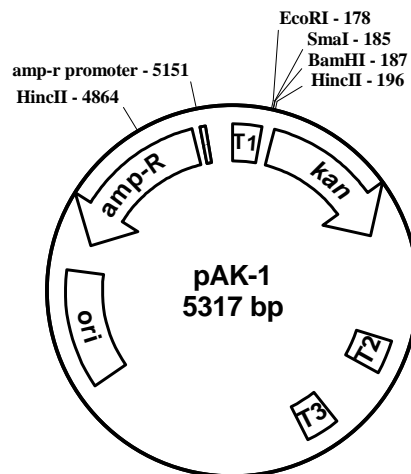


Abbildung 4.6: Promotor-Selektionsvektor pAK-1. Der Vektor enthält ein promotorloses Kanamycinresistenz-Gen (*kan*) stromabwärts der *mcs*. Weiterhin besitzt der Vektor Transkriptionsstops (T1-T3) aus dem *rrnB*-Operon aus *E. coli*, den Replikationsursprung (*ori*) aus dem Plasmid pBR322 und ein Ampicillinresistenz-Gen (*amp^R*).

4.2.2 Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 *in vitro*

Um die Funktionalität des neuen IVET-Systems vor dem Einsatz in der Matrix Hackfleisch *in vitro* überprüfen zu können, wurde der lac-Promotor aus dem Vektor pK18 in den Vektor pAK-1, wie im Abschnitt 3.5.3 beschrieben, kloniert. Das entstandene rekombinante Plasmid mit einer Größe von 6260 bp wurde mit pAK-L bezeichnet. Die Plasmide pAK-1 und pAK-L wurden in den *E. coli* Laborstamm HB101 NaI^R transformiert. Nachdem sichergestellt war, dass der Stamm HB101 NaI^R/pAK-L *in vitro* resistent auf LB-Medium mit Kanamycin war, wurde der Einfluss verschiedener Kanamycinkonzentrationen auf das Wachstum der Kulturen untersucht. Dies wurde analog zu Abschnitt 4.1.1 durchgeführt. Die Zugabe des Kanamycins erfolgte in den Konzentrationen 50 µg/ml und 200 µg/ml Kultur. Parallel wurde wieder eine Referenz, die aus dem *E. coli* Stamm HB101 NaI^R/pAK-1 ohne Zugabe des Kanamycins bestand, mitgeführt. Die daraus resultierenden Wachstumskurven sind in Abbildung 4.7 und die Daten im Anhang Tabelle A4.1 dargestellt. In der Abbildung 4.7 ist zu erkennen, dass beide Konzentrationen des Kanamycins bereits zwei Stunden nach ihrer Zugabe zum Zeitpunkt vier Stunden eine bakteriozide Wirkung auf den Stamm HB101 NaI^R/pAK-1 ergeben haben. Die optische Dichte der Kulturen hat über den gemessenen Zeitraum nach der Zugabe des Antibiotikums nur wenig abgenommen, jedoch zeigte die Bestimmung der Lebendkeimzahl eine deutliche Abnahme. Nach Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin konnte in der Keimzahlbestimmung zum Zeitpunkt 24 Stunden noch etwa 1×10^4 KbE/ml nachgewiesen werden. Bei Verwendung von 200 µg/ml Kanamycin konnten dahingegen ab dem Zeitpunkt sechs Stunden keine lebenden Zellen mehr in der Keimzahlbestimmung nachgewiesen werden. Bei Verwendung der höheren Konzentration ergab sich somit eine stärkere bakteriozide Wirkung, die vier Stunden nach Zugabe des Antibiotikums zum Tod der Zellen führte. Die Kultur HB101 NaI^R/pAK-L mit aktivem Promotor und exprimierter Resistenz vermehrte sich ähnlich der Referenz ohne Zugabe des Antibiotikums. Hier fand, wie in der Abbildung 4.7 zu erkennen ist, keine Hemmung des Bakterienwachstums statt. In beiden Kulturen erfolgte das Wachstum über die exponentielle bis hin zur stationären Phase.

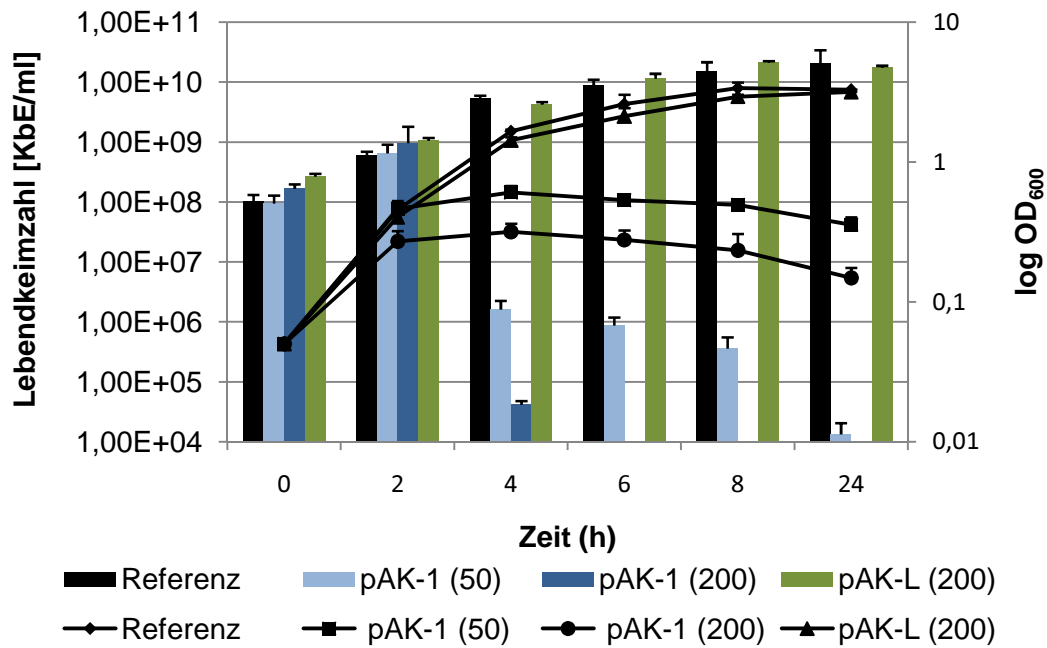


Abbildung 4.7: Wachstumskurven in LB-Medium mit Bestimmung der optischen Dichte und der Lebendkeimzahl [KbE/g] der *E. coli* Stämme HB101 Nal^{R} /pAK-1 und HB101 Nal^{R} /pAK-L nach Zugabe von 50 bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. Die ermittelten Lebendkeimzahlen sind mit farbigen Balken und die OD_{600} -Werte durch Linien mit Symbolen dargestellt. Die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen sind durch Balken gekennzeichnet. Referenz: *E. coli* Stamm HB101 Nal^{R} /pAK-1 ohne Zugabe von Kanamycin.

4.2.3 Überprüfung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 *in vivo*

Nachdem die Funktionalität des neuen Vektors pAK-1 im Medium bestätigt werden konnte, war für die in dieser Arbeit angestrebte Anwendung der Methode *in vivo* im Weiteren erforderlich, dass die Funktion des IVET-Systems auch in der Matrix Hackfleisch abgeklärt wurde. Dies erfolgte wiederum, wie in 4.1.2 beschrieben, unter Zugabe einer Kanamycinkonzentration von 200 $\mu\text{g/g}$. Es wurde mit den Stämmen gearbeitet, die auch für die Versuche im Medium verwendet wurden. In einer Erweiterung des vorigen Versuches wurden die Antibiotika Ampicillin, Nalidixinsäure und Kanamycin in einem Volumen von 11 ml PBS zugegeben, um eine homogenere Verteilung der Antibiotika im Hackfleisch zu erzielen. Eine Referenz, die aus dem *E. coli* Stamm HB101 Nal^{R} /pAK-1 ohne Zugabe des Kanamycins bestand, wurde ebenfalls mitgeführt. Die zugehörigen Daten sind in Abbildung 4.8 und im Anhang Tabelle A4.2 dargestellt. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist, wurden nach Zugabe

des Kanamycins in einer Konzentration von 50 µg/g Zellen des Stammes HB101 NaI^R/pAK-1 aus dem Hackfleisch isoliert. Nach Verwendung von 200 µg/g Kanamycin konnten nach der Inkubation hingegen keine Bakterien aus dem Hackfleisch isoliert werden. Die höhere Konzentration führte hier somit zu einer 100%igen bakterioziden Wirkung. Die Wirkung des Antibiotikums konnte daher auch in Hackfleisch gezeigt werden. Die Referenz ohne Zugabe des Kanamycins zeigte keine Hemmung im Wachstum wie auch der Stamm HB101 NaI^R/pAK-L mit enthaltenem Promotor und exprimierter Resistenz. Dieser Stamm zeigte ein um den Faktor 5,5 erhöhtes relatives Wachstum im Vergleich zur Referenz. Die Funktionalität des neuen IVET-Systems konnte in den durchgeführten Vorversuchen im Medium und im Hackfleisch bestätigt werden. Eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin wurde erst durch Einfügen eines aktiven Promotors in die mcs des Plasmids vermittelt.

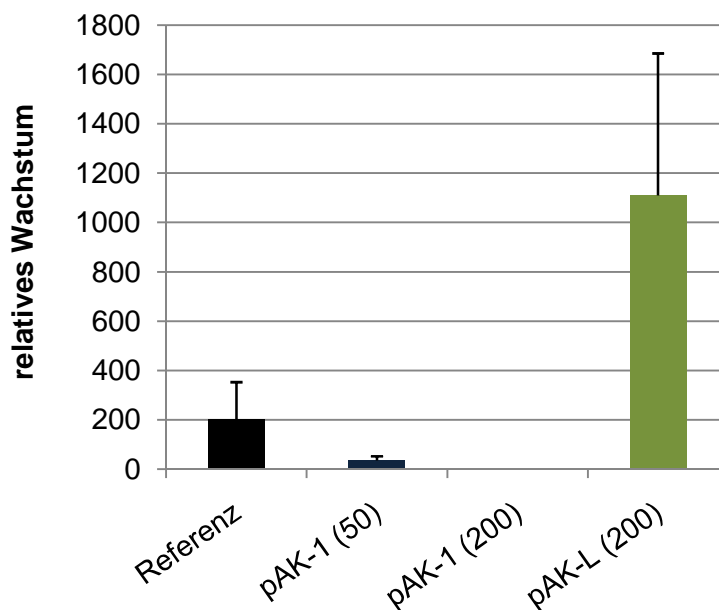


Abbildung 4.8: Relatives Wachstum der *E. coli* Stämme HB101 NaI^R/pAK-1 und HB101 NaI^R/pAK-L unter Zugabe von 50 bzw. 200 µg/g Kanamycin in Hackfleisch. Die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen sind durch Balken gekennzeichnet. Referenz: *E. coli* HB101 NaI^R/pAK-1 ohne Zugabe von Kanamycin.

4.2.4 Herstellung einer chromosomalen Genbank des Stammes EDL933 in pAK-1

Für die erneute Durchführung der IVET in Hackfleisch wurde zunächst eine Genbank der chromosomalen DNA von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 im Promotor-Selektionsvektor pAK-1 erstellt. Die Genbank wurde, wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, erstellt und bestand aus $1,9 \times 10^4$ Klonen. Die durchschnittliche Größe der inserierten DNA-Fragmente wurde ebenfalls mit 0,7 kb bestimmt. Daraus folgte eine theoretisch 2,4-fache Wiederholung des EDL933-Genoms mit einer Größe von 5528 kb durch die erstellte Genbank. Der Anteil an *in vitro* Kanamycin-resistenten Klonen der Genbank wurde mit 8,75% bestimmt.

4.2.5 Verwendung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 in Rinderhackfleisch

Die IVET wurde, wie in den Abschnitten 3.5.5 und 4.1.4 beschrieben, durchgeführt. Die Zugabe der Antibiotika Ampicillin, Nalidixinsäure und Kanamycin erfolgte in einem Volumen von 11 ml PBS und die Anreicherung erfolgte für zehn Stunden bei 42°C, da sich eine Inkubationszeit von fünf Stunden in der vorigen IVET als zu gering herausgestellt hatte. Die nach der Anreicherung aus dem Hackfleisch isolierten Einzelkolonien wurden parallel auf LB-Medium mit Ampicillin und Nalidixinsäure und auf LB-Medium mit Ampicillin, Nalidixinsäure und Kanamycin ausgestrichen. Die *in vitro* Kanamycin-sensitiven Klone wurden anschließend zusammen in eine weitere Anreicherung im Hackfleisch unter denselben Bedingungen eingesetzt. Eine Übersicht des Ablaufes der IVET ist in Abbildung 3.1 zu sehen. Die Daten der Inokulation und Isolierung nach Inkubation von den insgesamt drei durchgeführten Anreicherungen sind in der Tabelle 4.4 aufgeführt. Das Wachstum der Zellen zeigte hier in den drei Anreicherungen in Hackfleisch deutliche Unterschiede zu dem vorigen IVET-System, beschrieben in Abschnitt 4.1.4. Nach der ersten Anreicherung in Hackfleisch konnten $4,9 \times 10^4$ KbE/g, zwei Zehnerpotenzen geringer als inokuliert, isoliert werden. Dieser Anteil stieg um zwei Zehnerpotenzen gegenüber der Inokulation bis auf $2,9 \times 10^8$ KbE/g nach der dritten Inkubation in Hackfleisch an.

Der zwischen den Selektionen durchgeführte Ausstrich der Einzelkolonien parallel auf LB-Medium mit den bereits beschriebenen Antibiotika ist ebenfalls in Tabelle 4.4 angegeben. Es wurden nach Isolierung der Zellen aus dem Hackfleisch wiederum jeweils so viele Kolonien auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika getestet, dass mit etwa 1×10^4 *in vitro* sensitiven Klonen weitergearbeitet werden konnte. Der Anteil an *in vitro* resistenten Klonen gegen das Antibiotikum Kanamycin betrug nach der ersten Anreicherung im Hackfleisch etwa 27%. Dies zeigte einen 3-fachen Anstieg der ursprünglich 8,75% *in vitro* resistenten Klone in der Genbank an. Dieser Anteil verringerte sich innerhalb der durchgeführten Anreicherungen auf abschließende 0,2%.

Tabelle 4.4: Anwendung des IVET-Systems basierend auf pAK-1 in Hackfleisch. A) Daten zur Inokulation und Isolierung nach Inkubation der Genbank-Klone während der drei Anreicherungen in Hackfleisch. B) Paralleler Ausstrich der aus dem Hackfleisch isolierten Einzelkolonien auf LB-Medium mit und ohne Kanamycin. Angabe des jeweiligen Anteils in Prozent in Klammern.

A

Anreicherung	Inokulation [KbE/g]	Isolierung [KbE/g]
1	$1,6 \times 10^6$	$4,9 \times 10^4$
2	$5,6 \times 10^6$	$5,4 \times 10^7$
3	$7,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$

B

Anreicherung	Kolonien gesamt	Anteil Kan ^R	Anteil Kan ^S
1	14.000	3.762 (26,9)	10.238 (73,1)
2	10.000	257 (2,6)	9.743 (97,4)
3	1.000	2 (0,2)	998 (99,8)

Für die nachfolgende Amplifikation der inserierten EDL933-DNA wurden 200 Klone aus den insgesamt 1.000 Klonen nach der dritten Anreicherung verwendet, um die rekombinanten Plasmide zu isolieren. Die Plasmid-DNA wurde anschließend als Template-DNA in eine Standard-PCR mit dem Oligonukleotidpaar pKK232-8-for/SP2 (siehe Tabelle A4.4) eingesetzt. Die Größe der PCR-Produkte wurde in einer Agarosegelelektrophorese (2%, 130 V, 1,5 h) durch Vergleich mit dem 1kb-Ladder abgeschätzt. Eine Auflistung der Größe und Anzahl der PCR-Produkte ist in der Tabelle 4.5 aufgeführt. In der Tabelle ist zu erkennen, dass Produkte mit einer Größe von 650 bis 900 bp vermehrt gefunden wurden.

Tabelle 4.5: Amplifikation der inserierten EDL933-DNA in den *ivi*-Plasmiden basierend auf pAK-1. Angegeben sind Größe und Anzahl der erhaltenen PCR-Produkte.

Größe des PCR-Produkts (bp)	Anzahl der PCR-Produkte
200	3
550	3
600	7
650	17
700	20
750	11
800	22
850	69
900	16
1000	6
1100	8
1200	5
1300	3
1500	2
1700	1

Bei allen PCR-Produkten wurden zum weiteren Vergleich eine RFLP mit der Restriktionsendonuklease BsuRI durchgeführt, wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben. Brachte die RFLP gleiche Bandenmuster nach erfolgter Agarosegelelektrophorese (2%, 130 V, 1,5 h) hervor, so wurde angenommen, dass es sich um dieselbe inserierte chromosomale DNA-Sequenz handelte. In der Abbildung 4.9 ist beispielhaft eine RFLP von zehn PCR-Produkten aufgeführt. Hier kann direkt erkannt werden, dass PCR-Produkte gleicher Größe in einer RFLP unterschiedliche Bandenmuster ergeben können. Insgesamt konnten 20 Gruppen mit insgesamt 70 Klonen basierend auf den Bandenmustern gebildet werden, wobei mindestens zwei Klone mit identischem RFLP-Muster zur Bildung einer Gruppe vorliegen mussten. Die größte Gruppe wurde aus zehn Klonen gebildet, die ein identisches Muster aufwiesen. Eine weitere Gruppe bestand aus sieben Klonen und zwei Gruppen aus jeweils fünf Klonen. Drei Gruppen konnten aus jeweils vier Klonen und fünf Gruppen aus jeweils drei Klonen gebildet werden. Insgesamt acht Gruppen bestanden aus zwei Klonen mit identischem Muster.

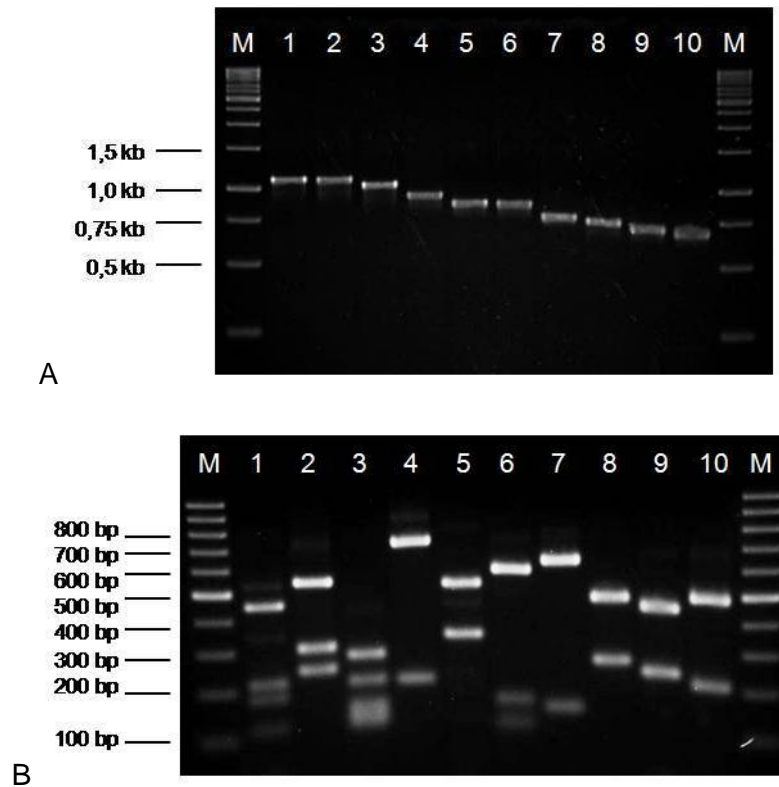


Abbildung 4.9: A) PCR-Produkte der inserierten EDL933-DNA in den *ivi*-Plasmiden basierend auf pAK-1. Die Auftrennung erfolgte in einem 2%igen Agarosegel bei einer Spannung von 130 V für 1,5 h. Das Anfärben erfolgte in Ethidiumbromid. M: 1kb DNA-Ladder; 1: *ivi* 129; 2: *ivi* 52; 3: *ivi* 61; 4: *ivi* 82; 5: *ivi* 128; 6: *ivi* 65; 7: *ivi* 51; 8: *ivi* 122; 9: *ivi* 49; 10: *ivi* 50. B) RFLP der PCR-Produkte mit BsuRI. Die Auftrennung erfolgte in einem 2%igen Agarosegel bei einer Spannung von 130 V für 1,5 h. Das Anfärben erfolgte in Ethidiumbromid. M: 100 bp DNA-Ladder; 1: *ivi* 129; 2: *ivi* 52; 3: *ivi* 61; 4: *ivi* 82; 5: *ivi* 128; 6: *ivi* 65; 7: *ivi* 51; 8: *ivi* 122; 9: *ivi* 49; 10: *ivi* 50.

4.2.6 DNA-Sequenzanalyse der inserierten Sequenzen in den *ivi*-Plasmiden basierend auf pAK-1

Die in Abschnitt 4.2.5 ausgewählten 70 rekombinanten Plasmide wurden mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ erneut isoliert und für die Sequenzierung mit dem Oligonukleotid SP2 verwendet. Konnte die inserierte DNA-Sequenz nicht komplett mit SP2 ermittelt werden, so wurde von der erhaltenen Sequenz ausgehend ein neues Oligonukleotid für das „Primer-walking“-Verfahren erstellt. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang Tabelle A4.4 zu finden. Stellte sich heraus, dass mehrere *ivi*-Plasmide die identische EDL933-Sequenz enthielten, die

mit dem Oligonukleotid SP2 nicht vollständig ermittelt werden konnte, wurde ein Plasmid stellvertretend für die weitere Sequenzierung eingesetzt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden, wie in Abschnitt 4.1.5 beschrieben, ausgewertet. Die auf diese Weise identifizierten Gene und deren Funktion sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Die jeweiligen EDL933-Fragmente, die darin enthaltenen Promotoren und deren Sigma-Faktoren sind in Abbildung 4.10 skizziert. Die entsprechenden Positionen der Fragmente im EDL933, sowie die Orientierung der Fragmente in den *ivi*-Plasmiden ist im Anhang Tabelle A4.3 aufgeführt.

Die durch Sequenzierung identifizierten *ivi*-Gene bzw. die entsprechenden rekombinanten Plasmide mit inserierter EDL933-DNA wurden zu 79% mehrfach gefunden. Eine Anreicherung und eine damit zusammenhängende mehrfache Wiederholung von Plasmiden konnte in 65 von 70 untersuchten Klonen festgestellt werden. Lediglich fünf *ivi*-Plasmide konnten nur ein Mal ermittelt werden.

Der Vergleich der in der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen mit den Referenzsequenzen der *E. coli* Stämme K-12 und EDL933 ergab, dass die Promotorregionen von ein- bis acht-Mal identifiziert werden konnten. Zwei Promotorsequenzen lagen in reverser Richtung in dem entsprechenden *ivi*-Plasmid vor. Eine sequenzierte Insertion zeigte die Mitte eines Gens ohne ersichtlichen Genanfang oder Gen-Zwischenbereich.

Nach Auswertung der Sequenzen stellte sich heraus, dass vier Insertionen Gene mit hypothetischer Funktion enthielten, die spezifisch im Stamm EDL933 vorliegen und somit im Stamm K-12 nicht lokalisiert werden konnten. Die Gene, die eine Promotorregion stromaufwärts vor einem Gen-Start enthielten, wurden basierend auf ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt. Diese sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Die in dieser Arbeit identifizierten Gene waren involviert in die Stressantwort der Zelle, den Transport von Molekülen, den Kohlenhydratmetabolismus, den Energiemetabolismus, die RNA-Synthese und die Makromolekülsynthese der Zelle. Wie aus der Tabelle 4.6 hervorgeht, konnten zwölf Gene einer bislang putativen Funktion bzw. einer unbekanntem Funktion zugeschrieben werden. Die zwei Gene, deren Promotorregion in inkorrekt orientiert gefunden wurde, waren mit der Virulenz und dem Nukleotidmetabolismus der Zelle assoziiert. Das letzte Gen, aus dem die

Gen-Mitte im rekombinanten Plasmid vorlag, konnte einer Funktion in der Signaltransduktion zugeordnet werden.

Im Folgenden wird näher auf die in der IVET identifizierten Gene und deren Funktion eingegangen. Das erste, hier zwei Mal gefundene *ivi*-Plasmid 181, enthält die Promotorregion von *cspD* (siehe Abbildung 4.10). Das Gen kodiert ein Protein, das der Stressantwort der Zelle angehört und eine hohe Sequenzhomologie zu CspA, dem wichtigsten Kälteschockprotein in *E. coli*, besitzt. Der Promotor von *uhpT*, das einen Zucker-Phosphat-Antiporter (*ivi* 77) kodiert, wurde drei Mal nach der Anreicherung in Hackfleisch gefunden. Der Transporter gehört zur „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) von Transportern [Marger und Saier, 1993].

Der Promotor von *glmM*, das eine Phosphoglukosaminmutase kodiert, wurde sechs Mal innerhalb zwei verschiedener *ivi*-Plasmide (*ivi* 44/74) ermittelt (siehe Tabelle 4.6). Der Promotor wurde somit in zwei verschiedenen Klonen der Genbank *in vivo* induziert und angereichert. Das entsprechende Enzym ist in den Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle involviert.

Zwei weitere Gene, aufgeführt in Tabelle 4.6, konnten mit dem Energiemetabolismus der Bakterienzelle in Verbindung gebracht werden. Der Promotor von *hdhA* (*ivi* 170) konnte vier Mal identifiziert werden. Das Gen kodiert die NAD-abhängige 7-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die die beiden Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure dehydroxyliert. *glpA* (*ivi* 68), das zweite ermittelte Gen, ist wie aus der Abbildung 4.10 hervorgeht, ein Mitglied des *glpACB*-Operons, das die anaerobe Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase kodiert.

Als weiteres Resultat der IVET konnten die Promotoren von zwei Kinasegenen gefunden werden. *gsk* kodiert die Inosin-Guanosin-Kinase. Das entsprechende *ivi*-Plasmid 17 konnte, wie in Tabelle 4.6 zu erkennen ist, acht Mal identifiziert werden. Der Promotor von *ndk* (*ivi* 21), das die Nukleosiddiphosphat-Kinase kodiert, wurde lediglich ein Mal in der Sequenzanalyse identifiziert.

Ergebnisse

Tabelle 4.6. Identifizierte Gene des Stammes EDL933 nach erfolgter IVET basierend auf pAK-1 bei 42°C im Hackfleisch.

Funktion	Gen	Wiederholung	Genprodukt
Stress	<i>cspD</i>	2	Kälteschockprotein
Transport	<i>uhpT</i>	3	Hexosephosphat-Transportprotein
KH-Metabolismus	<i>glmM</i>	4	Phosphoglukosamin-Mutase
		2	
Energiemetabolismus	<i>hdhA</i>	4	7- α -hydroxysteroid Dehydrogenase
	<i>glpA</i>	1	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase, UE A
Nukleotidbiosynthese	<i>gsk</i>	8	Inosin-Guanosin-Kinase
	<i>ndk</i>	1	Nucleosiddiphosphat-Kinase
Makromolekülsynthese	<i>greA</i>	2	Transkriptions-Elongationsfaktor
putativ	<i>yaiN</i>	2	Regulatorprotein FrmR
	<i>yibK</i>	2	tRNA/rRNA Methyltransferase
	<i>yohM</i>	2	Nickel/Kobalt Effluxprotein RcnA
	Z1074	7	Transporter
	Z2091	1	Regulator
	Z2716	2	Membranprotein der inneren Zellmembran
	Z2760	1	Zellteilungsmodulator CedA
unbekannt	<i>yciC</i>	3	hypothetisches Protein
	<i>yggX</i>	3	hypothetisches Protein
	<i>yjdK</i>	4	hypothetisches Protein
	<i>ymcD</i>	1	hypothetisches Protein
	Z4179	2	hypothetisches Protein
Energiemetabolismus	<i>atpI</i> ¹	6	ATP Synthase, UE 1
putativ	<i>yjcC</i> ²	5	Signaltransduktionsprotein
Transport	<i>hlyB</i> ¹	2	Hämolsintransportprotein

UE: Untereinheit; KH: Kohlenhydrat

¹: Promotorregion in reverser Orientierung; ²: Gen-Mitte

Der durch weiteren Sequenzvergleich zwei Mal identifizierte *greA*-Promotor (*ivi* 42) wird durch zwei Sigma-Faktoren reguliert (siehe Abbildung 4.10). Einer der Promotoren steht unter der Kontrolle des Sigma-Faktors σ_{24} , der mit der Hitzestress-Antwort der Zelle in Verbindung gebracht werden kann. Hier ist ein erster Hinweis auf die Antwort der Zelle zu erkennen, die auf die erhöhte Temperatur während der Inkubation im Hackfleisch reagiert. Der zugehörige Transkriptionselongationsfaktor GreA ist für den Ablauf einer effizienten Transkription in der Zelle zuständig.

Insgesamt wurden sieben Gene mit einer putativen Funktion gefunden (Tabelle 4.6). Unter diesen fällt ein vorhergesagter Transporter, kodiert durch Z1074 (*ivi* 15), direkt ins Auge. Das zugehörige RFLP-Muster konnte 80-fach identifiziert werden, für die Sequenzierung wurde jedoch lediglich stellvertretend eine Anzahl von sieben *ivi*-Plasmiden zufällig ausgewählt. Hier kann durch die starke Anreicherung des entsprechenden Genbank-Klons ein Hinweis auf eine möglicherweise bedeutende Rolle des Gens unter den experimentellen Bedingungen in Hackfleisch festgestellt werden. In *E. coli* K-12 wird dieser putative Transporter durch das Gen *ybjL* kodiert, wobei ein Bereich des Gens den Hinweis auf die Anionpermease ArsB gibt, die einen Metall-Protonen-Austausch katalysiert.

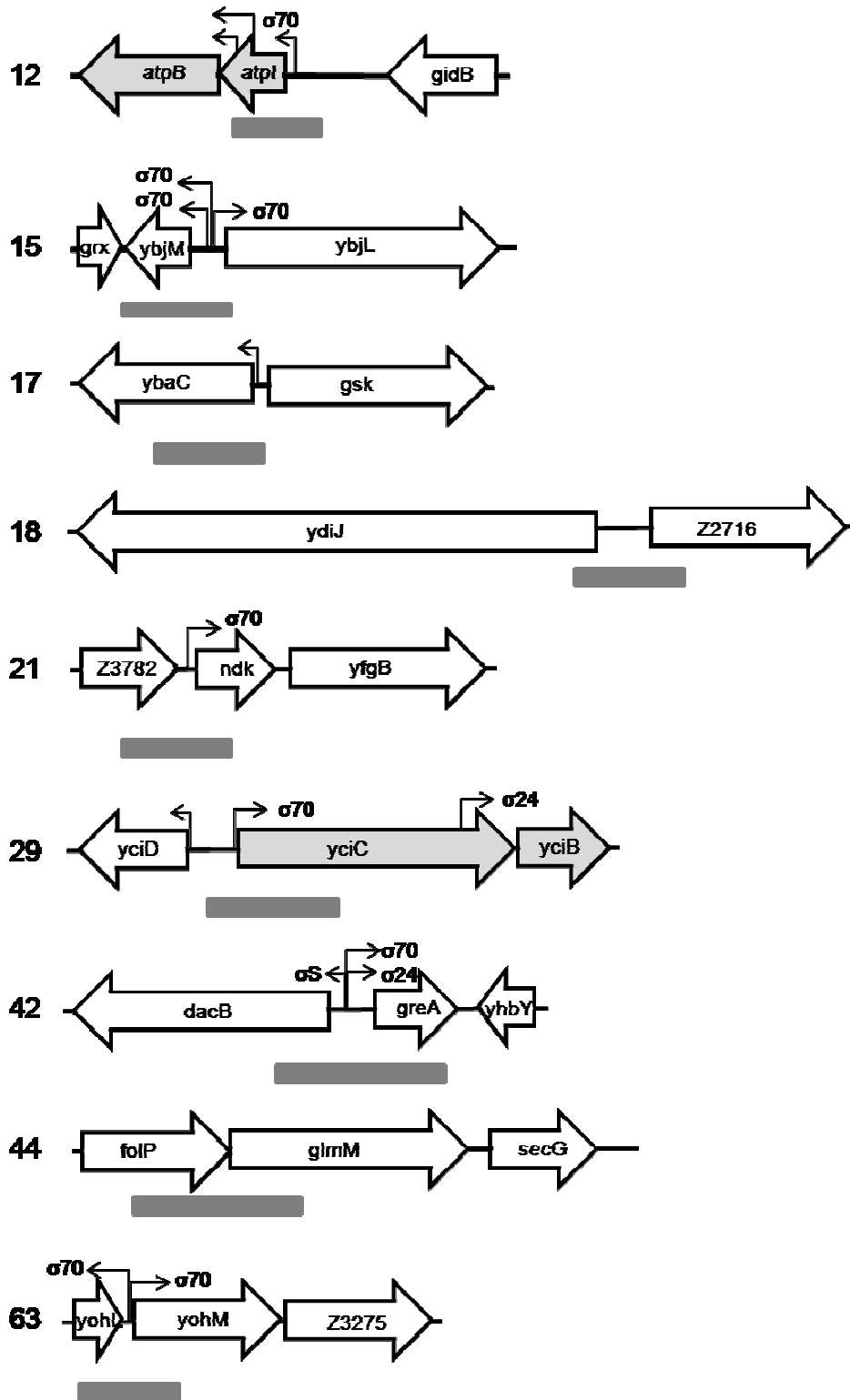
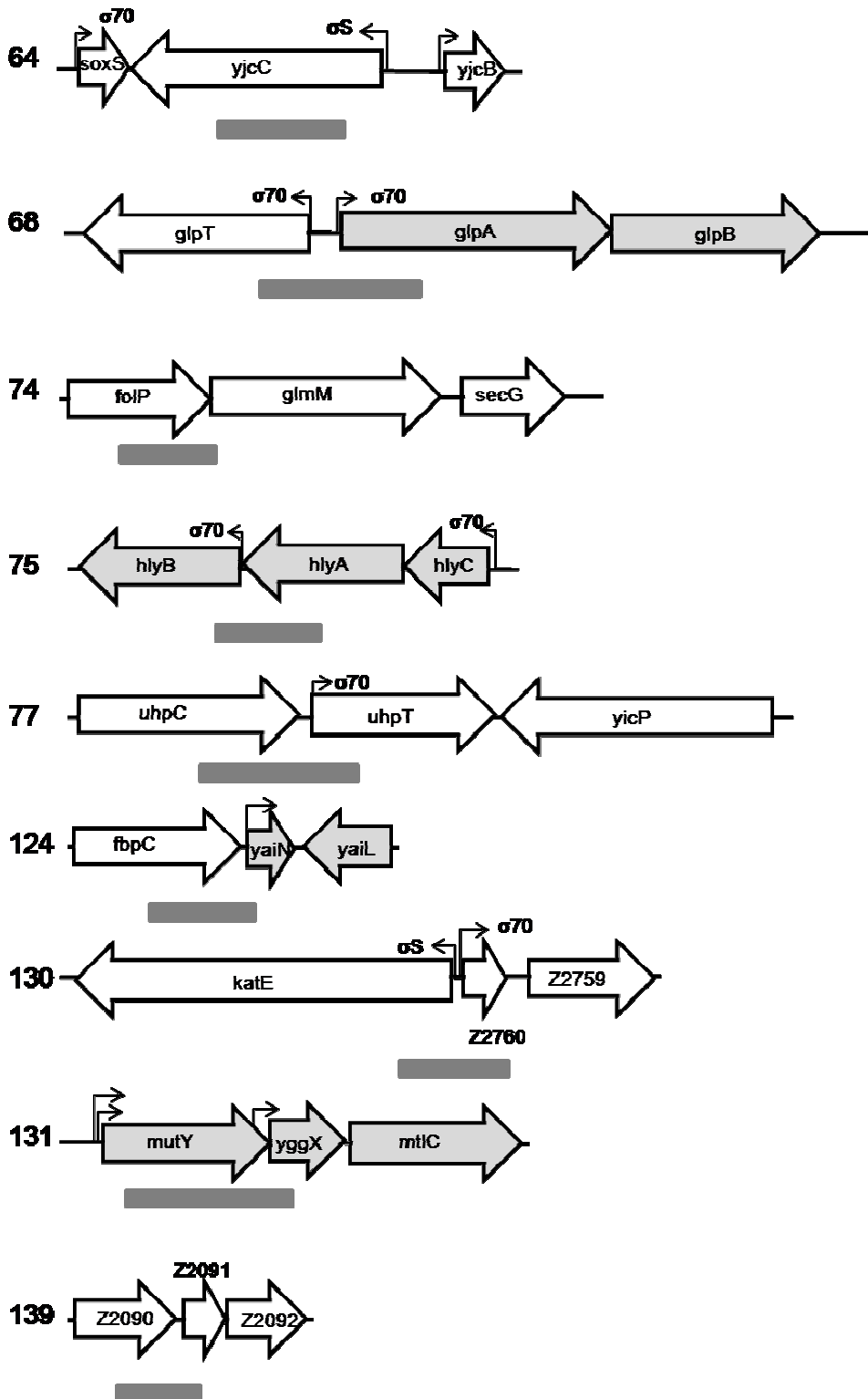
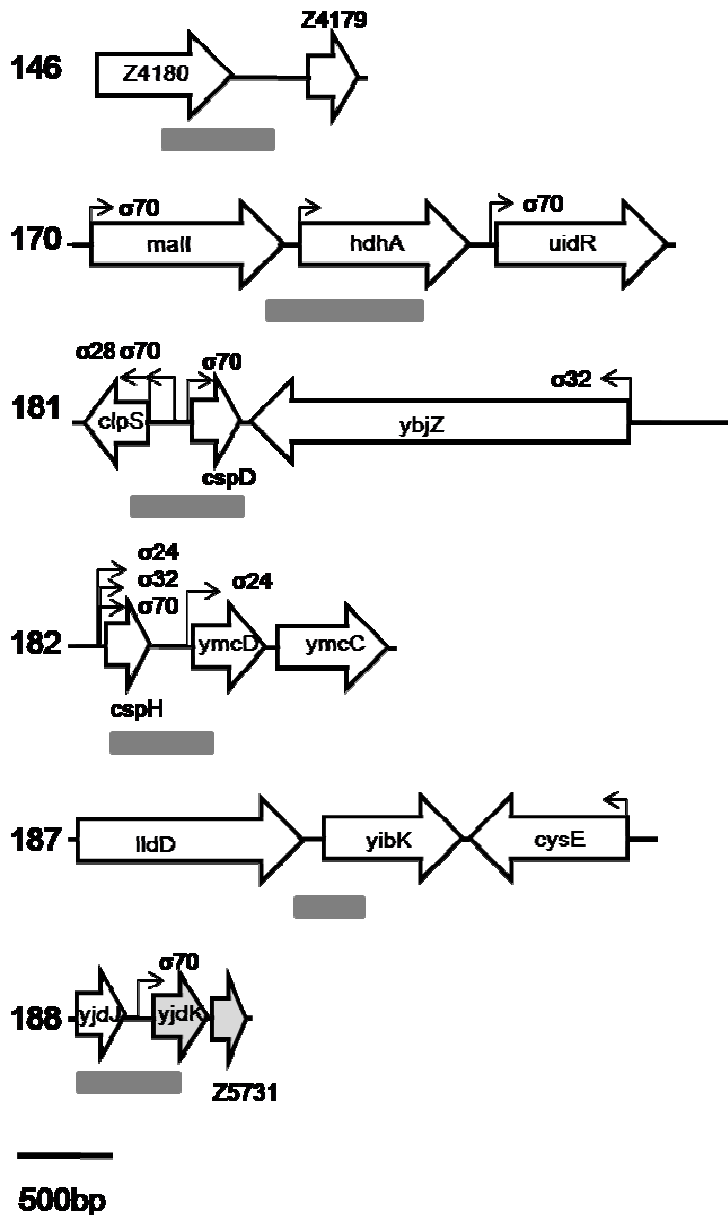


Abbildung 4.10: Darstellung der inserierten EDL933-Fragmente in den *ivi*-Plasmiden. Abgebildet sind die Fragmente als graue Balken mit den zugehörigen Genen und deren Umgebung. Die Promotoren sind als Pfeile dargestellt und wurden aus dem *E. coli* Stamm K-12, soweit das entsprechende Gen dort bekannt war, übernommen.

Fortsetzung **Abbildung 4.10:**



Fortsetzung **Abbildung 4.10:**



Weiterhin konnte zwei Mal der Promotor von *yaiN* (*ivi* 124) gefunden werden. Das Gen kodiert den putativen Regulator FrmR, der ein Formaldehyd-degradierendes Operon reguliert (siehe Abbildung 4.10). Z2091 (*ivi* 139) kodiert ebenfalls einen hypothetischen Regulator. Der Promotor wurde, wie aus der Tabelle 4.6 hervorgeht, ein Mal identifiziert. Dieser Transkriptions-Regulator wird mit DicC im Stamm K-12 bezeichnet. Mit der Zellteilung konnte ebenso der Zellteilungsmodulator CedA, kodiert durch Z2760 (*ivi* 130), in Verbindung gebracht werden. Der Promotor von Z2760 wurde ein Mal gefunden.

yibK (*ivi* 187) kodiert eine putative tRNA/rRNA Methyltransferase. Der Promotor konnte unter den gewählten Bedingungen zwei Mal ermittelt werden. Im Stamm K-12 wird das entsprechende Gen mit *trmL* bezeichnet. Wie aus der Abbildung 4.10 und der Tabelle 4.6 hervorgeht, wurde zwei Mal der Promotor von *yohM* (*ivi* 63), im Stamm K-12 bekannt als *rcnA*, gefunden. Das Gen kodiert das putative Nickel/Kobalt- Effluxprotein RcnA. Z2716 (*ivi* 18), dessen Promotorregion hier ebenfalls zwei Mal durch Sequenzvergleich ermittelt werden konnte, kodiert wie *yohM* ein putatives Membranprotein der inneren Zellmembran und ist homolog zu *ydiK* im Stamm K-12.

Wie in Tabelle 4.6 zu erkennen ist, konnten zwei von fünf Genen nur einer bisher unbekanntem Funktion im Stamm EDL933 zugeordnet werden. Auch im Vergleich mit dem Stamm K-12 konnte keine Funktion identifiziert werden. Es handelte sich um die vier bzw. zwei Mal identifizierten Gene *yjdK* (*ivi* 188) und Z4179 (*ivi* 146). Das dritte Gen *yciC* (*ivi* 29) kodiert vermutlich ein Membranprotein der inneren Zellmembran und *yggX* (*ivi* 131) scheint ein Protein zu kodieren, das andere Proteine gegen oxidativen Stress schützt. Die Promotoren der beiden Gene konnten jeweils drei Mal gefunden werden. Der Promotor des Gens *ymcD* (*ivi* 182), dargestellt in Abbildung 4.10, konnte ein Mal gefunden werden. *ymcD* gehört im Stamm K-12 zu einem Operon, das aufgrund einer Insertion in der Promotorregion nicht exprimiert wird.

Zwei der klonierten EDL933-Fragmente trugen einen Promotor in reverser Orientierung (siehe Tabelle 4.6 und Abbildung 4.10). Die zugehörigen Gene kodierten für die Proteine *Atpl* (*ivi* 12) und *HlyB* (*ivi* 75). *Atpl* stellt eine Untereinheit des F0F1 ATPase-Komplexes dar und *HlyB* ist ein Hämolysintransportprotein. Trotz der reversen Orientierung der Promotoren konnten die zugehörigen Plasmide unter den hier gewählten Bedingungen sechs bzw. zwei Mal gefunden werden.

Wie in der Abbildung 4.10 zu erkennen ist, konnte in einer Sequenz keine offensichtliche Promotorregion identifiziert werden. Hier wurde ein Teil aus der Mitte des *yjcC* Gens (*ivi* 64) identifiziert, das ein putatives Signaltransduktionsprotein kodiert. Obwohl keine Promotorregion zu erkennen war, konnte das *ivi*-Plasmid fünf Mal gefunden werden.

Insgesamt konnte in diesem IVET-System, basierend auf dem Vektor pAK-1, eine Anreicherung von Klonen und die Identifizierung von zahlreichen Promotoren und

den zugehörigen Genen erzielt werden. Die Methode der IVET wurde somit erfolgreich in der Matrix Hackfleisch etabliert und angewendet.

4.3 Untersuchungen zur Fitness von STEC-Stämmen in Rinderhackfleisch

EHEC vom Serotyp O157:H7 sind als Verursacher des hämolytisch-urämischen Syndroms beim Menschen durch den Verzehr unzureichend gegarten Hackfleisches bekannt. Auch Infektionen mit EHEC der Serogruppen O26, O45, O111, O103, O121 und O145 können zu diesem Krankheitsbild führen [Brooks *et al.*, 2005]. STEC dieser Serogruppen können jedoch nicht nur aus den Fäzes erkrankter Personen isoliert werden, sondern auch aus Tierfäzes oder Lebensmitteln (LM). Deshalb wurde hier zum einen der Frage nachgegangen, ob Unterschiede in der Fitness von pathogenen Isolaten aus Patienten mit HUS-Erkrankung, Isolaten aus LM mit tierischem Ursprung und Isolaten aus Tieren im Risikolebensmittel Rinderhackfleisch gefunden werden können und ob zum anderen HUS-Isolate in dieser Matrix eine höhere Konkurrenzfähigkeit gegenüber Isolaten anderer Herkunft besitzen. Insgesamt wurden in dieser Studie 23 STEC-, EHEC- und EPEC-Isolate aus den mit HUS-Ausbrüchen assoziierten Serogruppen O26, O103 und O157 für die Versuche verwendet. Elf der Isolate stammten aus Fäzes von Patienten mit HUS-Erkrankung, vier Isolate aus Tier-Fäzes und sieben Isolate aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Es wurden dabei lediglich tierische Isolate der Serogruppe O103 untersucht. Eine ausführliche Auflistung der Isolate mit dem entsprechenden Serotyp und der Herkunft kann der Tabelle 4.7 entnommen werden. Die hier gewählten Versuchstemperaturen simulierten im Rahmen der Versuchsmöglichkeiten annähernd die Bedingungen, denen die Bakterien während der Lagerung und Verarbeitung des Lebensmittels ausgesetzt werden.

4.3.1 Nachweis von STEC in keimreduziertem Rinderhackfleisch

Zunächst wurde sichergestellt, dass das in den Versuchen verwendete keimreduzierte Rinderhackfleisch (siehe Abschnitt 3.4) frei von Shiga Toxin-bildenden *E. coli* war, da diese die Ergebnisse hätten beeinflussen können. Hierzu wurde das Hackfleisch für sechs Stunden in mTSB-Medium angereichert, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Der Positivkontrolle wurde vor der Anreicherung der *E. coli* Stamm EDL933 und der Negativkontrolle der *E. coli* Stamm C600 zugefügt. Die abschließende Standard-PCR zur Ermittlung der Anwesenheit des *stx*₁ bzw. *stx*₂ in den Anreicherungen wurde mit den Oligonukleotidpaaren KS7/KS8 und LP43/LP44 aus Tabelle A5 durchgeführt. In Abbildung 4.11 ist das Ergebnis der Anreicherung bzw. der abschließenden PCR am Beispiel des *stx*₂ dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass *stx*₂ in den beiden Positivkontrollen mittels PCR nachgewiesen werden konnte. In den Hackfleischproben und den Negativkontrollen konnte das Gen nicht detektiert werden. Ebenso verlief die Überprüfung des *stx*₁ positiv in den Kontrollen, jedoch negativ in den Hackfleischproben. Demnach konnte aufgrund dieser Anreicherung angenommen werden, dass das hier verwendete keimreduzierte Rinderhackfleisch nicht mit Stx-bildenden Stämmen kontaminiert war und für die Durchführung der Versuchsreihe verwendet werden konnte. Parallel wurde zudem eine Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl der im Fleisch enthaltenen autochthonen Mikrobiota, beschrieben in Abschnitt 3.4.1, vor Versuchsbeginn durchgeführt. Da auf dem SMAC-Medium keine Keime gewachsen waren, konnte die Bestimmung der Gesamtkeimzahl lediglich anhand des LB-Mediums vorgenommen werden. Weiterhin konnte hierdurch die Annahme bestärkt werden, dass das vorliegende Hackfleisch frei von STEC war. Die aerobe Keimzahl konnte mit $5,9 \times 10^3$ KbE/g Hackfleisch bestimmt werden. In allen folgenden Versuchen wurde diese Hackfleisch-Charge eingesetzt.

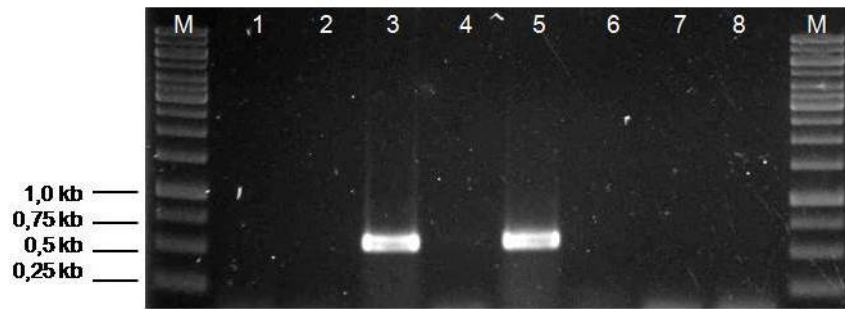


Abbildung 4.11: Überprüfung des keimarmen Hackfleisches (HF) auf STEC mittels PCR am Beispiel des *stx*₂. Dargestellt sind die Banden der PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel bei einer Spannung von 100 V für 1,5 h und Anfärben mit Ethidiumbromid. M: 1 kb DNA-Ladder; 1: HF-Probe 1 ; 2: HF-Probe 2; 3: Positivkontrolle HF (*E. coli* Stamm EDL933); 4: Negativkontrolle HF (*E. coli* Stamm C600); 5: Positivkontrolle (*E. coli* Stamm EDL933); 6: Negativkontrolle (*E. coli* Stamm C600); 7: Kontrolle NaCl; 8: Kontrolle H₂O.

4.3.2 Charakterisierung der verwendeten *E. coli*-Stämme

Es ist bekannt, dass in Stämmen gleicher Serogruppe eine unterschiedliche Genausstattung vorliegen kann, was u.a. die hohe Variabilität der STEC auszeichnet [Creuzburg *et al.*, 2011]. Aus diesem Grund wurden die hier ausgewählten Isolate auf die Anwesenheit von verschiedenen Virulenzfaktoren und das O-Antigen der Serogruppe O157 mittels Standard-PCR mit den in Tabelle A5 aufgeführten Oligonukleotiden untersucht. Neben den beiden *stx*-Genen wurden die Stämme auf das Vorhandensein der Plasmid-kodierten Gene *espP* und *subAB* und der chromosomal-kodierten Gene *iha*, *nleD*, *cdtV*, *cif*, *eae* und *espM* untersucht. Sechs Stämme gehörten der Serogruppe O26, elf Stämme der Serogruppe O103 und sechs Stämme der Serogruppe O157 an. Das Ergebnis der PCR-Analysen wurde weiterhin durch eine Dot-Blothybridisierung mit den PCR-Produkten als Sonden-DNA bestätigt (siehe Abschnitt 3.3.11). Lag ein negatives PCR-Ergebnis vor, in der Hybridisierung konnte das entsprechende Gen jedoch detektiert werden, so wurde angenommen, dass dieses in dem untersuchten Stamm vorlag. Ein Beispiel für die Dot-Blothybridisierung kann der Abbildung 4.12 entnommen werden. Hier zeigte eine Blaufärbung während der Detektion ein positives Ergebnis an, *iha* konnte in den entsprechend positiven Stämmen nachgewiesen werden. Eine Auflistung der

untersuchten Stämme und Pathogenitätsfaktoren und die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 4.7 zusammengefasst. Die Untersuchungen einiger Stämme mittels PCR wurde bereits am Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster durchgeführt und sind in der Tabelle 4.7 gekennzeichnet

Wie der Tabelle 4.7 zu entnehmen ist, trugen die hier verwendeten *E. coli*-Stämme der Serogruppen O26 und O157 bis auf den O157:H7 Stamm EDL933, der beide Toxine beinhaltet, nur *stx*₂. Der O157:H7 Stamm TS10/08 hatte das *stx*₂ bereits vor Versuchsbeginn verloren [Slanec *et al.*, 2009]. Während die drei EPEC O103 Stämme E22, 889 und CA92-7164, wie erwartet, keines der beiden Toxine beinhaltet haben, waren fünf andere O103 Stämme positiv für *stx*₁ und drei Stämme positiv für *stx*₂.



Abbildung 4.12: Dot-Blothybridisierung mittels DIG-markierter *iha*-spezifischen DNA-Sonde. Aufgetragen wurden 500 ng genomische DNA folgender *E. coli*-Stämme: 1: 4993/96; 2: E07/236; 3: E08/233; 4: E09/264; 5: LM14957/08; 6: 626/98; 7: E02/753; 8: E06/329; 9: E06/332; 10: LM15814/08; 11: LM15255/07; 12: HBI/01; 13: RW1374; 14: E22; 15: GSO740-1; 16: 889; 17: CA92-7164; 18: 2492/00; 19: E09/10; 20: E09/89; 21: E09/185; 22: TS10/08; 23: EDL933; 24: Negativkontrolle (*E. coli* Stamm C600); 25: Positivkontrolle (50 ng *iha*-PCR-Produkt)

Innerhalb der Serogruppe O26 waren alle verwendeten Stämme positiv für *cif*, *eae*, *espM* und *iha*, wie aus der Tabelle 4.7 hervorgeht. Lediglich der O26:H⁻ Stamm 626/98 besaß neben dem *stx*₂ kein weiteres der hier untersuchten Gene. Für *cdtV*, *espP*, *subAB* und *rfbEO157* konnte kein Produkt detektiert werden und auch die Hybridisierung verlief negativ. Weiterhin waren alle Stämme dieser Serogruppe, mit Ausnahme des O26:H⁺ Stammes E07/236, negativ für *nleD*.

Wie aus der Tabelle 4.7 hervorgeht, war innerhalb der zweiten Serogruppe O103 die Verteilung der Gene *cif*, *eae*, *espM* und *nleD* heterogen. Acht der elf Stämme waren positiv für *cif*, neun positiv für *eae*, sieben positiv für *espM* und sechs positiv für *nleD*. *subAB* konnte lediglich in dem O103:H28 Stamm LM15255/07 nachgewiesen werden, *iha* und *espP* lediglich in dem O103:H2 Stamm HBI/01. Alle Stämme dieser Serogruppe waren negativ für *cdtV*, *espP* und *rfbEO157*.

Die Genverteilung innerhalb der Serogruppe O157 zeigte, wie in Tabelle 4.7 zu erkennen ist, ein mehr einheitliches Bild. Da das *rfbEO157*-Gen für das O-Antigen dieser Serogruppe kodiert, konnte es in den sechs Stämmen dieser Serogruppe detektiert werden. Alle O157 Stämme ergaben ein positives Ergebnis für *eae*, *espM* und *nleD*, jedoch nicht für *subAB*. Die O157:H⁻ Stämme 2492/00 und E09/10 waren negativ für *espP* und *iha*, jedoch im Gegensatz zu den anderen Stämmen positiv für *cdtV* getestet worden. Ausschließlich in den Stämmen E09/10 und E09/89 konnte *cif* nachgewiesen werden.

Da der O103:H7 Stamm CA92-7164 negativ für alle hier getesteten Pathogenitätsfaktoren war, wurde er nicht in die nachfolgenden Versuche eingesetzt. Basierend auf den erlangten Ergebnissen konnten entsprechende DNA-Sonden zum Nachweis der Stämme in der nachfolgenden Koloniehybridisierung gewählt werden. Hier wurden DNA-Sonden der Gene *stx*_{1/2}, *cdtV*, *cif*, *iha* und *rfbEO157* verwendet.

Ergebnisse

Tabelle 4.7: Verwendete *E. coli*-Stämme mit Serotyp, Herkunft, Krankheit und PCR- bzw. Southern Blot-Ergebnissen

Stamm	Serotyp	Herkunft	Krankheit	Shiga Toxine		Plasmid-kodiert		chromosomal-kodiert						
				<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>espP</i>	Sub AB	<i>cdtV</i>	<i>cif</i>	<i>eae</i>	<i>espM</i>	<i>iha</i>	<i>nleD</i>	<i>rfbE</i> O157
4993/96	O26:H ⁻	Human	HUS	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
E07/236	O26:H ⁺	Human	HUS	-*	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-*
E08/233	O26:H11	Human	HUS	-*	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-*
E09/264	O26 [#]	Human	HUS	-*	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-*
LM14957/08	O26:H11	Wildschwein- keule	unbekannt	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
626/98	O26:H ⁻	Fleisch	unbekannt	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E02/753	O103 [#]	Human	HUS	+	-*	-	-	-	+	+	+	-	+	-*
E06/329	O103:H ⁺	Human	HUS	-*	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-*
E06/332	O103 [#]	Human	HUS	-*	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-*
LM15814/08	O103:H2	Rehgulasch	unbekannt	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
LM15255/07	O103:H28	Rehgulasch	unbekannt	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HBI/01	O103:H2	Fleisch	unbekannt	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
RW1374	O103:H2	Kalb	AS	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
E22	O103:H2	Kaninchen	Diarrhöe	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
GSO740-1	O103:H2	Rind	AS	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
889	O103:H2	Huhn	Diarrhöe	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
CA92-7164	O103:H7	Hund	Diarrhöe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2492/00	O157:H ⁻	Human	HUS	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
E09/10	O157:H ⁻	Human	HUS	-*	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
E09/89	O157:H ⁺	Human	HUS	-*	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
E09/185	O157 [#]	Human	HUS	-*	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TS10/08	O157:H7	Hackfleisch	unbekannt	-	¹	+	-	-	-	+	+	+	+	+
EDL933	O157:H7	Rinderhack- fleisch	HUS	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

*PCR wurde am Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster durchgeführt.

[#]Serotyp unbekannt; ¹verloren; AS: asymptomatisch

4.3.3 Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung der *E. coli*-Stämme in Rinderhackfleisch

Für die vergleichenden Wachstumsversuche im Hackfleisch wurde für die Detektion der eingesetzten *E. coli*-Stämme nach der Inkubation die Methode der Kolonie-Hybridisierung (siehe Abschnitt 3.3.11) gewählt. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen *in situ* nachweisen zu können. Nach erfolgter Lyse der Zellen wurde die bakterielle DNA direkt an eine Nylonmembran fixiert, störende Zellbestandteile entfernt und die Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde konnte erfolgen. Ein Beispiel für die Koloniehybridisierung ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Eine Blaufärbung während der Detektion zeigte ein positives Ergebnis an, das entsprechende Gen konnte detektiert werden.

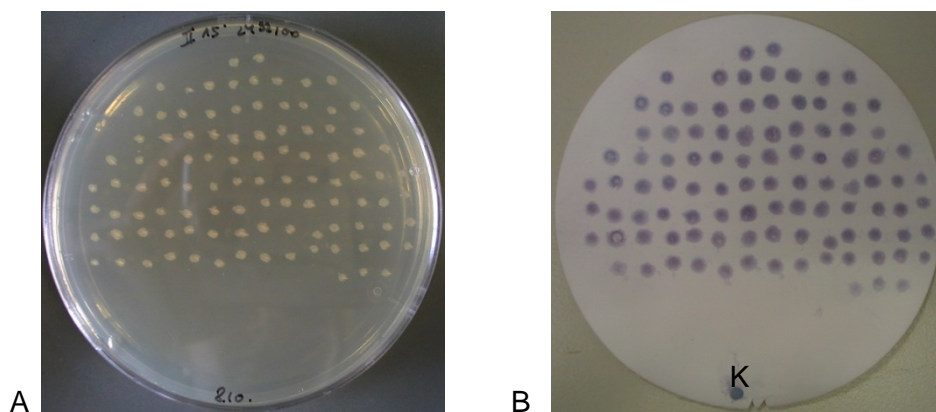


Abbildung 4.13: Koloniehybridisierung am Beispiel von *E. coli* O157:H⁻ Stamm 2492/00 mit einer DIG-markierten *rfbEO157*-spezifischen DNA-Sonde. A) LB-Medium mit den überimpften Einzelkolonien aus der Isolierung; B) Membran der Koloniehybridisierung basierend auf einer DIG-markierten DNA-Sonde. K: Positivkontrolle (50 ng *rfbEO157*-PCR-Produkt)

Das Wachstum der Isolate unterschiedlicher Herkunft im Rinderhackfleisch wurde zunächst für fünf Stunden bei 37°C, der optimalen Wachstumstemperatur von *E. coli*, durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 Stunden bei 15°C und 20°C als Annäherung an die Lagerungsbedingungen von Hackfleisch bei unzureichender Tiefkühlung oder unterbrochener Kühlkette bzw. bei Raumtemperatur.

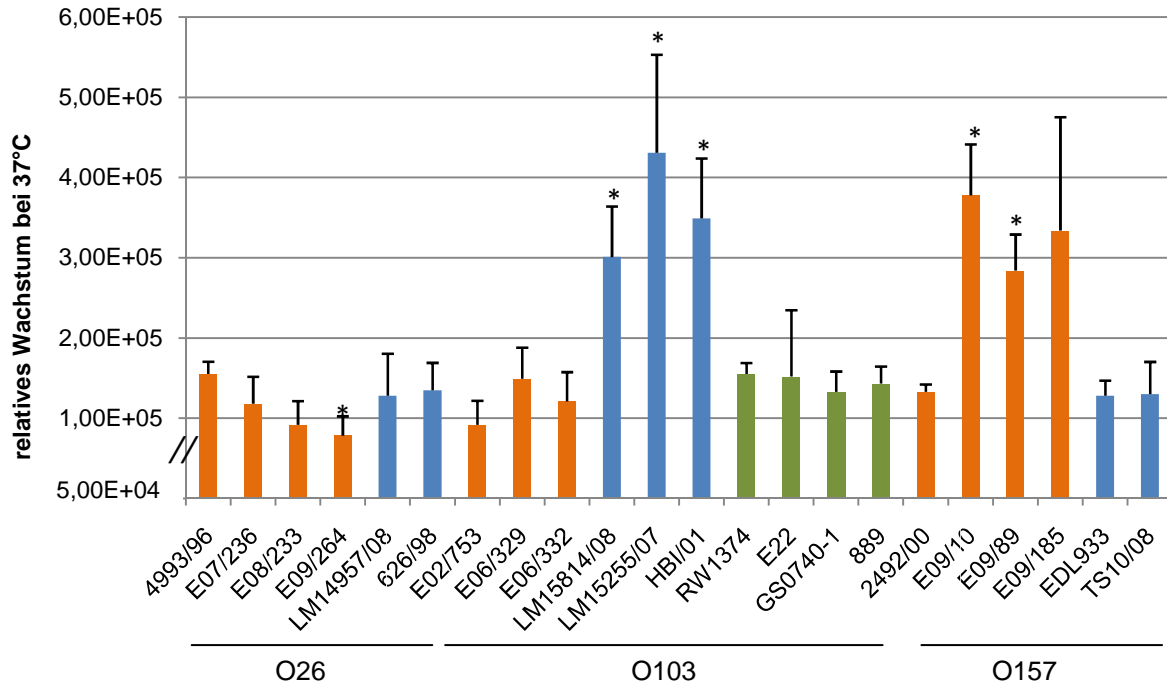
Übernachtskulturen der Stämme wurden in LB-Medium verdünnt und unter Standardbedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. 100 (+/-20) KbE/g wurden in das Hackfleisch inokuliert und für die entsprechende Zeit inkubiert, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben. Nach der Isolierung der Bakterien aus dem Hackfleisch wurde eine Kolonie-Hybridisierung mit den bereits oben aufgeführten Sonden durchgeführt, um die eingesetzten Stämme identifizieren und quantifizieren zu können.

Aus den erlangten Werten wurde anschließend das relative Wachstum der Stämme im Hackfleisch ermittelt (Quotient aus der Isolierung und dem entsprechenden Wert der Inokulation). Das relative Wachstum (y-Achse) ist für die jeweiligen Stämme (x-Achse) in Abbildung 4.14 dargestellt. Hierbei wurden die HUS-Isolate in rot, die LM-Isolate in blau und die Tier-Isolate in grün dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen und den daraus resultierenden stark voneinander abweichenden Werten des relativen Wachstums, wurde auf eine einheitliche y-Achse verzichtet, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen innerhalb einer Temperatur optisch deutlicher darzustellen zu können. Die detaillierten Zahlenwerte der folgenden Versuche sind im Anhang A6 aufgeführt. Der O157:H7 Stamm EDL933 wurde in den Versuchen als Referenzstamm genutzt, um mögliche signifikante Unterschiede bestimmen zu können.

In Abbildung 4.14 fällt direkt auf, dass nach der Inkubation der Stämme in Hackfleisch bei einer optimalen Temperatur von 37°C ein signifikant stärkeres Wachstum der Lebensmittelisolate der Serogruppe O103 im Vergleich zum Stamm EDL933 verzeichnet werden konnte. Auch zeigten drei der vier HUS-Isolate der Serogruppe O157 ein signifikant erhöhtes Wachstum bei dieser Temperatur. Der O26 Stamm E09/264 zeigte im Gegensatz dazu als einziger Stamm ein signifikant schlechteres Wachstum, die übrigen Stämme wiesen nur geringe Unterschiede in ihrem Wachstum auf.

Ergebnisse

A



B

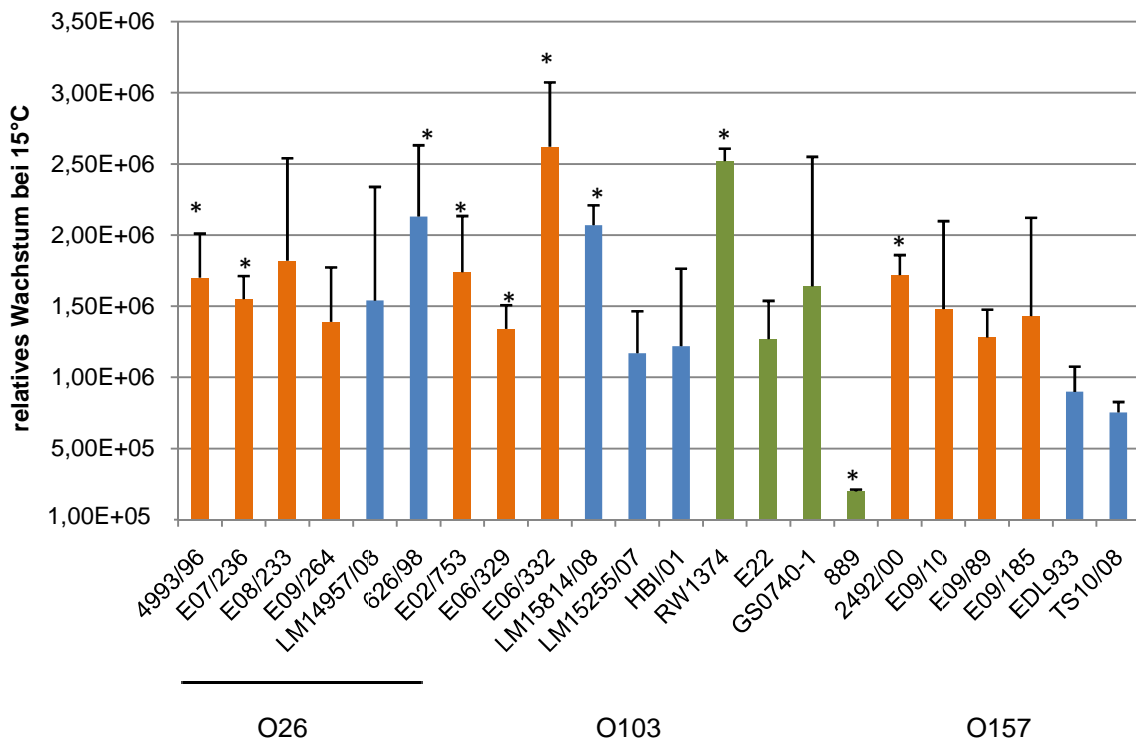
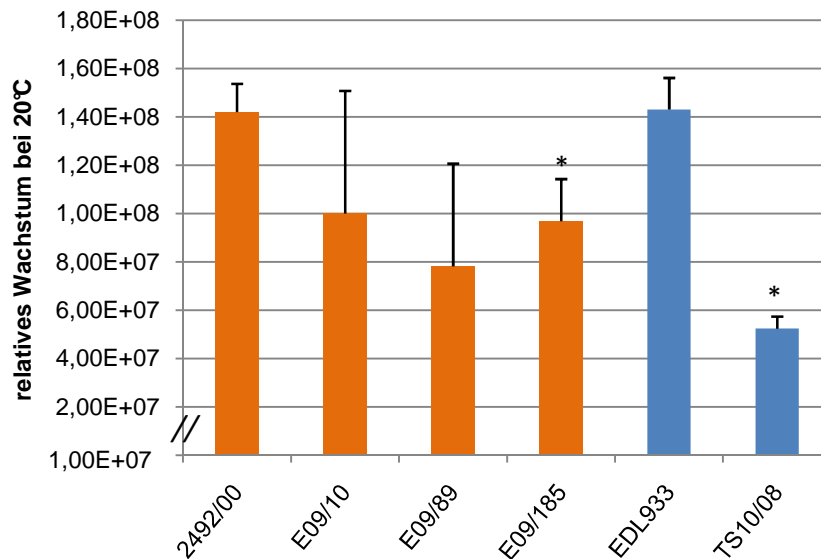


Abbildung 4.14: Relatives Wachstum der eingesetzten *E. coli*-Stämme in keimreduziertem Rinderhackfleisch bei verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten. A) fünf Stunden, 37°C; B) 48 Stunden, 15°C; C) 48 Stunden, 20°C. Die mit einem Stern gekennzeichneten Stämme weisen einen signifikanten Unterschied zum Stamm EDL933 auf.

Fortsetzung **Abbildung 4.14.**

C



Die nachfolgende Inkubation der Stämme bei einer erniedrigten Temperatur von 15°C, einer Annäherung an die Lagerungsbedingungen im Kühlschrank bzw. einer unterbrochenen Kühlkette, ergab einen heterogenen Effekt auf das Wachstum der eingesetzten Stämme wie in Abbildung 4.14 zu erkennen ist. Der O103 Stamm 889 zeigte ein signifikant erniedrigtes Wachstum, wohingegen die O26 Stämme 4993/96, E07/236 und 626/98, die O103 Stämme E02/753, E06/329, E06/332, LM15814/08 und RW1374 und der O157 Stamm 2492/00 mit unterschiedlicher Herkunft ein signifikant erhöhtes Wachstum im Vergleich zum O157:H7 Stamm EDL933 zeigten. Insgesamt konnte mit Ausnahme des O103 Stammes 889 ein tendenziell stärkeres Wachstum im Vergleich zur Referenz bei dieser Temperatur festgestellt werden.

Da basierend auf den erlangten Ergebnissen innerhalb der Serogruppe O157 der Hinweis auf ein stärkeres Wachstumsvermögen der HUS-Isolate gegenüber der aus Lebensmitteln isolierten Stämme vorlag, wurde diese Gruppe zusätzlich bei Raumtemperatur untersucht. Nach der Inkubation für 48 Stunden bei 20°C konnte jedoch kein einheitliches Ergebnis erzielt werden, wie aus der Abbildung 4.14 hervorgeht. Das HUS-Isolat E09/185 und das LM-Isolat TS10/08 zeigten ein signifikant schlechteres Wachstum im Vergleich zum Stamm EDL933 bei dieser Temperatur auf.

Die übrigen Stämme ergaben hier keine signifikanten Abweichungen in ihrem Wachstum. Insgesamt konnte jedoch der Hinweis auf eine gesteigerte Fitness des Stammes EDL933 gegenüber drei der vier HUS-Isolate bei dieser Temperatur gefunden werden.

4.4 Bakteriozinbildung der verwendeten *E. coli*-Stämme

STEC verschiedener Serogruppen sind bekannt für die Produktion eines oder mehrerer Colizine. Hierzu zählen u.a. die Serogruppen O26, O103 und O157, die in dieser Arbeit im Vordergrund standen [Bradley, 1991; Hofinger *et al.*, 1998; Karma *et al.*, 2008]. Es konnte bereits die Vermutung aufgestellt werden, dass die Bildung solcher Substanzen den pathogenen Bakterien einen Vorteil bei der Besiedlung des Darms durch Inhibierung der natürlichen Darmflora verschaffen kann [Hofinger *et al.*, 1998]. Um die in dieser Arbeit verwendeten Stämme, detailliert aufgelistet in Tabelle 4.7, weiter charakterisieren und ihr Potential zur Ausbildung einer Infektion abschätzen zu können, wurde die Bakteriozinbildung untersucht. Hierbei wurde lediglich bestimmt, ob eine hemmende Substanz gebildet wurde, ohne die Substanz näher zu bestimmen oder festzustellen, wie viele hemmende Substanzen gebildet wurden. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, Übernachtkultur der zu testenden Stämme in LB-Medium verdünnt und unter Standardbedingungen bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurde den Kulturen 0,5 µg/ml Norfloxacin zugegeben, um die Bakteriozinbildung zu induzieren, und nochmals für vier Stunden inkubiert. Der sterilfiltrierte Überstand wurde auf LB-Medium aufgegeben, das mit dem *E. coli* Stamm K-12 überschichtet war. Die Ergebnisse des Hemmhoftests können der Tabelle 4.8 entnommen werden. Um sicherzustellen, dass die Hemmung des Teststammes aufgrund eines gebildeten Bakteriozins stattfand und nicht durch die Induktion von Bakteriophagen infolge der Behandlung mit Norfloxacin, wurden zudem LB-Medium mit dem sterilen Überstand und dem Teststamm zusammen überschichtet. Ein Beispiel für den Hemmhoftest kann der Abbildung 4.15 entnommen werden. Hier zeigte die Bildung eines Hofes um die Plättchen herum ein positives Ergebnis an. Es wurde mindestens eine hemmende Substanz von den jeweiligen Isolaten aus Patienten mit HUS-Erkrankung auf dem Teststamm K-12 gebildet.

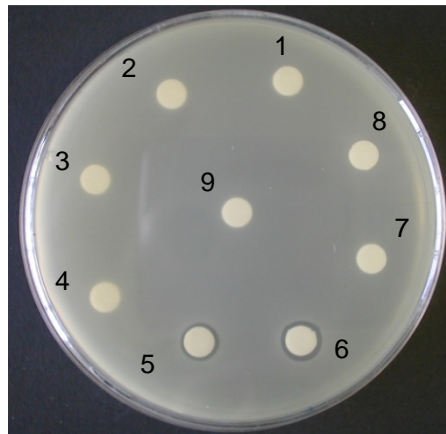


Abbildung 4.15: Hemmhoftest am Beispiel von neun pathogenen Isolaten aus Patienten mit HUS-Erkrankung aufgetragen auf den Teststamm *E. coli* K-12. 1: E07/236; 2: E08/233; 3: E09/264; 4: E02/753; 5: E06/329; 6: E06/332; 7: E09/10; 8: E09/89; 9: E09/185.

Wie aus der Tabelle 4.8 hervorgeht, konnte bei acht der 23 Isolate ein Hemmhof erkannt werden. Die Anwesenheit eines Bakteriozins wurde in der Tabelle festgehalten, jedoch nicht dessen Quantität oder die Anzahl an gebildeten hemmenden Substanzen. Weiterhin wurde nicht bestimmt, ob es sich um Colizine oder Mikroazine handelte.

Die O26 Stämme 4993/96 und LM14957/08, die O103 Stämme E06/329, E06/332, LM15255/07, HBI/01 und RW1374 und der O157 Stamm 2492/00 haben trotz diverser Herkunft und Serogruppe ein oder mehrere Bakteriozine gebildet. Für die übrigen Isolate konnte optisch kein Hemmhof festgestellt werden. Der Test auf Bakteriophagen (siehe Abschnitt 3.2.2) ergab bei keinem der Stämme Plaques im Plaquetest. Somit konnten induzierte Phagen als Verursacher der Hemmhöfe ausgeschlossen werden. Eine weitere Beurteilung der gebildeten Substanz bzw. Substanzen erfolgte nicht.

Ergebnisse

Tabelle 4.8: Hemmhoftest: Bildung einer Bakteriozins durch die verwendeten Stämme. Angegeben wird die Bildung von mind. einem hemmenden Stoff durch + und die Abwesenheit eines hemmenden Stoffes durch -.

Serogruppe	Stamm	Hemmung <i>E. coli</i> K-12
O26	4993/96	+
	E07/236	-
	E08/233	-
	E09/264	-
	LM14957/08	+
	626/98	-
O103	E02/753	-
	E06/329	+
	E06/332	+
	LM15814/08	-
	LM15255/07	+
	HBI/01	+
	RW1374	+
	E22	-
	GS0740-1	-
	889	-
	CA92-7164	-
O157	2492/00	+
	E09/10	-
	E09/89	-
	E09/185	-
	EDL933	-
	TS10/08	-

5 Diskussion

Enterohämorrhagische *E. coli* O157:H7 sind als Verursacher schwerer Erkrankungen bekannt. Die Übertragung dieses Zoonoseerregers auf den Menschen erfolgt dabei in erster Linie durch unzureichend gegartes Rinderhackfleisch und andere Produkte bovinen Ursprungs. Während des Zerkleinerungsverfahrens von Fleisch, z.B. zu Hackfleisch, können pathogene Bakterien von der Oberfläche des Fleisches in das Innere des zerkleinerten Produktes gelangen und sind dort u.a. vor Hitze während des Garens, vor allem bei unzureichender Temperatur, geschützt [Shen *et al.*, 2011]. Studien über das Transkriptom der *E. coli* O157:H7 wurden bereits mittels Microarray- oder Proteomanalysen durchgeführt, um einen Einblick zu erlangen, wie diese Pathogene in tierischen Wirten oder Lebensmittel-imitierenden Medien überleben und sich vermehren [Dudley, 2008]. Eine Studie der Genexpression in komplexen Lebensmittel-Matrizes erfolgte bislang jedoch nicht. Von großem Interesse ist deshalb die Aufklärung der bakteriellen Genexpression während der Persistenz und Vermehrung im Lebensmittel, da hieraus wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung effektiver Strategien zur Kontrolle der Pathogenen im Lebensmittel gewonnen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 mit Hilfe der *In vivo*-Expressionstechnologie in Rinderhackfleisch untersucht, um einen Einblick in das Transkriptom des Stammes als Vertreter dieser Gruppe von Pathogenen in dem Risikolebensmittel zu erlangen. Da die Bakterien nicht nur aus den Fäzes von erkrankten Personen isoliert werden können, sondern auch aus den Fäzes von Tieren und aus Lebensmitteln, wurde in dieser Arbeit ein weiteres Augenmerk auf die Vermehrung von Stämmen gleicher Serogruppe jedoch unterschiedlicher Herkunft in Hackfleisch gelegt. Die vorliegende Arbeit liefert daher im Weiteren eine ausführliche Studie über das Wachstum von 23 Stämmen der Serogruppen O26, O103 und O157 in der Matrix Rinderhackfleisch. Dabei wurde der Schwerpunkt auf den Einfluss verschiedener Temperaturen gelegt. Abschließend wurden die Stämme auf die Bildung von Bakteriozinen untersucht.

5.1 *In vivo*-Expressionstechnologie

Für die Identifikation von bakteriellen Genen, die unter bestimmten Umwelteinflüssen exprimiert werden, können verschiedene Methoden verwendet werden. In der Biochemie, der Immunologie und der Zellbiologie wurden bereits Untersuchungen angestellt, um die dynamische Wirt-Parasit-Interaktion im Hinblick auf die Signaltransduktion und die damit zusammenhängende Expression von Virulenzfaktoren zu analysieren [Mekalanos, 1992]. Eine der Möglichkeiten, den genetischen Hintergrund eines Pathogens in einer bestimmten Umgebung zu analysieren, beschreibt die *In vivo*-Expressionstechnologie. Diese Methode wurde in dieser Arbeit gewählt, da sie neben der Signaturmarkierten Mutagenese (STM) die einzig etablierte Strategie ist, die eine Untersuchung der Genexpression in einem lebendigen tierischen Wirt oder in komplexen Umgebungen zulässt. Zudem ist ein bedeutender Vorteil der Methode, dass sie einfach in der Handhabung ist [Angelichio und Camilli, 2002; Dudley, 2008]. Khan und Isaacson [2002] konnten erfolgreich zeigen, dass mit Hilfe dieser Methode unter 85 *in vivo*-induzierten Genen physiologisch wichtige und Virulenz-assoziierte Gene gefunden werden können, die einen pathogenen *E. coli*-Stamm befähigen, sich effektiv im Gewebe des infizierten Wirtes behaupten zu können. Sie verwendeten für ihre Studien im Mausmodell ein humanes *E. coli*-Isolat der Serogruppe O25 eines an Sepsis erkrankten Patienten. Weiterhin konnten Hufner und seine Kollegen [2007] eine ähnliche Variante der Methode in einem Rohwurstmodell anwenden, um die Genexpression von *Lactobacillus sakei* während des Fermentationsprozesses zu untersuchen. Sie fanden 15 *in vivo*-induzierte Gene des Stammes, von denen einige mit dem Stress der Zelle assoziiert werden konnten. Die Plasmid-basierte IVET konnte weiterhin erfolgreich in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [Mahan *et al.*, 1995], in *Pasteurella multocida* [Hunt *et al.*, 2001], in *Vibrio cholerae* [Lombardo *et al.*, 2007] und in *Yersinia enterocolitica* [Young und Miller, 1997] in verschiedenen Wirten angewendet werden. Basierend auf den erwähnten Studien wurde die IVET in dieser Arbeit verwendet, um die Genexpression des *E. coli* Stammes EDL933 als Vertreter der bedeutenden Serogruppe O157 während der Persistenz und Vermehrung in einem Hackfleischmodell unter erhöhten Temperaturen zu studieren.

In dem zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten IVET-System in Rinderhackfleisch wurde der Promotor-Selektionsvektor pKK232-8 mit einer promotorlosen Chloramphen-

nicolresistenz als Selektionsmarker verwendet, der ebenfalls der Studie von Khan und Isaacson [2002] zugrunde lag. Für den Versuch wurde eine Inkubationstemperatur von 42°C festgelegt. Diese Temperatur stellte eine Annäherung an die beim Garen von Hackfleisch zugrunde liegende Temperatur dar. Für *E. coli* O157:H7 konnte bereits gezeigt werden, dass das Erhitzen von Rindfleischprodukten auf eine Kerntemperatur von 60-65°C zu einer wirksamen Inaktivierung der Bakterien führte [Shen *et al.*, 2011]. Da das IVET-System auf der Vermehrung von Zellen beruht, konnte in diesem Zusammenhang dem Versuch keine realistische Temperatur zugrunde gelegt werden. Diese hätte zu einer Inaktivierung der Zellen geführt, was die Auswertung des Versuchs negativ beeinflusst hätte. Es ist bekannt, dass ein uneingeschränktes Wachstum von *E. coli* bis zu einer maximalen Temperatur von ungefähr 49°C gewährleistet ist [Lüders *et al.*, 2009]. Aus den genannten Gründen wurde die Temperatur auf 42°C festgelegt.

Eine Anreicherung von Genbank-Klonen und den damit zusammenhängenden rekombinanten Plasmiden konnte in dieser Studie unter den gewählten Bedingungen in Hackfleisch bei einer Temperatur von 42°C mit dem Vektor pKK232-8 nicht erreicht werden. Khan und Isaacson [2002] konnten zeigen, dass die Verwendung des Vektors in einem Mausmodell zu einer Anreicherung von zahlreichen Klonen und damit zu einer Identifizierung von Biosynthese- und Virulenz-assoziierten Genen führte. Daten über die Verwendung des Vektors in *In vivo*-Studien im Lebensmittel sind bislang nicht bekannt. Weiterhin ergab die durchgeführte Sequenzierung der Plasmide lediglich einen Anteil von etwa 17%, der eine Promotorregion vor dem Selektionsgen trug. Hier zeigte sich durch Sequenzvergleiche, dass drei der vier Promotorregionen in der korrekten Orientierung in den entsprechenden Plasmiden vorlagen und somit die Expression des Selektionsgens induzieren konnten. Zwei Promotoren gehörten zu den Genen Z0338 und Z2224, denen im Stamm EDL933 bislang keine Funktion zugeordnet werden kann. Deshalb kann hier keine Aussage über deren Funktion im Zusammenhang mit der Persistenz der Zellen in Hackfleisch getroffen werden. Der dritte Promotor konnte *arcZ* zugeordnet werden. Dieses Gen ist im Stamm K-12 bekannt und konnte durch Sequenzvergleich auch im Stamm EDL933, in dem es bislang nicht beschrieben ist, lokalisiert werden. Mandin und Gottesman [2010] konnten nachweisen, dass die Translation von RpoS, dem Sigma-Faktor der generellen Stressantwort, durch eine kleine RNA mit regulatorischer Funktion, kodiert durch *arcZ*, heraufgesetzt wird. Hier konnte durch Identifizierung des Gens ein erster Hinweis gefunden werden, der die

Stressantwort der Zelle auf die Inkubation im Hackfleisch unter erhöhter Temperatur belegt. Eine abschließende Aussage über die Genexpression des Stammes EDL933 durch die erlangten Ergebnisse unter den gewählten Bedingungen in Rinderhackfleisch kann hier jedoch nicht getroffen werden, da keine Anreicherung von Promotoren erreicht wurde.

Aufgrund der erlangten Erkenntnisse konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass die Chloramphenicolresistenz in diesem Fall ein möglicherweise ungeeignetes Selektionsgen darstellte. Da das Antibiotikum in Alkohol löslich ist, lag die Vermutung nahe, dass eine homogene Verteilung in der wässrigen Matrix des Rinderhackfleisches nicht gegeben war. Der Wassergehalt von Hackfleisch ist abhängig von dem Fettgehalt des verwendeten Fleisches. Bei einem Fettgehalt von 73-85% beträgt der Wasseranteil im rohen Hackfleisch etwa 56-64% (United States Department of Agriculture, Washington; www.usda.gov). Eine homogene Verteilung des selektierend wirkenden Stoffes ist jedoch grundlegend für die Funktionalität des IVET-Systems. Jede eingesetzte Bakterienzelle muss einem identisch hohen Selektionsdruck ausgesetzt sein, um eine erfolgreiche Anreicherung von resistenten Zellen durch deren Vermehrung bzw. eine Selektion von Zellen ohne Expression des Selektionsgens zu erreichen [Chiang *et al.*, 1999]. Weiterhin bestand die Vermutung, dass die Verwendung eines Antibiotikums mit bakteriozider Wirkung eine stärkere Selektion unerwünschter Zellen im Gegensatz zu einem bakteriostatischen Antibiotikum wie dem Chloramphenicol erreichen könnte.

Begründet auf den erlangten Erkenntnissen wurde in einem nächsten Schritt das selektive Gen im Vektor pKK232-8 ausgetauscht, um eine Weiterentwicklung der Methode für die hier zugrunde liegende Matrix zu erreichen. Es erfolgte die Insertion einer Kanamycinresistenz anstelle der Chloramphenicolresistenz. Dieses Antibiotikum gehört zur Gruppe der Aminoglykoside, führt durch Interaktion mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen zu einer bakteriozid-wirkenden Inhibierung der Proteinsynthese in der Zelle und ist gut löslich in Wasser. Durch die Löslichkeit in Wasser konnte eine homogenere Verteilung dieses Antibiotikums im Hackfleisch vermutet werden. Es entstand der Promotor-Selektionsvektor pAK-1 (siehe Abbildung 4.6). Eine Anwendung der IVET in *E. coli*, basierend auf Kanamycin als Selektionsmarker, wurde bislang nicht beschrieben. Hunt *et al.* [2001] konnten das Kanamycin jedoch erfolgreich in *Pasteurella multocida* in einem Mausmodell einsetzen. Sie detektierten u.a. Gene, die

verschiedenen Biosynthesewegen angehörten oder an der Ausbildung der Zellmembran beteiligt waren.

Weiterhin ergab sich aus den Beobachtungen die Annahme, dass eine Zugabe von weiterer Flüssigkeit zu einer homogeneren Hackfleischmatrix führt und infolgedessen eine homogenere Verteilung des selektierend wirkenden Antibiotikums ermöglicht werden kann. Auch die Arbeitsgruppe um Fratamico [2011] verwendete für ihre Expressionsstudien des *E. coli* O157:H7 Stammes Sakai nicht die komplizierte Matrix des Hackfleisches, sondern einen aus Hackfleisch hergestellten Extrakt. Dieser konnte die Matrix nicht exakt imitieren, da durch Sterilfiltration die autochthone Mikrobiota des Hackfleisches verloren ging und die Matrix ebenfalls keinen Einfluss mehr nehmen konnte. Es konnte jedoch mit Hilfe des gewonnenen Extraktes eine große Anzahl von Genen identifiziert werden, die während des Wachstums in Gegenwart der im Hackfleisch zur Verfügung stehenden Nährstoffe exprimiert wurden. Die anschließend durchgeführten Inkubationsversuche im Hackfleisch bestätigten die Annahme, dass weitere Flüssigkeit zu einem homogeneren Hackfleisch führt und zeigten, dass eine stärkere Wirkung des selektierend wirkenden Antibiotikums durch Zugabe von PBS erzielt werden kann.

Weiterhin konnte in Betracht gezogen werden, dass die gewählte Inkubationsdauer von fünf Stunden keinen für die Anreicherung von Zellen ausreichenden Zeitraum darstellte. Nach Inokulation der Zellen in das Hackfleisch und der Inkubation unter erhöhten Temperaturbedingungen benötigen diese Zeit für die Anpassung an die neue Umgebung. Ellen Dickreuther führte in ihrer Diplomarbeit [2010] ebenfalls ein IVET-System mit dem Vektor pKK232-8 durch. Sie verwendete das in dieser Arbeit entwickelte Hackfleischmodell und erzielte durch die Verwendung einer Inkubationszeit von zehn Stunden eine Anreicherung von Genbank-Klonen. Unter den von ihr analysierten 35 *ivi*-Plasmiden wurden fünf Plasmide doppelt und ein Plasmid drei Mal gefunden. Sie konnte jedoch zeigen, dass in den von ihr analysierten *ivi*-Klonen lediglich ein Plasmid einen Promotor enthielt. Hier konnte wiederum der Rückschluss auf eine unvorteilhafte selektiv-wirkende Antibiotikaresistenz und eine nicht homogene Verteilung des Antibiotikums im Hackfleisch gezogen werden.

In einem zweiten IVET-System wurden die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse umgesetzt. Die Verwendung des neu konstruierten Promotor-Selektionsvektors pAK-1 mit einer promotorlosen Kanamycinresistenz beschrieb die grundlegende Weiterentwicklung der Methode für die Verwendung in der Matrix Hackfleisch. Durch die Zugabe von weiterer Flüssigkeit wurde ein homogeneres Hackfleisch erreicht, in dem die Verteilung der nötigen Antibiotika gewährleistet war. Weiterhin wurde der Zeitraum der Inkubation von fünf Stunden auf zehn Stunden erhöht, um eine stärkere Anreicherung der Zellen durch eine längere Inkubationszeit zu erzielen.

Bereits nach der ersten Anreicherung im Hackfleisch konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Klone ohne exprimierte Resistenz ausselektiert wurden. Die Anzahl der Zellen nahm nach der Isolierung aus dem Hackfleisch um zwei Zehnerpotenzen ab und wies somit auf eine erfolgreiche Selektion durch das neue Antibiotikum hin. Die nachfolgenden Anreicherungen im Hackfleisch ergaben eine Erhöhung der Keimzahlen um eine bzw. zwei Zehnerpotenzen. Basierend auf dieser Tatsache konnte vermutet werden, dass eine erfolgreiche Anreicherung stattgefunden hatte. Auch die RFLP der PCR-Produkte wies auf mehrfach vorliegende EDL933-Fragmente in den *ivi*-Plasmiden hin. Insgesamt wurden 70 rekombinante Plasmide durch Sequenzierung der inserierten DNA und Homologievergleiche analysiert. Hierbei zeigte sich durch den Vergleich der Sequenzen, dass 79% der *ivi*-Plasmide mehrfach vorlagen. Die Anreicherung von Plasmiden zeigte, dass die Methode der IVET erfolgreich im Hackfleisch angewendet wurde. Die Detektion der Promotorregionen von *glmM*, *gsk* und *ndk* stützten die Validierung der Methode, da diese Gene Enzyme kodieren, die nachweislich essentiell für das Wachstum der Bakterienzelle sind [Mengin-Lecreux und van Heijenoort, 1996; Bernard *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001].

Der *glmM*-Promotor wurde hier im Hackfleischmodell in zwei verschiedenen *ivi*-Plasmiden insgesamt sechs Mal identifiziert. Das Gen kodiert die Phosphoglukosamin-Mutase GlmM, die für die Biosynthese von Peptidoglykanen und Lipopolysacchariden der Bakterienzelle essentiell ist [Mengin-Lecreux und Heijenoort, 1996]. Das Auffinden dieses Gens auf zwei verschiedenen EDL933-Fragmenten zeigte auf, dass die Anreicherung parallel in zwei verschiedenen Klonen der Genbank stattgefunden hatte und das Gen somit eine bedeutende Rolle unter den gegebenen Umständen zu spielen scheint. Die konkrete Funktion des Proteins in diesem Zusammenhang müsste jedoch weiter abgeklärt werden.

Das Gen *greA*, das den Transkriptions-Elongationsfaktor GreA kodiert, der im Cytoplasma der Zelle lokalisiert und für die effiziente Transkription durch die RNA-Polymerase zuständig ist, konnte hier ebenfalls identifiziert werden [Marr *et al.*, 2000]. Die Arbeitsgruppe um Potrykus [2010] konnte zeigen, dass die Transkription des Faktors durch zwei Promotoren reguliert wird. Der erste Promotor ist $\sigma 70$ -abhängig, der zweite wird durch den Hitzeschock-assoziierten Faktor $\sigma 24$ kontrolliert. Somit konnte hier ein erster Hinweis auf die Hitzeschock-Antwort der Zelle gefunden werden. Weitere Gene, die in Zusammenhang mit der Hitzeschock-Antwort der Zelle stehen, konnten in dieser Studie jedoch nicht identifiziert werden. Basierend auf der gewählten Inkubationsdauer von zehn Stunden kann vermutet werden, dass die Expression von Hitzeschock-Proteinen nach dieser Dauer nicht mehr vorhanden ist. Es ist bekannt, dass die Expression dieser Proteine während der ersten fünf bis sechs Minuten der Hitzeschock-Antwort der Zelle stark ansteigt, jedoch schnell wieder abnimmt, wenn die Adaptation der Zelle an die Umgebung erfolgt [Guisbert *et al.*, 2008]. Da das IVET-System auf der Aktivierung von Promotoren und der Reproduktion von Zellen basiert, kann vermutet werden, dass Gene der Hitzeschock-Antwort während der kurzen Phase der Induktion nicht ausreichend angereichert werden, um sie mit Hilfe dieser Methode detektieren zu können.

Ein besonderes Augenmerk lag auf Z1074, dessen Promotor in dieser Studie vielfach identifiziert werden konnte. Über das Gen oder dessen Funktion im EDL933 stehen zurzeit keine detaillierten Informationen zur Verfügung. Ein Sequenzmotiv weist auf einen Transporter hin, der der Zelle eine Resistenz gegen Arsenit, Arsenat und Antimonit vermitteln kann [Carlin *et al.*, 1995]. Die so ermittelte Permease ArsB ist in der inneren Zellmembran lokalisiert und es wird vermutet, dass es sich um einen Antiporter handelt, der einen Metall-Protonen-Austausch katalysiert [Meng *et al.*, 2004]. Basierend auf der starken Anreicherung des *ivi*-Plasmids kann von einer bedeutenden Rolle des Gens während des Wachstums der Zelle unter den gewählten Bedingungen im Hackfleisch ausgegangen werden. Die genaue Rolle, die das Gen in diesem Zusammenhang spielt, sollte weiter aufgeklärt werden.

Ein weiterer Transporter, kodiert durch *uhpT*, konnte in dieser Studie gefunden werden. Der Hexosephosphat-Transporter gehört zu den Antiportern und transportiert Glukosephosphat im Austausch gegen Phosphat durch die innere Zellmembran in das Cytosol der Zelle. Extrazelluläre Glukose wirkt nachweislich auf diesen Mechanismus

induzierend [Verhamme *et al.*, 2002]. Fratamico *et al.* [2011] haben ebenfalls in ihrer Expressionsstudie mittels Microarray-Analyse gezeigt, dass dieser Transporter im O157:H7 Stamm Sakai in einem Hackfleischextrakt hochreguliert wird. Die Bedeutung des Transporters für das Wachstum der Zellen in der Matrix Rinderhackfleisch konnte somit in zwei voneinander unabhängigen Studien festgestellt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Glukose die erste Energiequelle im Hackfleisch darstellt, die von den Zellen verwertet wird, obwohl davon auszugehen ist, dass der Gehalt an Glukose im Hackfleisch niedrig ist. In derselben Studie der Arbeitsgruppe um Fratamico [2011] konnte die These aufgestellt werden, dass die Expression von Säureschock-assoziierten Proteinen als Antwort auf die Umgebung des Hackfleisches zu einer Erhöhung der Säuretoleranz der Zellen führen kann. Basierend auf der Auffindung von drei Säurestress-assoziierten Proteinen in ihrer Studie wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine erhöhte Säuretoleranz der Zellen zu einer gesteigerten Chance des Überlebens im Wirt führen kann. Die in der hier durchgeführten Studie identifizierte 7- α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, kodiert durch *hdhA*, kann ebenfalls einen Hinweis auf dieses Phänomen geben. HdhA wird durch osmotischen Stress in einem aeroben Milieu bzw. während der stationären Wachstumsphase einer Kultur induziert [Weber *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006]. Das Enzym ist für die Dehydroxylierung von Cholsäure und Chenodesoxycholsäure, zwei bedeutenden humanen Gallensäuren, zuständig [Yoshimoto *et al.*, 1991]. Durch die Expression des Gens in Rinderhackfleisch kann hier ebenfalls vermutet werden, dass die Zellen eine erhöhte Säuretoleranz entwickeln. Zudem kann ein Hinweis auf eine gesteigerte Pathogenität der EHEC für den Menschen erkannt werden. Die Expression des Enzyms könnte zu einer Preadaptation der Bakterien an die Konditionen des Magen-Darm-Trakts und somit zu einer verbesserten Passage durch diesen führen.

Es konnte ein weiteres Gen in dieser Arbeit gefunden werden, das während der stationären Wachstumsphase induziert wird. Es kodiert CspD, das der Stress-Antwort der Zelle angehört und unabhängig von dem Sigma-Faktor σ S während eines Mangels an Glukose induziert wird [Yamanaka und Inouye, 1997]. Die Arbeitsgruppe um Yamanaka [2001] sagt dem Protein eine regulatorische Rolle als Inhibitor der DNA-Replikation in Glukosemangel-gestressten Zellen vorher. Das Auffinden dieses Gens unterstützt die bereits erwähnte Vermutung, dass nach Abbau des geringen Glukosegehalts im Rinderhackfleisch diese Energiequelle für die Zellen nicht mehr zur

Verfügung steht. Auch das hier identifizierte Gen *yggX*, das ein hypothetisches Protein kodiert, unterstützt diese These. Pomposiello *et al.* [2003] ordneten dem Protein im Stamm K-12 eine Schutzfunktion gegen oxidativen Stress zu. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte kurz darauf nachweisen, dass das Gen als Antwort der Zelle auf Glukose- und Energie-limitierende Umstände induziert wird [Raman *et al.*, 2005]. Somit kann das Gen mit einem Stress, ausgelöst durch Nährstoffmangel in der Zelle, in Verbindung gebracht werden. GlpA, eine Untereinheit der anaeroben Glycerol-3-Phosphat (G-3-P)-Dehydrogenase, ist mit dem Energiemetabolismus der Zelle assoziiert. Das Gen konnte in dieser Studie ebenfalls identifiziert werden. Das locker mit der Zellmembran verbundene Enzym wird durch G-3-P induziert. Das Regulon verwertet G-3-P sowie dessen Vorstufen, um es als Kohlenstoff- und Energiequelle für die Zelle zu nutzen [Yang *et al.*, 1997]. Auch in der eukaryotischen Zelle ist G-3-P zu finden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass das G-3-P aus den Skelettmuskelzellen des Rindfleisches durch die Bakterien verwertet wurde.

Weiterhin wurden in dieser Studie insgesamt 12 Gene mit bislang hypothetischer oder unbekannter Funktion im Stamm EDL933 gefunden. Diese waren assoziiert mit dem Transport (Z2716, Z1074), der Stress-Antwort (*yggX*, *yohM*), der Modifikation (*yibK*) und der Regulation (*yaiN*, Z2091, Z2760). Unter ihnen fiel *ymcD* auf, das ein hypothetisches Protein kodiert. *ymcD* wurde von Peleg *et al.* [2005] in einem enteropathogenen *E. coli*-Stamm des Serotyps O127:H6 identifiziert. Sie konnten zeigen, dass das Gen zu einem Operon gehört, das für die Bildung des O-Antigens zuständig ist. Das bereits erwähnte *YohM* zeigt Homologie zu dem Nickel/Kobalt-Effluxprotein RcnA, das als Membran-gebundenes System für die Detoxifikation der Zelle durch Ausschleusen der Metalle bekannt ist und die Resistenz gegen diese beiden Metalle bedingt [Koch *et al.*, 2007; Fantino *et al.*, 2010]. Die Aufgabe, die dem Protein im Zusammenhang mit dem Wachstum der Zelle in Hackfleisch zukommt, ist bislang unklar und müsste abgeklärt werden. Die 12 Gene mit hypothetischer oder unbekannter Funktion machen einen Anteil von 60% der 20 in dieser IVET-Studie identifizierten *ivi*-Gene aus. Dieser hohe Anteil spricht für die Relevanz der weiteren Erforschung der EHEC. Im Genom des Stammes EDL933 als Vertreter des Serotyps O157:H7 sind 1.387 Gene in O-Inseln lokalisiert. Die O-Inseln liegen spezifisch in diesen pathogenen *E. coli* vor, machen etwa einen Anteil von 26% der EDL933-Gene aus und können im Stamm K-12 nicht identifiziert werden [Perna *et al.*, 2001]. Innerhalb der Inseln sind viele bislang

unbekannte Gene lokalisiert, jedoch auch putative Virulenzfaktoren, die möglicherweise durch ihre Funktion bei der Besiedlung des Darms mit der Pathogenität der Bakterien in Verbindung gebracht werden können [Eisen, 2001]. Weiterhin kodieren 75% der Basis-Gene in den beiden Stämmen Proteine, die sich mindestens in einer Aminosäure voneinander unterscheiden. Es liegen jedoch auch Gene in beiden Stämmen vor, die sich wesentlich stärker voneinander unterscheiden. Deshalb ist davon auszugehen, dass der Genomunterschied der beiden Stämme einen erheblichen Effekt auf der Ebene der Genregulation hat [Perna *et al.*, 2001]. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann hier die Vermutung aufgestellt werden, dass während der Durchführung des IVET-Systems im *E. coli*-Laborstamm HB101 eine abweichende Induktion von Promotoren im Gegensatz zu dem Wildtypstamm EDL933 stattgefunden hat. Innerhalb der bislang unbekanntem Gene des Stammes EDL933 können sich möglicherweise Regulatoren befinden, die in dem Laborstamm nicht identifiziert werden können. Weiterhin wurde ein HB101-Stamm verwendet, der durch Behandlung mit Nalidixinsäure eine spontane Resistenz gegen das Antibiotikum entwickelt hat. Die Arbeitsgruppe um Lee [2010] konnte zeigen, dass in einer Population von Zellen mit einer spontanen Resistenz gegen ein Antibiotikum nicht alle Zellen das gleiche Resistenzpotenzial besitzen. Wenige Zellen mit einer stark ausgebildeten Resistenz können durch die Produktion von Indol zum Wohle der ganzen Population in schwach resistenten Zellen Efflux-Pumpen und Stress-Mechanismen induzieren, die diesen zu einer höheren Überlebenschance in Gegenwart des Antibiotikums verhelfen. Basierend auf diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit verwendete spontane Resistenz zu einem Nachteil während der Durchführung des IVET-Systems geführt hat. Es kann vermutet werden, dass interessante Klone während der drei Anreicherungen im Hackfleisch verloren gingen.

Neben den 20 Promotoren, die in korrekter Orientierung in den entsprechenden *ivi*-Plasmiden identifiziert werden konnten, lagen zwei Promotorregionen in der reversen Richtung vor. Hierbei handelte es sich um den Promotor des auf dem Plasmid pO157 lokalisierten Hämolyisin-Transportproteins HlyB, dessen Gen Bestandteil des *hlyCABD*-Operons ist [Schmidt *et al.*, 1995], und den *atpI*-Promotor. Das Gen bildet eine Untereinheit der ATP-Synthase und konnte hier trotz inkorrekt orientierter Promotors sechs Mal gefunden werden. Ein weiteres *ivi*-Plasmid trug einen Teil aus der Gen-Mitte des *yjcC*, das ein putatives Signaltransduktionsprotein kodiert. Dieses

Plasmid konnte fünf Mal durch Vergleich der Sequenzen identifiziert werden. Obwohl in diesen drei *ivi*-Plasmiden anscheinend inkorrekte EDL933-Insertionen vorlagen, konnten sie im Vergleich zu den übrigen Plasmiden relativ häufig gefunden werden. Auch in weiteren voneinander unabhängigen IVET-Systemen, durchgeführt von verschiedenen Arbeitsgruppen, trat dieses Phänomen auf. Es konnte mehrfach beobachtet werden, dass ein nicht geringer Anteil an Klonen keinen offensichtlichen Promotor stromaufwärts vor dem Selektionsgen trägt. Es wurde deshalb bereits die Vermutung aufgestellt, dass dieses Phänomen kein zufälliges Ereignis darstellt [Dudley, 2008]. Silby und Levy [2004] spekulierten, dass diese „cryptic fusions“ Gene darstellen, deren Transkription möglicherweise auf beiden Strängen der DNA erfolgt und eine Form der „antisense RNA-mediated regulation“ darstellt. Bislang gibt es jedoch keine fundierten Beweise für diese Theorie [Dudley, 2008]. Sollte die Vermutung jedoch zutreffen, dann könnte das in dieser Arbeit gefundene Hämolysin-Transportprotein einen ersten Hinweis auf die Expression von Virulenz-assoziierten Genen im Stamm EDL933 in der Matrix Hackfleisch geben. Das Hämolysin ist ein bedeutender Virulenzfaktor, kann extra-intestinale Erkrankungen verursachen und wirkt auf verschiedene Zellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Zellen des Nierentubulus [Schmidt *et al.*, 1995].

Es wurden in dieser Studie keine Gene gefunden, die innerhalb der O-Inseln lokalisiert waren. Das bereits erwähnte *hlyB* gibt jedoch einen ersten Hinweis auf die Expression eines Virulenzfaktors, der im Hackfleisch induziert wird. Die Auffindung dieses Plasmid-kodierten Gens stellte in dieser Arbeit ein zufälliges Ereignis dar. Für das IVET-System wurde die genomische DNA des Stammes EDL933 herangezogen, bei deren Präparation Plasmide nicht berücksichtigt werden sollten. Da das Plasmid pO157 mit 92 kb sehr groß ist, konnte es bei der Präparation der genomischen DNA nicht komplett ausgeschlossen werden.

Über den Effekt eines Hitzeschocks auf die Genexpression innerhalb der O-Inseln oder auf dem Plasmid pO157 der *E. coli* O157 ist bislang wenig bekannt. Carruthers und Minion [2009] konnten in ihrer Studie der Genexpression des Stammes EDL933 unter erhöhten Temperaturbedingungen bei 50°C zeigen, dass 82 hoch-regulierte Gene der generellen Hitzeschock (HS)-Antwort angehörten. Sie fanden außerdem zwei LEE-kodierte Gene und 23 Gene, die in O-Inseln lokalisiert waren. Zwölf der 23 Gene waren auf Bakteriophagen kodiert. Sie stellten die Vermutung auf, dass die hochregulierten

O157-spezifischen Gene nicht in direkter Verbindung mit der generellen HS-Antwort der Zelle stehen, sondern einem weiteren Zweck, wie der Pathogenese, dienen könnten.

Zwei weitere Arbeitsgruppen konnten durch Microarray-Analysen zeigen, dass der Stamm EDL933 während seiner Persistenz und Vermehrung in einem Salat-Modell Lee-assoziierte Gene, die beiden Stx und Intimin hochreguliert [Carey *et al.*, 2009; Kyle *et al.*, 2010]. Die Arbeitsgruppe um Bergholz [2009] analysierte den Stamm Sakai in einem Apfelsaft-Modell, in dem sie ebenfalls durch Microarray-Analysen neben Säure- und Osmosestress-assoziierten Genen auch 104 O-spezifische Gene fanden, die hochreguliert wurden. Unter den 104 Genen konnten sie fünf LEE-kodierte Effektorproteine identifizieren. Die beschriebenen Studien wurden jedoch ohne den Einfluss einer erhöhten Temperatur durchgeführt.

Fratamico *et al.* [2011] fanden, wie bereits erwähnt, in ihrer Studie der Genexpression des Stammes Sakai in einem Hackfleischextrakt 74 hochregulierte Gene, die in erster Linie mit der Protein- und Polysaccharidbiosynthese, Transkriptionsfaktoren und Transportproteinen in Verbindung stehen. Sie konnten zudem eine Antwort der Zelle auf Säurestress feststellen. Sie merkten jedoch an, dass in Anwesenheit der natürlichen Mikroflora des Hackfleisches Unterschiede in der Genexpression zu erwarten sind. Hier kann eine Parallele zu den in dieser Arbeit identifizierten Genen gezogen werden. Neben einem Transkriptionsfaktor gehörten die Gene dem Kohlenhydrat- und Energiemetabolismus, der Nukleotidbiosynthese, dem Transport und der Stress-Antwort der Zelle an. Es konnte weiterhin ein Gen identifiziert werden, das mit der Antwort der Zelle auf einen Säurestress in Verbindung gebracht werden kann. Die bereits erwähnte Detektion einer relativ hohen Anzahl an hypothetischen Proteinen zeigt auf, dass Gene des Stammes EDL933, denen bislang keine Funktion zugeordnet werden kann, eine Aufgabe während der Persistenz in Hackfleisch zukommt. Eine Analyse der EHEC ist somit auch in Zukunft wichtig, um ihre Interaktion mit der Umgebung zu verstehen.

Trotzdem sollte erwähnt werden, dass IVET-Systeme einige Nachteile besitzen. So werden neben dem hohen Zeitaufwand z. B. Gene diskriminiert, die *in vitro* exprimiert werden. Diese können jedoch gleichzeitig eine wichtige Rolle für die Zelle während des *In vivo*-Wachstums und der Schädigung des Wirtes einnehmen [Chiang *et al.*, 1999]. Zudem sind Gene, die lediglich vorübergehend oder auf einem niedrigen Level exprimiert werden, schwierig oder unmöglich zu detektieren, da keine ausreichende

Anreicherung der entsprechenden Klone stattfinden kann [Angelichio und Camilli, 2002]. Weiterhin können Gene, die *in vivo* herunterreguliert werden, ebenfalls mit dieser Methode nicht detektiert werden. Auf diese Weise können möglicherweise interessante Gene nicht identifiziert werden [Lee *et al.*, 2007]. Aufgrund der aufgeführten Nachteile der IVET-Systeme sollte für eine ausführliche Analyse der Stress-, Persistenz- und Virulenz-assoziierten Mechanismen der pathogenen Bakterien in einer spezifischen Umgebung weitere Untersuchungsmethoden herangezogen werden, um die Nachteile des IVET-Systems auszugleichen.

5.2 Untersuchungen zur Fitness von STEC Stämmen im Risikolebensmittel Rinderhackfleisch

Neben STEC der Serogruppe O157 werden auch *E. coli* der Serogruppen O26 und O103 als wichtige Erreger verschiedener humaner Erkrankungen, vergleichbar mit denen verursacht durch STEC O157, angesehen [Brooks *et al.*, 2005]. Werber *et al.* [2008] konnten nachweisen, dass Stämme dieser drei Serogruppen häufig aus Patienten jedoch selten aus Lebensmitteln (LM) isoliert werden. Die Analyse von STEC unterschiedlicher Herkunft auf molekularer Ebene wird als ein bedeutender Ansatz für die Abschätzung ihres Risikopotentials angesehen. Bisher sind allerdings nur begrenzte Daten über den Zusammenhang der evolutionären Verwandtschaft, der Anwesenheit von Virulenzfaktoren und das mögliche Risiko für die Infektion von Menschen gegeben [Creuzburg *et al.*, 2011]. Da das Risikolebensmittel Rinderhackfleisch eine der wichtigsten Übertragungsquellen für STEC auf den Menschen darstellt, wurden in der vorliegenden Arbeit 23 Isolate der Serogruppen O26, O103 und O157 in ihrem Wachstum in dieser Matrix verglichen.

Zunächst wurden die Stämme auf die Verteilung von zehn Virulenzfaktoren untersucht. Neben den beiden *stx* wurden die Stämme auf die Plasmid-kodierten Gene *espP* und *subAB* und die chromosomal-kodierten Gene *iha*, *nleD*, *cdtV*, *cif*, *eae* und *espM* überprüft. Hier konnte zum einen gezeigt werden, dass die Genverteilung innerhalb der Serogruppen O26 und O103 heterogen und innerhalb der Serogruppe O157 eher homogen ist und zum anderen, dass die Isolate aus Lebensmitteln mit tierischer Herkunft stark voneinander abweichende Virulenz-Profile aufweisen können. Anhand

der hier untersuchten Faktoren zeigte sich, dass innerhalb einer Serogruppe die Isolate aus LM von der alleinigen Anwesenheit eines Stx bis hin zu einem identischen Profil verglichen mit den HUS-Isolaten variierten. Diese Beobachtung war unter den Vertretern der Serogruppe O157 besonders ausgeprägt. Hier wiesen die verwendeten LM- und HUS-Isolate eine nahezu identische Verteilung der untersuchten Virulenzfaktoren auf. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass Stämme der Serogruppe O157 eine stärkere Homogenität als Stämme der Serogruppen O26 und O103 aufzeigen [Pearce *et al.*, 2006; Gunn *et al.*, 2007].

Die beiden Sorbitol-fermentierenden O157:H⁻-Stämme enthielten nicht die Serinprotease EspP. Dies war zu erwarten, da das Gen auf dem Virulenzplasmid pSFO157 im Gegensatz zu dem Plasmid pO157 nicht vorhanden ist [Brunder *et al.*, 2006]. Gleichzeitig waren die beiden O157:H⁻-Stämme die einzigen Stämme, in denen das Cdt-V nachgewiesen werden konnte. Dies geht einher mit der Beobachtung von Janka *et al.* [2003]. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der *cdtV*-Genkomplex ein putativer Virulenzfaktor ist, der typischerweise mit Sorbitol-fermentierenden O157:H⁻-Stämmen assoziiert wird. In O157:H7-Stämmen scheint der Virulenzfaktor keine wichtige Rolle während des Infektionsprozesses zu spielen, da er überwiegend in diesen Stämmen nicht vorhanden ist. O157:H7-Stämme enthalten jedoch andere Virulenzfaktoren wie die bereits erwähnte Serinprotease EspP. Das Gen konnte in dieser Arbeit in allen Isolaten dieses Serotyps identifiziert werden.

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass der aus Rehglasch isolierte O103 Stamm LM15255/07 das einzige Isolat war, das das Subtilase Zytotoxigen *subAB* trug. Das Toxin wirkt nachweislich toxischer auf Verozellen als das Shiga Toxin und verursacht erhebliche histologische Schäden in Gehirn, Nieren, Leber und Milz [Wang *et al.*, 2007]. Obwohl das Toxin ursprünglich von Paton *et al.* [2004] auf dem Plasmid pO113 gefunden wurde, konnte es von ihnen u.a. auch in den Serogruppen O26, O91, O111, O128 und O157 detektiert werden. In zwei weiteren Studien konnte das Toxin in Isolaten aus erkrankten Patienten, Rindern und LM identifiziert werden wobei gezeigt werden konnte, dass *subAB* überwiegend in *eae*-negativen Stämmen vorlag [Cergole-Novella *et al.*, 2007; Slanec *et al.*, 2009]. Auch der in dieser Studie *subAB*-positive Stamm war *eae*-negativ.

In der vorliegenden Studie konnte somit gezeigt werden, dass Isolate aus LM eine vergleichbare Genausstattung wie Isolate aus Patienten mit HUS-Erkrankung aufweisen können. Ein erhöhtes Risiko zur Auslösung einer Krankheit beim Menschen durch diese LM-Isolate kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Obwohl Slanec *et al.* [2009] nachwies, dass in erster Linie Effektorgen-negative Stämme aus LM isoliert werden, konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass genetisch verwandte Effektorgen-negative Stämme sowohl in LM als auch in Patienten auftreten. Effektorgen-positive STEC scheinen zwar generell ein höheres Potential zur Ausbildung einer Krankheit zu besitzen, jedoch können Effektorgen-negative Stämme nicht als harmlos eingestuft werden [Creuzburg *et al.*, 2011]. Die gleiche Studie konnte zeigen, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Effektorgenen oder der Anzahl dieser Gene und der Ausbildung einer HUS-Erkrankung besteht.

Nach dem Vergleich der Stämme auf genomischer Ebene wurde ein Vergleich des Wachstums der Stämme in Rinderhackfleisch angestellt. Hier zeigte sich, dass bei einer für *E. coli* optimalen Inkubationstemperatur von 37°C die LM-Isolate der Serogruppe O103 und zwei der vier HUS-Isolate der Serogruppe O157 einen Vorteil gegenüber den anderen Stämmen hatten. Sie zeigten ein signifikant höheres relatives Wachstum im Vergleich zu dem verwendeten Referenzstamm EDL933. Die LM-Isolate der Serogruppe O103 stammten nicht aus Rindfleisch, konnten hier jedoch eine gesteigerte Fitness im Rinderhackfleisch zeigen. Nur ein Isolat der Serogruppe O26 zeigte ein signifikant schwächeres relatives Wachstum im Vergleich zu dem Stamm EDL933.

McCleery und Rowe [2002] führten in ihrer Studie Lagerungsversuche mit verschiedenen O157:H7 Stämmen in einem Fleisch-Modell durch. Sie verwendeten eine Inkubationstemperatur von 15°C als Simulation der Lagerungsbedingungen von LM während eines unzureichenden Tiefkühlprozesses bzw. einer unterbrochenen Kühlkette. In dieser Arbeit wurde die Temperatur ebenfalls verwendet und es zeigte sich ein mehr heterogenes Bild des Wachstums der Stämme im Vergleich zum Stamm EDL933. Hier konnte der Hinweis auf ein höheres relatives Wachstum der verwendeten HUS- und LM-Isolate der Serogruppen O26 und O103 und der HUS-Isolate der Serogruppe O157 gefunden werden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte nicht bei allen Stämmen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Auch die Tier-Isolate der Serogruppe O103 mit unterschiedlicher Herkunft zeigten mit Ausnahme des Stammes 889 diese Tendenz.

Da sich in den beiden durchgeführten Vergleichen innerhalb der Serogruppe O157 der Hinweis auf eine erhöhte Fitness der HUS-Isolate gegenüber der LM-Isolate ergab, wurden diese Stämme bei einer weiteren Temperatur von 20°C untersucht. Hier konnte die Vermutung, dass die pathogenen Isolate aus Patienten mit HUS-Erkrankung einen Vorteil gegenüber den Isolaten aus LM in Hackfleisch besitzen, jedoch nicht bestätigt werden. Es konnten kaum Unterschiede der Stämme in ihrem relativen Wachstum bei dieser Temperatur beobachtet werden. Die HUS-Isolate zeigten keine erhöhte Fitness im Vergleich zu dem Stamm EDL933.

Insgesamt zeigt die hier durchgeführte Analyse der *E. coli*-Stämme in Rinderhackfleisch, dass die Fitness der untersuchten STEC Stamm- und Temperaturspezifisch zu sein scheint. Lediglich innerhalb der Serogruppe O157 lassen sich erste Anhaltspunkte finden, die auf eine höhere Fitness der HUS-Isolate in der Matrix Hackfleisch hinweisen. Hier kann die These aufgestellt werden, dass durch eine höhere Fitness ein höheres Potential für die Infektion des Menschen durch Aufnahme kontaminierter LM bestehen könnte. Eine generelle Aussage über die Fitness der Stämme verschiedener Serogruppen im Vergleich untereinander kann aufgrund der hier durchgeführten Studie nicht getroffen werden. Auch zeigt sich bei den hier verwendeten Stämmen kein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl von Virulenzfaktoren und der Fitness im Hackfleisch.

Bislang liegen keine weiteren Studien über einen Wachstumsvergleich von STEC-Stämmen unterschiedlicher Herkunft in einer Lebensmittelmatrix vor. Wie bereits erwähnt verglichen McCleery und Rowe [2002] drei Stämme des Serotyps O157:H7 in einem Fleisch-Modell. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass die von ihnen identifizierten Unterschiede zwischen den Stämmen Stamm-spezifisch waren. Einen Vergleich von neun Fleisch-Isolaten mit einem humanen Isolat im Hinblick auf die Kontrolle der Pathogene in LM stellte die Arbeitsgruppe um Molina [2003] an. In ihrer Analyse der Säure- und Alkoholtoleranz wurden neun LM-Isolate, die neun verschiedenen Serotypen angehörten, mit einem humanen Isolat des Serotyps O157:H7 verglichen. Das von ihnen verwendete LB-Medium wies einen pH-Wert von 2,5 bis 7,0 und einen Ethanolgehalt von 6% bzw. 12% auf. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass bei einer Temperatur von 37°C eine höhere Stresstoleranz bei verschiedenen STEC-Serotypen im Vergleich zum Serotyp O157:H7 vorliegt. Der von ihnen verwendete Stamm der Serogruppe O91 zeigte die stärkste, der verwendete Stamm der Serogruppe O26 die

geringste Toleranz gegenüber den eingesetzten Stressfaktoren auf. Basierend auf den erlangten Daten kam die Arbeitsgruppe ebenfalls zu dem Schluss, dass bei der Laborbasierten Studie von STEC-Stämmen in LM nicht nur auf den Serotyp O157:H7 geachtet werden sollte. Sie wiesen darauf hin, dass der Studie anderer Serotypen wachsende Aufmerksamkeit für die Prävention von HUS-Erkrankungen und für die Entwicklung neuer Strategien zur Kontrolle der pathogenen Bakterien in LM zukommen sollte.

Weitere Studien, die einen Vergleich von STEC-Stämmen beinhalten, beschreiben das Wachstum der Stämme nicht in Lebensmittel-imitierenden sondern in Magen-Darm-imitierenden Medien. Bergholz und Whittam [2006] verglichen 14 EHEC-Stämme des Serotyps O157:H7 mit 12 EHEC-Stämmen der Serotypen O26:H11 und O111:H8. Signifikante Unterschiede ergaben sich während des Wachstums der Stämme in einem Modell, das die Umgebung des Magens mit einem pH-Wert von 2,5 imitierte. Die Stämme des Serotyps O157:H7 zeigten eine signifikant überlegende Fähigkeit den gewählten Stress zu überstehen. Dies spricht für eine schnelle Anpassung der Stämme an ein saures Milieu und unterstützt die Fähigkeit der Stämme eine erfolgreiche Infektion des Wirtes mit einer geringen Infektionsdosis zu erzielen. Diese Erkenntnisse konnten die von Murinda *et al.* [2004] getroffenen Beobachtungen bestätigen. Die Arbeitsgruppe konnte zuvor bereits zeigen, dass Stämme des Serotyps O157:H7 eine höhere Säureresistenz als Stämme anderer Serotypen aufweisen.

Die aufgeführten Studien unterstreichen die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse, dass eine Stamm-spezifische Antwort auf verschiedene Umwelteinflüsse gefunden werden kann. Auch zeigen die Ergebnisse, dass, wie bereits erwähnt, eine starke Heterogenität der Stämme vorliegt (siehe Abschnitt 1.1.1). Die Ergebnisse unterstreichen die Annahme dass auch Effektorgen-negative Stämme bzw. Stämme mit geringer Anzahl an Effektorgen nicht als harmlos eingestuft werden können [Creuzburg *et al.*, 2011]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Stämme innerhalb einer Serogruppe stark heterogen sein können. Somit sollte in Zukunft weiterhin ein Augenmerk auf die Persistenz und das Wachstum in LM gelegt werden, um bakterielle Mechanismen weiter aufzuklären und Strategien für die Kontrolle der Bakterien in Lebensmitteln zu entwickeln.

5.3 Bakteriozinbildung der verwendeten *E. coli*-Stämme

STEC verschiedener Serogruppen sind bekannt für die Produktion ein oder mehrerer Colizine. In diesem Zusammenhang konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass die Bildung solcher Substanzen den pathogenen Bakterien einen Vorteil bei der Besiedlung des Darms durch Inhibierung der natürlichen Darmflora verschaffen kann [Hofinger *et al.*, 1998].

Für eine weitere Einschätzung der in dieser Arbeit verwendeten 23 *E. coli*-Isolate der Serogruppen O26, O103 und O157 wurde die Bildung einer Bakterien-hemmenden Substanz ohne weitere Quantifizierung dieser untersucht. Hier zeigte sich, dass sowohl Isolate aus Patienten mit HUS-Erkrankung als auch Isolate aus LM und Tieren mindestens eine hemmende Substanz bilden können. Dabei war kein direkter Zusammenhang zwischen der Verteilung der zuvor untersuchten Virulenzfaktoren und der Bakteriozinbildung zu erkennen. So waren innerhalb der Serogruppe O26 ein HUS- und ein LM-Isolat im Hemmhoftest positiv, die eine identische Verteilung von Faktoren besaßen (siehe Tabelle 4.7/4.8). Innerhalb der Serogruppe O103 waren fünf Stämme unterschiedlicher Herkunft positiv im Hemmhoftest. Diese waren in der Anzahl und in der Verteilung der analysierten Virulenzfaktoren heterogen (siehe Tabelle 4.7/4.8). Es konnte deshalb kein Zusammenhang zwischen der Bildung einer hemmenden Substanz und der Anwesenheit von Virulenzfaktoren gefunden werden. Unter den sechs Stämmen der Serogruppe O157 befand sich lediglich ein HUS-Isolat bei dem eine Bakteriozin nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits erwähnt stellt die Erforschung der EHEC in Lebensmitteln einen wichtigen Forschungsschwerpunkt dar, um weitere Erkenntnisse über die Persistenz, die Vermehrung und die Verbreitung dieser Zoonoseerreger zu erlangen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *In vivo*-Expressionstechnologie eine hilfreiche Methode darstellt, um die Genexpression der STEC in einer komplizierten Lebensmittelmatrix wie dem Hackfleisch zu untersuchen. Erste Anhaltspunkte für die Reaktion der Bakterien auf die Umgebung des Hackfleisches konnten gewonnen werden. Diese zeigten auf, dass in Zukunft weitere Untersuchungen erforderlich sind, um ein vollständiges Verständnis der bakteriellen Vorgänge zu

erlangen. Der in dieser Arbeit identifizierte putative Transporter, kodiert durch Z1074, sollte in seiner Funktion in Zusammenhang mit der Vermehrung der Bakterien in Hackfleisch weiter aufgeklärt werden. So könnte beispielsweise eine Mutation in das Gen eingebracht werden und die dadurch erlangte Mutante mit dem Wildtyp-Stamm verglichen werden. Auf diese Weise könnte weiterhin abgeklärt werden, ob das Gen essentiell für die Vermehrung der Zellen in Hackfleisch ist. Um die bakteriellen Mechanismen in Hackfleisch weiter aufzuklären, könnte die IVET bei Raumtemperatur durchgeführt werden, um Gene herauszufinden, die ohne zusätzlichen Stressfaktor in Hackfleisch exprimiert werden. Nachfolgend wären Stressfaktoren wie beispielsweise Hitze-, Säure- oder Osmosestress ebenfalls interessant, um die Reaktion der Pathogene weiter zu untersuchen. Diese Umstände können ebenfalls bei der Verarbeitung der Lebensmittel auf die Bakterien einwirken und müssen auf dem Weg der Infektion des Menschen von ihnen überwunden werden. Auch könnte der in dieser Arbeit konstruierte Promotor-Selektionsvektor pAK-1 für Promotorstudien eingesetzt werden. Interessante Gene, die z. B. mit der Stressantwort der Zelle assoziiert werden, könnten durch die zugehörigen Promotoren und deren Expressionsstärke in Hackfleisch oder einer anderen Lebensmittelmatrix verglichen werden.

Weiterhin zeigte die durchgeführte Analyse der 23 in dieser Studie untersuchten EHEC/STEC/EPEC-Stämme in Rinderhackfleisch, dass die Fitness der Stämme Stamm- und Temperatur-spezifisch war. Innerhalb der Serogruppe O157 konnten erste Anhaltspunkte gefunden werden, die auf eine stärkere Fitness der pathogenen Isolate aus Patienten mit HUS-Erkrankung im Gegensatz zu Isolaten aus Lebensmitteln tierischer Herkunft und Isolaten aus Tieren hinweisen. Auch zeigte sich bei den verwendeten Stämmen kein direkter Zusammenhang zwischen der Fitness in Hackfleisch und der Anzahl von Virulenzfaktoren oder der Bildung eines Bakteriozins. Für eine umfassende Aufklärung der Zusammenhänge sind weitere Untersuchungen erforderlich. Hier wäre beispielsweise interessant weitere Stämme für einen Vergleich heranzuziehen oder neben dem Faktor Kälte weitere Stressfaktoren zu untersuchen. Auch könnte interessant sein, Stämme unterschiedlicher Herkunft zusammen auf ihr Wachstum in Hackfleisch zu untersuchen. Hier könnte sich eine Auswirkung der gebildeten Bakteriozine durch Hemmung der Stämme untereinander zeigen.

6 Zusammenfassung

Das Risikolebensmittel Rinderhackfleisch ist als Infektionsquelle für Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) bekannt. Durch die Aufnahme von unzureichend gegartem Hackfleisch gelangen die pathogenen Bakterien in den Menschen und können zu schweren Krankheiten wie der hämorrhagischen Colitis und dem lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischen Syndrom führen. Der *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 als Vertreter der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), einer Untergruppe der STEC, wurde mit Hilfe der *In vivo*-Expressionstechnologie auf *in vivo*-induzierte Gene in Rinderhackfleisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Promotor-Selektionsvektor pKK232-8, der auf einer promotorlosen Chloramphenicol-resistenz basiert, kein geeigneter Vektor für die Untersuchung der Genexpression in dieser Matrix war. Eine Detektion von *in vivo*-exprimierten Genen war unter Verwendung des Alkohol-löslichen und bakteriostatisch-wirkenden Antibiotikums nicht möglich. Durch eine Weiterentwicklung des Systems entstand der Promotor-Selektionsvektor pAK-1. Der Vektor basierte auf einer Wasser-löslichen und bakteriozid-wirkenden Kanamycinresistenz als Selektionsgen. Der Vektor wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert und für die Untersuchung der Genexpression in der Matrix Hackfleisch verwendet. Es konnten 20 *in vivo*-induzierte Gene detektiert werden, die während des Wachstums in Hackfleisch unter erhöhten Temperaturbedingungen bei 42°C exprimiert wurden. Acht Gene besaßen eine Funktion im Kohlenhydrat- und Energiemetabolismus, in der Nukleotidbiosynthese und Makromolekülsynthese, in Transportprozessen und in der Stress-Antwort der Zelle. Dem größeren Anteil von 12 Genen konnte eine putative oder unbekannte Funktion zugeordnet werden. Überwiegend konnten die identifizierten Gene nicht mit der Virulenz oder der Stress-Antwort der Zelle in Verbindung gebracht werden. Das Ergebnis des IVET-Systems in dieser Arbeit zeigt, dass mit Hilfe der *In vivo*-Expressionstechnologie Gene detektiert werden können, die unter spezifischen Bedingungen in der Matrix Rinderhackfleisch exprimiert werden. Ein erster Einblick in die Genexpression des Stammes EDL933 im Rinderhackfleisch konnte gewonnen werden.

In weiteren Untersuchungen wurde ein Vergleich der Fitness von 23 *E. coli*-Isolaten der Serogruppen O26, O103 und O157 durchgeführt. Die Isolate stammten aus Lebens-

mitteln, Patienten mit HUS-Erkrankung und Tieren und wurden in der Matrix Rinderhackfleisch verglichen. Die ermittelten Unterschiede waren Stamm- und Temperatur-spezifisch. Die jeweilige Fitness der Stämme variierte abhängig von den gewählten Inkubationstemperaturen von 15°C, 20°C und 37°C. Die Untersuchung der Stämme auf zehn Virulenzfaktoren zeigte, dass die beobachteten Unterschiede in der Fitness nicht auf die Anwesenheit oder die Anzahl der Virulenzfaktoren zurückgeführt werden können. Auch zeigte sich kein Zusammenhang der Fitness mit der Bildung einer Bakterien-hemmenden Substanz.

Summary

Ground beef as a high risk food is known to be a cause of human infection with Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). The pathogens infect humans by the ingestion of undercooked ground meat and cause severe diseases like hemorrhagic colitis or the life-threatening hemolytic uremic syndrome. *E. coli* O157:H7 strain EDL933 as a representative of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), a subgroup of STEC, was analysed for *in vivo* induced genes in ground beef with the help of the *in vivo* expression technology. It could be demonstrated that the promoter selection vector pKK232-8, which contains a promoterless chloramphenicol resistance gene, is not a suitable vector for a study of gene expression in this matrix. The detection of *in vivo* expressed genes using the alcohol-soluble and bacteriostatic antibiotic was not possible. Therefore, the promoter selection vector pAK-1 was developed. The new vector system was based on a water-soluble and bactericidal kanamycin resistance gene for selection. In the present study, the vector was established and used for analysis of the gene expression in ground meat. 20 *in vivo* induced genes that were expressed during growth in ground meat under elevated temperature conditions at 42°C could be detected. Eight genes were associated with energy and nucleotide metabolism, macromolecule synthesis, transport and stress response of the cell. The major part of 12 genes was attributed to a putative or unknown function. Predominantly, identified genes could not be associated with virulence or stress response of the cell. The results of this study, using the *in vivo* expression technology, showed that genes which are expressed under specific conditions in ground meat could be detected with the help of the chosen method. A first insight into the gene expression of strain EDL933 in ground beef could be acquired.

During further investigations a comparison of the fitness of 23 *E. coli* strains belonging to serogroups O26, O103 and O157 was realized. The isolates originating from foods, patients with HUS and animals were compared in ground beef. The determined differences showed strain-specificity and temperature-specificity. The fitness of the strains varied dependent on the chosen temperatures at 15, 20 and 37 degrees. The analysis of the strains based on ten virulence factors showed that the observed differences could not be attributed to the presence or the number of virulence genes. A correlation between the fitness and the production of a bacteriocin could not be found.

7 Literaturverzeichnis

Angelichio, M. J., and A. Camilli. 2002. *In vivo* expression technology. *Infect. Immun.* 70: 6518-6523.

Appleyard, R. K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 39: 440-452.

Bachmann, B. J. 1987. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Bambauer, R., R. Latza, and R. Schiel. 2010. Therapeutic apheresis in the treatment of haemolytic uremic syndrome in view of pathophysiological aspects. *Ther. Apher. Dial.* 15: 10-19.

Banatvala, N., P. M. Griffin, K. D. Greene, T. J. Barrett, W. F. Bibb, J. H. Green, J. G. Wells, and Hemolytic Uremic Syndrome Study Collaborators. 2001. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J. Infect. Dis.* 183: 1063-1070.

Bergholz, T. M., S. K. Vanaja, and T. S. Whittam. 2009. Gene expression induced in *Escherichia coli* O157:H7 upon exposure to model apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3542-3553.

Bergholz, T. M., and T. S. Whittam. 2007. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. *J. Appl. Microbiol.* 102: 352-362.

Bernard, M. A., N. B. Ray, M. C. Olcott, S. P. Hendricks, and C. K. Mathews. 2000. Metabolic functions of microbial nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerget. Biomem.* 32: 259-267.

Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1099-1108.

Bielaszewska, M., M. Fell, L. Greune, R. Prager, A. Fruth, H. Tschäpe, M. A. Schmidt, and H. Karch. 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* 72: 1812-1816.

Bielaszewska, M., B. Sinha, T. Kuczius, and H. Karch. 2005. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G₂/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect. Immun.* 73: 552-562.

Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Blattner, F. R., G. 3rd Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462.

Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.

Bradley, D. F. 1991. Colicinogeny of O55 EPEC diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 49-52.

Bradley, D. F., S. P. Howard, and H. Lior. 1991. Colicinogeny of O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the shielding of colicin and phage receptors by their O-antigenic side chains. *Can. J. Microbiol.* 37: 97-104.

Brockmeyer, J., T. Altdick, J. Soltwisch, W. Zhang, P. I. Tarr, A. Weiss, K. Dreisewerd, J. Müthing, M. Bielaszewska, and H. Karch. 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin is cleaved and inactivated by serine protease EspPa. *Environ. Microbiol.* 13: 1327-1341.

Brooks, J. T., E. G. Sowers, J. G. Wells, K. D. Greene, P. M. Griffin, R. M. Hoekstra, and N. A. Strockbine. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.* 192: 1422-1429.

Brosius, J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27: 151-160.

Brunder, W., H. Karch, and H. Schmidt. 2006. Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ strain 3072/96. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 467-474.

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

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

Burgess, R. R., A. A. Travers, J. J. Dunn, and E. K. Bautz. 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature.* 221: 43-46.

Burk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bülte, and E. Märtilbauer. 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2106-2112.

Busch, U., I. Huber, U. Messelhäusser, S. Hörmansdorfer, und A. Sing. 2007. Nachweis Shigatoxin-bildender/Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (STEC/ EHEC) mittels Real-Time PCR. *J. Verbr. Lebensm.* 2:144–148.

Caletti, M. G., H. Lejarraga, D. Kelmansky, and M. Missoni. 2004. Two different therapeutic regimes in patients with sequelae of hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 19: 1148-1152.

Camilli, A., and J. J. Mekalanos. 1995. Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholera* genes induced during infection. *Mol. Microbiol.* 18: 671-683.

- Carey, C. M., M. Kostrzynska, and S. Thompson.** 2009. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on romaine lettuce using comparative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 77: 235-242.
- Carlin, A., W. Shi, S. Dey, and B. P. Rosen.** 1995. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 177: 981-986.
- Carruthers, M. D., and C. Minion.** 2009. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 during heat shock. *FEMS Microbiol. Lett.* 295: 96-102.
- Cebula, T. A., W. L. Payne, and P. Feng.** 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.
- Cergole-Novella, M. C., L. S. Nishimura, L. F. dos Santos, K. Irino, T. M. I. Vaz, A. M. M. Bergamini, and B. E. C. Guth.** 2007. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* 274: 329-334.
- Chiang, S. L., J. J. Mekalanos, and D. W. Holden.** 1999. *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 129-154.
- Chuang, S.-E., and F. R. Blattner.** 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 5242-5252.
- Coombes, B. K., M. E. Wickham, M. Mascarenhas, S. Gruenheid, B. B. Finlay, and M. A. Karmali.** 2008. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2153-2160.
- Creuzburg, K., B. Middendorf, A. Mellmann, T. Martaler, C. Holz, A. Fruth, H. Karch, and H. Schmidt.** 2011. Evolutionary analysis and distribution of type III effector genes in pathogenic *Escherichia coli* from human, animal and food sources. *Environ. Microbiol.* 13: 439-452.

- Dal Bello, F., J. Walter, S. Roos, H. Jonsson, and C. Hertel.** 2005. Inducible gene expression in *Lactobacillus reuteri* LTH5531 during type II sourdough fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5873-5878.
- deHaseh, P. L., M. L. Zupancic, and M. T. Record Jr.** 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 180: 3019-3025.
- Dickreuter, E.** 2010. Untersuchung zur spezifischen Genexpression von *Escherichia coli* O157:H7 unter Stressbedingungen in Hackfleisch. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.
- Dong, T., and H. E. Schellhorn.** 2009. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics* 10: 349.
- Dong, T., and H. E. Schellhorn.** 2010. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect. Immun.* 78: 887-897.
- Dong T., R. Yu, and H. Schellhorn.** 2011. Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 79: 375-386.
- Dudley, E. G.** 2008. *In vivo* expression technology and signature-tagged mutagenesis screens for identifying mechanisms of survival of zoonotic foodborne pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.* 5: 473-485.
- Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventré, J. Elion, B. Picard, and E. Denamur.** 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147: 1671-1676.
- Dziva, F., P. M. van Diemen, M. P. Stevens, A. J. Smith, and T. S. Wallis.** 2004. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 150: 3631-3645.

- Dziva, F., A. Mahajan, P. Cameron, C. Currie, I. J. McKendrick, T. S. Wallis, D. G. Smith, and M. P. Stevens.** 2007. EspP, a type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 271: 258-264.
- Eisen, J. A.** 2001. Gastrogenomics. *Nature* 409: 463-466.
- Elliot, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28: 1-4.
- Escherich, T.** 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr. Med.* 3: 515-522.
- Fantino, J.-R., Py, B., Fontecave, M., and F. Barras.** 2010. A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. *Environ. Microbiol.* 12: 2846-2857.
- Farrell, M. J., and S. E. Finkel.** 2003. The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH and nutrient environment. *J. Bacteriol.* 185: 7044-7052.
- Fernández, L., I. Márquez, and J. A. Guijarro.** 2004. Identification of specific *in vivo*-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5199-5207.
- Fratamico, P. M., S. Wang, X. Yan, W. Zhang, and Y. Li.** 2011. Differential gene expression of *E. coli* O157:H7 in ground beef extract compared to tryptic soy broth. *J. Food. Sci.* 76: 78-87.
- Gordon, D. M., and C. L. O'Brien.** 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* 152: 3239-3244.
- Gordon, D. M., M. A. Riley, and T. Pinou.** 1998. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiology* 144: 2233-2240.

Guisbert, E., T. Yura, V. A. Rhodius, and C. A. Gross. 2008. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 545-554.

Gunn, G. J., I. J. McKendrick, H. E. Ternent, F. Thomson-Garter, G. Foster, and B. A. Syngé. 2007. An investigation of factors associated with the prevalence of verotoxin producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. *Vet. J.* 174: 554-564.

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

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.

Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 373-395.

Hofinger, C., H. Karch, and H. Schmidt. 1998. Structure and function of plasmid pColD157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36: 24-29.

Hunt, M. L., D. J. Boucher, J. D. Boyce, and B. Adler. 2001. *In vivo*-expressed genes of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 69: 3004-3012.

Hüfner, E., T. Markieton, S. Chaillou, A.-M. Crutz-Le Coq, M. Zagorec, and C. Hertel. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2522-2531.

Ishihama, A. 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 499-518.

Janka, A., M. Bielaszewska, U. Dobrindt, L. Greune, M. A. Schmidt, and H. Karch. 2003. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.* 71: 3634-3638.

Jenke, C., D. Harmsen, T. Weniger, J. Rothganger, E. Hyytja-Trees, M. Bielaszewska, H. Karch, and A. Mellmann. 2010. Phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Germany, 1987-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 610-616.

Jeong, K. I., S. Tzipori, and A. S. Sheoran. 2010. Shiga toxin 2-specific but not Shiga toxin 1-specific human monoclonal antibody protects piglets challenged with enterohemorrhagic *Escherichia coli* producing Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2. *J. Infect. Dis.* 7: 1081-1083.

Karama, M., R. P. Johnson, R. Holtslander, and C. L. Gyles. 2008. Phenotypic and genotypic characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 isolates from cattle and humans. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3569-3575.

Karch, H., T. Meyer, H. Russmann, and J. Heesemann. 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* 60: 3464-3467.

Karch, H., P. I. Tarr, and M. Bielaszewska. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 405-418.

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

Käppeli, U., H. Hächler, N. Giezendanner, L. Beutin, and R. Stephan. 2011. Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 180-185.

Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, and K. J. Boor. 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 527-543.

Kemper, M. J. 2012. Outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by *E. coli* O104:H4 in Germany: a pediatric perspective. *Pediatr. Nephrol.* 27: 161-164.

Keseler, I. M., C. Bonavides-Martínez, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, R. P. Gunsalus, D. A. Johnson, M. Krummenacker, L. M. Nolan, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, A. G. Shearer, and P. D. Karp. 2009. EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* 37: 464-470.

Khan, M. A., and R. E. Isaacson. 1998. *In vivo* expression of the β -glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* occurs in mouse liver. *J. Bacteriol.* 180: 4746-4749.

Khan, M. A., and R. E. Isaacson. 2002. Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection. *Infect. Immun.* 70: 3404-3412.

Kim, J. J., T. H. Goodship, J. Tizard, and C. Inward. 2011. Plasma therapy for atypical haemolytic uraemic syndrome associated with heterozygous factor H mutations. *Pediatr. Nephrol.* 26: 2073-2076.

King, T., S. Lucchini, J. C. D. Hinton, and K. Gobius. 2010. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6514-6528.

Koch, D., D. H. Nies, and G. Grass. 2007. The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: a connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *Biometals* 20: 759-771.

Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 775-779.

Kundu, T. K., S. Kusano, and A. Ishihama. 1997. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase sigmaF holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes. *J. Bacteriol.* 179: 4264-4269.

Kyle, J. L., C. T. Parker, D. Goudeau, and M. T. Brandl. 2010. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 exposed to lysates of lettuce leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1375-1387.

Lee, K.-E., J.-S. Bang, C.-H. Beak, D.-K. Park, W. Hwang, S. H. Choi, and K.-S. Kim. 2007. IVET-based identification of virulence factors in *Vibrio vulnificus* MO6-24/O. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 234-243.

Lee, H. H., M. N. Molla, C. R. Cantor, and J. J. Collins. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. Nature 467: 82-85.

Lim, J. Y., J. W. Yoon, and C. J. Hovde. 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. J. Microbiol. Biotechnol. 20: 1-10.

Lombardo, M.-J., J. Michalski, H. Martinez-Wilson, C. Morin, T. Hilton, C. G. Osorio, J.P. Nataro, C. O. Tacket, A. Camilli, and J. B. Kaper. 2007. An *in vivo* expression technology screen for *Vibrio cholera* genes expressed in human volunteers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 18229-18234.

Lowe, A. M., D. T. Beattie, and R. L. Deresiewicz. 1998. Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology. Mol. Microbiol. 27: 967-976.

Lüders, S., C. Fallet, and E. Franco-Lara. 2009. Proteome analysis of the *Escherichia coli* heat shock response under steady-state conditions. Proteome Sci. 7: 36.

Madic, J., C. Lecreuil, F. Dilasser, S. Derzelle, E. Jamet, P. Fach, and F. Auvray. 2009. Screening of raw materials for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. Lett. Appl. Microbiol. 48: 447-451.

Mahan, M. J., J. W. Tobias, J. M. Slauch, P. C. Hanna, R. J. Collier, and J. J. Mekalanos. 1995. Antibiotic-based IVET selection for bacterial virulence genes that are specifically induced during infection of a host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 669-673.

Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. Science 259: 686-688.

Maiden, M. C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 60: 561-588.

Mandin, P., and S. Gottesman. 2010. Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. EMBO J. 29: 3094-3107.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

Marchés, O., T. N. Ledger, M. Boury, M. Ohara, X. Tu, F. Goffaux, J. Mainil, I. Rosenshine, M. Sugai, J. De Rycke, and E. Oswald. 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G₂/M transition. *Mol. Microbiol.* 50: 1553-1567.

Marchés, O., W. Siouxsie, F. Dziva, R. M. La Ragione, S. Schüller, A. Best, A. D. Phillips, E. L. Hartland, M. J. Woodward, M. P. Stevens, and G. Frankel. 2005. Characterization of two non-Locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.* 73: 8411-8417.

Marger, M. D., and M. H. Saier Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18: 13-20.

Marr, M. T., and J. W. Roberts. 2000. Function of transcription cleavage factors GreA and GreB at a regulatory pause site. *Mol. Cell.* 6: 1275-1285.

Matsui, H., M. Shimaoka, Y. Takenaka, H. Kawasaki, and O. Kurahashi. 2001. *gsk* disruption leads to guanosine accumulation in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1230-1235.

Matsuoka, Y., and K. Shimizu. 2011. Metabolic regulation in *Escherichia coli* in response to culture environments via global regulators. *Biotechnol. J.* 6: 1330-1341.

McCleery, D. R., and M. T. Rowe. 2002. Development of a model meat system and investigation of the growth characteristics and genetic stability of *Escherichia coli* O157:H7, in the absence of meat microflora. *J. Microbiol. Methods* 49: 135-145.

McMahon, M. A., J. Xu, J. E. Moore, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 2007. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 211-217.

Meng, Y. L., Z. Liu, and B. P. Rosen. 2004. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279: 18334-18341.

Mengin-Lecreulx, D., and J. van Heijenoort. 1996. Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chemistry 271: 32-39.

Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J. Bacteriol. 174: 1-7.

Molina, P. M., A. E. Parma, and M. E. Sanz. 2003. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. BMC Microbiol. 13: 17.

Mulvey, G. L., P. Marcato, P. I. Kitov, J. Sadowska, D. R. Bundle, and G. D. Armstrong. 2003. Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands. J. Infect. Dis. 15: 640-649.

Murinda, S. E., L. T. Nguyen, T. L. Landers, F. A. Draughon, A. G. Mathew, J. S. Hogan, K. L. Smith, D. D. Hancock, and S. P. Oliver. 2004. Comparison of *Escherichia coli* isolates from human, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers. Foodborne Pathog. Dis. 1: 178-184.

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

Noris, M., and G. Remuzzi. 2005. Hemolytic uremic syndrome. J. Am. Soc. Nephrol. 16: 1035-1050.

O'Brien, A. D., T. A. Lively, T. W. Chang, and S. L. Gorbach. 1983. 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., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226: 694-696.

Ochman, H., and R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J. Bacteriol. 157: 690-693.

Ohanian, M., C. Cabel, and K. Halka. 2011. Reduced dose maintenance eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS): an uptake on a previous case report. *Clin. Pharmacol.* 3: 45-50.

Osbourn, A. E., C. E. Barber, and M. J. Daniels. 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *EMBO J.* 6: 23-28.

Paget, M. S., and J. D. Helmann. 2003. The sigma 70 family of sigma factors. *Genome Biol.* 4: 203.

Panos, G. Z., G. I. Betsi, and M. E. Falagas. 2006. Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24: 731-742.

Paton, A. W., P. Srimanote, U. M. Talbot, H. Wang, and J. C. Paton. 2004. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 200: 35-46.

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

Pearce, M. C., J. Evans, I. J. McKendrick, A. W. Smith, H. I. Knight, D. J. Mellor, M. E. Woolhouse, G. J. Gunn, and J. C. Low. 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 653-659.

Peleg, A., Y. Shifrin, O. Ilan, C. Nadler-Yona, S. Nov, S. Koby, K. Baruch, S. Altuvia, M. Elgrably-Weiss, C. M. Abe, S. Knutton, M. A. Saper, and I. Rosenshine. 2005. Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J. Bacteriol.* 187: 5259-5266.

Perna N. T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamouisis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409: 529-533.

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

Pomposiello, P. J., A. Koutsolioutsou, D. Carrasco, and B. Demple. 2003. SoxRS-regulated expression and genetic analysis of the *yggX* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185: 6624-6632.

Potrykus, K., H. Murphy, X. Chen, J. A. Epstein, and M. Cashel. 2010. Imprecise transcription termination within *Escherichia coli greA* leader gives rise to an array of short transcripts, GraL. *Nucleic Acids Res.* 38: 1636-16.

Pridmore, R. D. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56: 309-312.

Raman, B., M. P. Nandakumar, V. Muthuvijayan, and M. R. Marten. 2005. Proteome analysis to assess physiological changes in *Escherichia coli* grown under glucose-limited fed-batch conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 92: 384-392.

Reid S. D., C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, and T. S. Whittam. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406: 64-67.

Reitzer, L., and B. L. Schneider. 2001. Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 422-444.

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

Riley, M. A., and J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-137.

Riordan, J. T., J. A. Tietjen, Co. W. Walsh, J. E. Gustafson, and T.S. Whittam. 2010. Inactivation of alternative sigma factor 54 (RpoN) leads to increased acid resistance, and alters locus of enterocyte effacement (LEE) expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol.* 156: 719-730.

Rocha, S. P. D., C. M. Abe, V. Sperandio, S. Y. Bando, and W. P. Elias. 2011. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. *Infect. Immun.* 79: 1833-1841.

Russo, T. A., and J. R. Johnson. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5: 449-456.

Sandvig, K., J. Bergan, A. B. Dyve, T. Skotland, and M. L. Torgersen. 2010. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* 56: 1181-1185.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Scheiring, J., S. P. Andreoli, and L. B. Zimmerhackl. 2008. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr. Nephrol.* 23: 1749-1760.

Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect. Immun.* 63: 1055-1061.

Schmidt, H., M. Bielaszewska, and H. Karch. 1999. 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., and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 14-56.

Schmidt, H., B. Plaschke, S. Franke, H. Rüssmann, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and H. Karch. 1994a. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. *Med. Microbiol. Immunol.* 183: 23-31.

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

Schmidt, H., W.-L. Zhang, U. Hemmrich, S. Jelacic, W. Brunder, P. I. Tarr, U. Dobrindt, J. Hacker, and H. Karch. 2001. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 6863-6873.

Shen, C., I. Geornaras, K. E. Belk, G. C. Smith, and J. N. Sofos. 2011. Inactivation of *Escherichia coli* in moisture-enhanced noninjected beef by pan-broiling or roasting with various cooking appliances set at different temperatures. *J. Food Sci.* 76: 64-71.

Silberstein, C., M. S. Lucero, E. Zotta, D. P. Copeland, L. Lingyun, H. A. Repetto, and C. Ibarra. 2011. A glucosylceramide synthase inhibitor protects rats against the cytotoxic effects of Shiga toxin 2. *Pediatr. Res.* 69: 390-394.

Silby, M. W., and S. B. Levy. 2004. Use of *in vivo* expression technology to identify genes important in growth and survival of *Pseudomonas fluorescens* PF0-1 in soil: discovery of expressed sequences with novel genetic organization. *J. Bacteriol.* 186: 7411-7419.

Simovitsch, M., H. Sason, S. Cohen, E. E. Zahavi, N. Melamed-Book, A. Weiss, B. Aroeti, and I. Rosenshine. 2010. EspM inhibits pedestal formation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* and disrupts the architecture of a polarized epithelial monolayer. *Cell. Microbiol.* 12: 489-505.

Slanec, T., A. Fruth, K. Creuzburg, and H. Schmidt. 2009. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6187-6197.

Smith, J. L. 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food. Protect.* 66: 1292-1303.

Stearns-Kurosawa, D. J., V. Collins, S. Freeman, D. Debord, K. Nishikawa, S. Y. Oh, C. S. Leibowitz, and S. Kurosawa. 2011. Rescue from lethal Shiga toxin 2-induced renal failure with a cell-permeable peptide. *Pediatr. Nephrol.* 26: 2031-2039.

Stenutz, R., A. Weintraub, and G. Widhalm. 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 382-403.

Stephan, R., S. Schumacher, S. Corti, G. Krause, J. Danuser, and L. Beutin. 2008. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J. Dairy Sci.* 91: 2561-2565.

Stortz, G, and R. Hengge-Aronis. 2000. Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, DC.

Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary Jr., S. Jelasic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 68: 1400-1407.

Tarr, P. I., C. R. Clausen, T. S. Whittam, and R. A. Wilson. 1998. Antibiotic resistance and O antigen expression in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 177: 1774-1775.

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

Tesch V. L. 2010. Induction of apoptosis by Shiga-toxins. *Future Microbiol.* 5: 431-453.

Trachtman, H., A. Cnaan, E. Christen, K. Gibbs, S. Zhao, D. W. Acheson, R. Weiss, F. J. Kaskel, A. Spitzer, and G. H. Hirschman. 2003. Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:1337-1344.

Tzipori, S., A. Sheoran, D. Akiyoshi, A. Donohue-Rolfe, and H. Trachtmann. 2004. Antibody therapy in the management of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 926-941.

- Verhamme, D.T., P. W. Postma, W. Crielaard, and K. J. Hellingwerf.** 2002. Cooperativity in signal transfer through the Uhp system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 4205-4210.
- Wang, J., A. Mushegian, S. Lory, and S. Jin.** 1996. Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10434-10439.
- Wang, H., J. C. Paton, and A. W. Paton.** 2007. Pathological changes in mice induced by subtilase cytotoxin, an emerging *Escherichia coli* AB₅ toxin that targets the endoplasmic reticulum. *J. Infect. Dis.* 196: 1093-1101.
- Weber, A., S. A. Kögl, and K. Jung.** 2006. Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188: 7165-7175.
- Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, and R. Hengge.** 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* 187: 1591-1603.
- Werber, D., L. Beutin, R. Pichner, K. Stark, and A. Fruth.** 2008. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1803-1806.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman, and M. Achtman.** 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60: 1136-1151.
- Yamanaka, K., and M. Inouye.** 1997. Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 5126-5130.
- Yamanaka, K., W. Zheng, E. Crooke, Y.-H. Wang, and M. Inouye.** 2001. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 39: 1572-1584.
- Yang, B., S. G. Gerhardt, and T.J. Larson.** 1997. Action at a distance for *glp* repressor control of *glpTQ* transcription in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 24: 511-521.

Yoon, J. W., and C. J. Hovde. 2008. All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J. Vet. Sci.* 9: 219-231.

Yoshimoto, T., H. Higashi, A. Kanatani, X.S. Lin, H. Nagai, H. Ovama, K. Kurazono, and D. Tsuro. 1991. Cloning and sequencing of the 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *J. Bacteriol.* 173: 2173-2179.

Young, G. M., and V. L. Miller. 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 25: 319-28.

Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch. 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1441-1446.

8 Anhang

A1: Sequenzierung des Vektors pAK-1 mit dem Oligonukleotidpaar pKK232-8-for/RP1 zur Bestätigung der korrekten Insertion der Kanamycinresistenz. Die in Großbuchstaben angegebenen Nukleotide zeigen die deletierten Nukleotide und die fettgedruckten Nukleotide das Start- und Stop-Codon der Resistenz auf. Die angegebene Sequenz stellt die Position 201-1072 des Plasmids dar.

pAK-1:

5'-gcagccaagcttgc**atg**attgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattc
ggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgtccggctgtcagcgcagggcgcccgg
tcttttgtcaagaccgacctgtccggcctgaatgaactccaagacgagggcagcgcggctatcgtggctggccac
gacgggcgttcttgcgcagctgtgctcgacgtgtcactgaagcgggaaggactggctgctattggcggaagtgcc
ggggcaggatctcctgtcatctcacctgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgat
acgcttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgcagcactcggatggaag
ccggtcttgcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaag
gcgcggatgcccgcggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatgg
ccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccctgat
tgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacgggtatcgccgctcccgattcgcagcgcac
gccttctatcgcttcttgacgagttctt**tgagCGGTCATG**ggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgct
gatgccgctggcgattcaggttcatcatgc-3'

A2: In den folgenden Tabellen sind die Zahlenwerte zu den im Abschnitt 4.1 beschriebenen und graphisch dargestellten Vorversuchen des IVET-Systems, basierend auf dem Vektor pKK232-8, aufgeführt. Die ermittelten OD₆₀₀-Werte sind weiß und die Lebendkeimzahlen grau unterlegt, jeweils mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stabw).

Tabelle A2.1: Evaluierung des Promotor-Selektionssystems basierend auf dem Vektor pKK232-8 durch Wachstumsversuche unter Zugabe verschiedener Chloramphenicol-Konzentrationen. Aufgeführt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Zeit (h)	0	2	4	6	8	24
Referenz	0,05	0,31	1,64	2,83	3,44	3,18
pKK232-8 (20)	0,05	0,33	0,40	0,36	0,37	1,14
pKK232-8 (80)	0,05	0,43	1,68	2,93	3,48	3,13
pKK-L (80)	0,05	0,29	0,33	0,30	0,30	0,32
Stabw Referenz	0	0,05	0,24	0,15	0,06	0,35
Stabw pKK232-8 (20)	0	0,06	0,09	0,03	0,03	0,04
Stabw pKK232-8 (80)	0	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02
Stabw pKK-L (80)	0	0,11	0,22	0,06	0,027	0,35
Referenz	$1,34 \times 10^8$	$3,61 \times 10^8$	$5,18 \times 10^9$	$1,27 \times 10^{10}$	$1,63 \times 10^{10}$	$1,71 \times 10^{10}$
pKK232-8 (20)	$1,11 \times 10^8$	$4,85 \times 10^8$	$9,45 \times 10^8$	$1,01 \times 10^9$	$1,12 \times 10^9$	$8,20 \times 10^9$
pKK232-8 (80)	$2,20 \times 10^8$	$5,72 \times 10^8$	$9,73 \times 10^8$	$1,07 \times 10^9$	$1,07 \times 10^9$	$6,42 \times 10^8$
pKK-L (80)	$2,31 \times 10^8$	$6,58 \times 10^8$	$7,93 \times 10^9$	$1,29 \times 10^{10}$	$1,85 \times 10^{10}$	$2,59 \times 10^{10}$
Stabw Referenz	$7,03 \times 10^7$	$3,11 \times 10^8$	$2,61 \times 10^9$	$4,68 \times 10^9$	$1,17 \times 10^9$	$3,60 \times 10^9$
Stabw pKK232-8 (20)	$9,06 \times 10^7$	$1,20 \times 10^8$	$4,22 \times 10^8$	$3,01 \times 10^8$	$6,07 \times 10^8$	$4,30 \times 10^9$
Stabw pKK232-8 (80)	$6,15 \times 10^7$	$2,32 \times 10^8$	$3,74 \times 10^9$	$3,06 \times 10^9$	$3,08 \times 10^9$	$9,49 \times 10^9$
Stabw pKK-L (80)	$1,25 \times 10^8$	$5,25 \times 10^7$	$5,46 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$	$5,77 \times 10^7$	$5,39 \times 10^8$

Tabelle A2.2: Überprüfung des IVET-Systems basierend auf dem Vektor pKK232-8 in Hackfleisch. Aufgeführt sind die Mittelwerte des relativen Wachstums der Stämme HB101 NaI^R/pKK232-8 und HB101 NaI^R/pKK-L mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

	relatives Wachstum	Stabw. relatives Wachstum
Referenz	79,7	22,94
pKK232-8 (80)	15	14,73
pKK-L (80)	381,3	120,23

Tabelle A2.3: IVET-System mit pKK232-8: Lokalisation der *ivi*-Fragmente im EDL933-Genom, Übereinstimmung mit der in der Datenbank des NCBI hinterlegten Sequenz und Orientierung des Fragments im rekombinanten *ivi*-Plasmid.

<i>ivi</i>	Gen	Genprodukt	Lokalisation im Genom	Orientierung ¹	Übereinstimmung (%) ²
2.63	<i>acrF_1</i>	N-terminales Fragment des integralen Transmembranproteins der Acridin-Efflux-Pumpe	4218307-4218770	<	100
1.78	<i>artQ</i>	Arginin-Transporter, UE	1032237-1032761	<	100
3.50	<i>gntT</i>	Glukonat-Transport	4326143-4326689	>	99
4.100	<i>mtlA</i>	Mannitol-PTS-Permease, UE	4583016-4583460	<	99
4.83	<i>aceB</i>	Malatsynthase A	5093008-5093324	<	100
3.90	<i>hyfB</i>	Hydrogenase 4, UE B	3387779-3388270	>	99
5.18	<i>accA</i>	Acetyl-CoA-Carboxyltransferase, UE α	212306-212756	<	99
2.17	<i>entE</i>	Enterobactinsynthase, UE E	708093-708567	>	100
3.86	<i>thrC</i>	Threoninsynthase	3279-3775	>	100
2.53	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamidine-synthase	3483020-3483453	>	100
1.25	<i>dnaN</i>	DNA Polymerase III, UE β	4736956-4737396	>	100
5.88	<i>rho</i>	Transkriptionsterminationsfaktor Rho	4828849-4829297	<	100
1.85	<i>rimJ</i>	N-Acetyltransferase des ribosomalen Protein S5	1569864-1570329	>	100
2.73	<i>ybdK</i>	putative Carboxylat-Amin-Ligase	689031-689550	<	100
1.95	<i>ybeU</i>	putative tRNA-Ligase	760766-761273	<	100

Fortsetzung **Tabelle A2.3:**

2.66	<i>ybjW</i>	putative Hydroxylamin-Reduktase	1428851-1429274	>	96
			1046214-1046713	>	98
2.23	<i>ydhE</i>	putativer Multidrug-Efflux-Transporter	2418534-2418594	<	99
3.31	<i>ydiD</i>	putative Acyl-CoA-Synthase	2458171-2458993	<	100
2.69	<i>yhbL</i>	putatives Isoprenoidbiosynthese-Protein mit Amdiotransferase-ähnlicher Domäne	4160032-4160553	>	100
1.11	<i>yicl</i>	putative Alpha-Xylosidase	4646273-4646774	<	100
3.56	<i>sfmD</i>	putatives Protein der äußeren Membran mit Exportfunktion	651598-652056	>	100
2.75	Z2224	Putative Permease eines Transporters	2005844-2006395	>	100
5.45	<i>yrfD</i>	hypothetisches Protein	4301829-4302157	>	100
2.20	Z0338	hypothetisches Protein	318351-319438	>	99

¹Orientierung des EDL933-Fragments im rekombinanten *ivi*-Plasmid

²Übereinstimmung mit der Sequenz des *E. coli* O157:H7 Stamms EDL933 in der Datenbank des NCBI, AE005174.

UE: Untereinheit

A3: Sequenzierung der inserierten EDL933-DNA in dem rekombinanten *ivi*-Plasmid 2.69 mit den Oligonukleotiden SP1 und SP2.69. Die fettgedruckten Nukleotide zeigen die Sequenz des *arcZ*, die unterstrichenen Nukleotide den *arcZ*-Promotor aus *E. coli* K-12 auf.

5'-gatcatcctttcgcaattgactgaaacacattaatTTTTTaaataaaaatggtacgcatcacacatttaactgattcatgt
aacaaatcatttaagtttgctatcttaactgc**gtg****cg****gg****cctg****aaaa****acag****tg****cag****tg****cc****ctt****g****ta****act****ca**
tc**ata****ata****att****ta****cg****gc****ag****cca****ag****att****cc****ct****g****gt****g****tt****g****gc****gc****ag****tatt****cg****cg****c****ac****cc****cg**
tct**ag****cc**ggggtcatttttagtggctttgccaccacgcttcagcacttctacgtcgtgacgccactcttctttcatctctt
caatccattcaccgacgttatcttcccaggcggaaggtcaggagactgaattgctgaccagctgttcagatggcg
caacccactgaccccgccgcacctttaatttatgccttctcaacaatgcctttttatcctgcgccgtcagattcgactc
cagcacgttgacatagcctggcatcat cttctcaaacaccgctaaccgctcggtgatc-3'

A4: In den folgenden Tabellen sind die Zahlenwerte zu den im Abschnitt 4.2 beschriebenen und graphisch dargestellten Vorversuchen des IVET-Systems, basierend auf dem Vektor pAK-1, aufgeführt. Die ermittelten OD₆₀₀-Werte sind weiß und die Lebendkeimzahlen grau unterlegt, jeweils mit den zugehörigen Standardabweichungen. Aufgeführt sind Werte aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Tabelle A4.1: Evaluierung des IVET-Systems basierend auf dem Vektor pAK-1. Die ermittelten OD₆₀₀-Werte sind weiß unterlegt und die Lebendkeimzahlen grau unterlegt mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stabw). Aufgeführt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Zeit (h)	0	2	4	6	8	24
Referenz	0,05	0,456	1,653	2,593	3,367	3,288
pAK-1 (50)	0,05	0,462	0,606	0,533	0,493	0,355
pAK-1 (200)	0,05	0,27	0,316	0,278	0,233	0,148
pAK-L (200)	0,05	0,404	1,428	2,12	2,932	3,162
Stabw Referenz	0	0,05	0,05	0,44	0,33	0,02
Stabw pAK-1 (50)	0	0,07	0,07	0,05	0,04	0,05
Stabw pAK-1(200)	0	0,05	0,05	0,05	0,08	0,03
Stabw pAK-L (200)	0	0,03	0,08	0,31	0,11	0,02
Referenz	1,04x10 ⁸	3,09x10 ⁸	5,28x10 ⁹	8,97x10 ⁹	1,51x10 ¹⁰	2,09x10 ¹⁰
pAK-1 (50)	9,47x10 ⁷	6,52x10 ⁸	1,61x10 ⁶	8,80x10 ⁵	3,63x10 ⁵	133x10 ⁴
pAK-1 (200)	1,67x10 ⁸	9,70x10 ⁸	4,17x10 ⁴	0	0	0
pAK-L (200)	8,87x10 ⁷	6,20x10 ⁸	4,45x10 ⁹	8,87x10 ⁹	1,23x10 ¹⁰	1,38x10 ¹⁰
Stabw Referenz	2,85x10 ⁷	8,75x10 ⁷	6,67x10 ⁸	2,10x10 ⁹	6,48x10 ⁹	1,32x10 ¹⁰
Stabw pAK-1 (50)	3,42x10 ⁷	2,58x10 ⁸	6,47x10 ⁵	3,06x10 ⁵	1,94x10 ⁵	7,32x10 ³
Stabw pAK-1 (200)	3,21x10 ⁷	8,48x10 ⁸	6,35x10 ³	0	0	0
Stabw pAK-L (200)	3,81x10 ⁷	2,83x10 ⁸	1,21x10 ⁹	3,80x10 ⁹	6,67x10 ⁹	1,11x10 ⁹

Tabelle A4.2: Überprüfung des IVET-Systems basierend auf dem Vektor pAK-1 in Hackfleisch. Aufgeführt sind die Mittelwerte des relativen Wachstums der Stämme HB101 NaI^R/pAK-1 und HB101 NaI^R/pAK-L mit den zugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

	relatives Wachstum	Stabw. relatives Wachstum
Referenz	201,67	150,77
pAK-1 (50)	35,33	16,65
pAK-1 (200)	0	0
pAK-L (200)	1110,33	574,59

Tabelle A4.3: IVET-System mit pAK-1: Lokalisation der *ivi*-Fragmente im EDL933-Genom, Übereinstimmung mit der in der Datenbank des NCBI hinterlegten Sequenz und Orientierung des Fragments im rekombinanten *ivi*-Plasmid.

<i>ivi</i>	Gen	Genprodukt	Lokalisation im Genom	Orientierung ¹	Übereinstimmung (%) ²
181	<i>cspD</i>	Kälteschockprotein	1055052-1055681	<	99
77	<i>uhpT</i>	Hexosephosphat- Transportprotein	4702974-4703890	<	99
44	<i>glmM</i>	Phosphoglukosaminmutase	4133722-4134350	<	100
74			4133374-4134350		99
170	<i>hdhA</i>	7- α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	2372312-2373151	<	100
68	<i>glpA</i>	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, UE A	3152959-3153518	>	100
17	<i>gsk</i>	Inosin-Guanosin Kinase	565219-565825	>	100
21	<i>ndk</i>	Nucleosiddiphosphatkinase	3430626-3431284	<	100
42	<i>greA</i>	Transkriptions-Elongationsfaktor	4138560-4138561	<	99
124	<i>yaiN</i>	Regulatorprotein FrmR	437856-438521	<	99
187	<i>yibK</i>	putative tRNA/rRNA Methyltransferase	4596750-4597546	>	99
63	<i>yohM</i>	Nickel/Kobalt Effluxprotein RcnA	2931499-2932081	>	99
15	Z1074	putativer Transporter	1016660-1017443	<	99
139	Z2091	putativer Regulator	1883322-1883840	>	100
18	Z2716	putatives Protein der inneren Zellmembran	2443482-2444155	>	100
130	Z2760	Zellteilungsmodulator CedA	2488363-2489055	<	100
29	<i>yciC</i>	hypothetisches Protein	1847920-1848698	<	99

Fortsetzung **Tabelle A4.3.**

131	<i>yggX</i>	hypothetisches Protein	3912108-3913100	>	100
188	<i>yjdK</i>	hypothetisches Protein	5236421-5237104	>	100
182	<i>ymcD</i>	hypothetisches Protein	1313735-1314310	<	100
146	Z4179	hypothetisches Protein	3786385-3787097	<	100
12	<i>atpI</i>	ATP Synthase, UE 1	4784551-4785069	>	100
75	<i>hlyB</i>	Hämolysintransportprotein	42432-43168*	<	99
64	<i>yjcC</i>	putatives Signaltransduktionsprotein	5158889-5159637	<	99

¹Orientierung des EDL933-Fragments im rekombinanten Plasmid

² Übereinstimmung mit der Sequenz des *E. coli* O157:H7 Stamms EDL933 in der Datenbank des NCBI, AE005174.

*Lokalisation des EDL933-Fragments auf dem Plasmid pO157, AF074613.

UE: Untereinheit

Tabelle A4.4 : Für die Sequenzierung verwendete Oligonukleotide. Die hergestellten Oligonukleotide für das „Primer walking“-Verfahren sind für das IVET-System mit dem Vektor pKK232-8 hellgrau, für das IVET-System mit dem Vektor pAK-1 dunkelgrau unterlegt.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5´-3´)*	Referenz
kan-for	gg <u>aa</u> gcttgcattggaacaagatg ¹	diese Arbeit
kan-rev	cct <u>cat</u> gaccgctcagaagaactcg ²	diese Arbeit
pKK232-8-for	cgccataaactgccaggg	diese Arbeit
RP1	ttctgccgacatggaagccatcac	Khan <i>et al.</i> , 2002
SP1	gaaaatctcgtcgaagctc	Khan <i>et al.</i> , 1998
SP2	cctgctgcaatccatcttg	diese Arbeit
SP2.20	gtgcaagcatacagatgc	diese Arbeit
SP2.23	cgcgaaacccgatcctgc	diese Arbeit
SP2.66	cgctgacatttaacagtgg	diese Arbeit
SP2.69	gcacgcagttaagatagc	diese Arbeit
SP3.31	cgctgctcctgtatgctcg	diese Arbeit
SP4.100	gcgatgtgactaacgacc	diese Arbeit
SP5.18	ggtgaaggtggttctggc	diese Arbeit
SP15	gctggcatggttactaagc	diese Arbeit
SP29	gcatcaggtctgtatgg	diese Arbeit
SP63	cggtaaacggctctgatgc	diese Arbeit
SP64	cggtgtaacgttggcctgg	diese Arbeit
SP75	ggtgactgaatggttactgg	diese Arbeit
SP77	ggtgagatgcatcacgcttcg	diese Arbeit
SP124	ggcgaataacacaacgc	diese Arbeit
SP130	ccactacacgattccagc	diese Arbeit
SP146	gcgatatttgaatatcagg	diese Arbeit
SP187	cgatgttagcatactgcc	diese Arbeit
SP188	ccactcgggcacgtatc	diese Arbeit

*Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen: ¹HindIII-Schnittstelle; ²PagI-Schnittstelle

Tabelle A5: Verwendete Oligonukleotide für den Nachweis verschiedener Virulenzfaktoren mittels PCR.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5´-3´)	Zielgen	Annealing- temperatur [°C]	Elongations- zeit [s]	Zyklen	PCR- Produktlänge [bp]	Referenz
KS7	cccggatccatgaaaaaacattattaata	<i>stxB₁*</i>	52	40	30	285	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b
KS8	cccgaattcagctattctgagtcaacg						
LP43	atcctattcccgaggagtttacg	<i>stxA₂*</i>	57	90	30	584	Cebula <i>et al.</i> , 1995
LP44	gcgatcgcgtatacacaggagc						
nleD-V-for	ggtattacatcagtcacaaagg	<i>nleD</i>	55	60	30	426	Coombes <i>et al.</i> , 2008
nleD-V-rev	ttgtggaaaacatggagc						
espM-V-for	ccttcagctcttttggtatcag	<i>espM</i>	55	60	30	542	Creuzburg <i>et al.</i> , 2011
espM-V-rev	ataacctgggatttcatttcgtag						
esp-A	aaacagcaggcacttgaacg	<i>espP</i>	56	150	30	1830	Brunder <i>et al.</i> , 1999
esp-B	ggagtcgctcagtcagtagat						
cif-internal-sens	aacagatggcaacagactgg	<i>cif*</i>	57	50	30	385	Marchès <i>et al.</i> , 2003
cif-internal-antisens	agtcaatgctttatgcgcat						
Iha-I	cagttcagtttagcattcacc	<i>iha*</i>	56	90	30	1305	Schmidt <i>et al.</i> , 2001
Iha-II	gtatggctctgatgcgatg						
subABF	gcagataaatacccttcacttg	<i>subAB</i>	56	42	40	232	Paton <i>et al.</i> , 2004
subABR	atcaccagtcactcagcc						
cdtV-F	ttcattgttcgctcctg	<i>cdtV*</i>	50	60	30	755	Cergole-Novella <i>et al.</i> , 2007
cdtV-R	tttataagctggtatcctg						

Forsetzung **Tabelle A5:**

O157-AF	aagattgcgctgaagccttg	<i>rfbE</i>	66	30	35	497	Tarr <i>et al.</i> , 1998
O157-AR	cattggcatcgtgtggacag	<i>O157*</i>					
SK1	cccgattcggcacaagcataagc	<i>eae</i>	52	60	30	863	Schmidt <i>et al.</i> , 1994a
SK2	cccgatccgtctcgccagtattcg						

Alle PCR-Produkte wurden als DNA-Sonde in einer Dot-Blothybridisierung zur Überprüfung der PCR-Ergebnisse genutzt.

*Das PCR-Produkt wurde in der Kolonie-Hybridisierung als DNA-Sonde verwendet.

Anhang

A6: In den folgenden Tabellen sind die Zahlenwerte zu den im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen und graphisch dargestellten Versuchen. Aufgeführt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen. $p(\text{EDL933})$ = auf das Wachstum von EDL933 bezogen, $p < 0,05$ gilt als signifikant.

Tabelle A6.1: Relatives Wachstum der *E. coli*-Stämme im Vergleich zum Stamm EDL933 in Hackfleisch bei 15°C.

	relatives Wachstum	Stabw. relatives Wachstum	$p(\text{EDL933})$
4993/96	$1,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	0,018
E07/236	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	0,009
E08/233	$1,8 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	0,097
E09/264	$1,4 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	0,113
LM14957/08	$1,5 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	0,244
626/98	$2,1 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	0,016
E02/753	$1,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	0,029
E06/329	$1,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	0,035
E06/332	$2,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	0,004
LM15814/08	$2,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	0,001
LM15255/07	$1,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	0,242
HBI/01	$1,2 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	0,390
RW1374	$2,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^4$	0,000
E22	$1,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	0,113
GS0740-1	$1,6 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	0,240
889	$2,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	0,002
2492/00	$1,7 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	0,003
E09/10	$1,5 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	0,191
E09/89	$1,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	0,067
E09/185	$1,4 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$	0,269
EDL933	$9,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	1
TS10/08	$7,5 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$	0,257

Anhang

Tabelle A6.2: Relatives Wachstum der *E. coli*-Stämme im Vergleich zum Stamm EDL933 in Hackfleisch bei 20°C.

	relatives Wachstum	Stabw. relatives Wachstum	p(EDL933)
2492/00	$1,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	0,948
E09/10	$1,0 \times 10^8$	$5,1 \times 10^7$	0,231
E09/89	$7,8 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	0,066
E09/185	$9,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	0,022
EDL933	$1,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	1
TS10/08	$5,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	0,000

Anhang

Tabelle A6.3: Relatives Wachstum der *E. coli*-Stämme im Vergleich zum Stamm EDL933 in Hackfleisch bei 37°C.

37°C	relatives Wachstum	Stabw. relatives Wachstum	p(EDL933)
4993/96	1,6x10 ⁵	1,5x10 ⁴	0,132
E07/236	1,2x10 ⁵	3,4x10 ⁴	0,656
E08/233	9,2x10 ⁴	3,0x10 ⁴	0,143
E09/264	7,8x10 ⁴	2,4x10 ⁴	0,046
LM14957/08	1,3x10 ⁵	5,2x10 ⁴	0,981
626/98	1,4x10 ⁵	3,4x10 ⁴	0,774
E02/753	9,2x10 ⁴	3,0x10 ⁴	0,146
E06/329	1,5x10 ⁵	3,9x10 ⁴	0,465
E06/332	1,2x10 ⁵	3,6x10 ⁴	0,770
LM15814/08	3,0x10 ⁵	6,3x10 ⁴	0,010
LM15255/07	4,3x10 ⁵	1,2x10 ⁵	0,013
HBI/01	3,5x10 ⁵	7,5x10 ⁴	0,008
RW1374	1,6x10 ⁵	1,4x10 ⁴	0,117
E22	1,5x10 ⁵	8,3x10 ⁴	0,662
GS0740-1	1,3x10 ⁵	2,5x10 ⁴	0,809
889	1,4x10 ⁵	2,2x10 ⁴	0,433
2492/00	1,3x10 ⁵	9,0x10 ³	0,701
E09/10	3,8x10 ⁵	6,3x10 ⁴	0,003
E09/89	2,8x10 ⁵	4,5x10 ⁴	0,007
E09/185	3,3x10 ⁵	1,4x10 ⁵	0,067
EDL933	1,3x10 ⁵	1,9x10 ⁴	1
TS10/08	1,3x10 ⁵	4,0x10 ⁴	0,967

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle besonders bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmidt für die Überlassung des interessanten Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation im Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim.

Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dipl.-Ing. Dr. Agnes Weiß für die zahlreichen Diskussionen fachlicher und privater Art.

Johanna Hinrichs und Markus Kranz für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der zeitaufwendigen Versuche und den zahlreichen Sequenzierungen.

allen Mitarbeitern des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen und Ratschläge.

Ellen Dickreuter für die Bearbeitung eines Teilbereiches der Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

nicht zuletzt meiner Familie und meinem Freund, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen aus fremden Quellen sind als solche gekennzeichnet.

Arnsberg, den 14. März 2012

Andrea Kroj