

**Aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie**

**der Universität zu Lübeck**

**Direktor: Prof. Dr. J. Rupp**

---

**Der Einfluss von Azithromycin auf die Adhäsion von Shigatoxin  
produzierenden *Escherichia coli* von Dauerausscheidern**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Leonie Dräger

aus Freiburg i. Brsg.

Lübeck 2019

**1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Johannes Knobloch**  
**2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Fetscher**  
**Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2020**  
**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.07.2020**  
**- Promotionskommission der Sektion Medizin-**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. <i>Escherichia coli</i>	5
1.1.1. Shigatoxin produzierende <i>Escherichia coli</i>	7
1.1.2. Seropathotypen von STEC	9
1.1.3. Adhärenzfaktoren von STEC	10
1.2. O104:H4-Epidemie in Deutschland 2011	12
1.2.1. Dekolonisationstherapie des STEAEC O104:H4	13
1.3. Azithromycin	14
1.4. Zielsetzung	15
<b>2. Material</b>	<b>17</b>
2.1. STEC-Stämme	17
2.2. Epitheliale Zelllinie	18
2.3. Antikörper	19
2.4. Kits	19
2.5. Nährmedien und Agarplatten	19
2.6. Antibiotika	20
2.7. Lösungen und Puffer	20
2.8. Chemikalien und Reagenzien	21
2.9. Verbrauchs- und Hilfsmaterialien	23
2.10. Geräte und Hardware	24
2.11. Software	25
<b>3. Methoden</b>	<b>26</b>
3.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	26
3.1.1. Langzeitaufbewahrung in Kryokulturen	26
3.1.2. Messung der optischen Dichte	26
3.2. Minimale Hemmkonzentration von Azithromycin	27
3.3. Wachstumskurven	27
3.4. Biofilmassay	28
3.5. Zellkulturassay	29
3.5.1. Mikroskopie und Auswertung	30
3.6. SDS-PAGE und Semi-dry Western Blot	30
3.6.1. Proteinextraktion	31

3.6.2. Proteinkonzentrationsmessung	32
3.6.3. SDS-PAGE	32
3.6.4. Semi-dry-Western Blot und Detektion von EibG und DnaK	33
3.6.5. Densitometrie	34
3.7. Statistik	34
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1. Bestimmung der MHK von Azithromycin im E-Test	35
4.2. Wachstumskurven unter Azithromycin	36
4.3. Biofilmassay unter subinhibitorischen Azithromycinkonzentrationen	39
4.4. Phänotypische Charakterisierung anhand des Adhärenzmusters	42
4.5. Qualitative Beurteilung des Zellkulturassays unter Azithromycin	43
4.6. Quantitative Beurteilung des Zellkulturassays unter Azithromycin	45
4.7. Detektion von EibG	50
<b>5. Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>83</b>
8.1. Abkürzungsverzeichnis	83
8.2. Tabellenverzeichnis	86
8.3. Abbildungsverzeichnis	87
8.4. Anhang	88
<b>9. Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>92</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) sind gram-negative, fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriales*<sup>116</sup>. *E. coli* wurden erstmals 1885 von Theodor Escherich im Stuhl von Säuglingen beschrieben. Zu diagnostischen Zwecken werden *E. coli* anhand ihrer Oberflächenantigene in Serotypen eingeteilt. Zu den Merkmalen gehören das O-Antigen (variable O-spezifische Seitenkette des Lipopolysaccharids) und das H-Antigen (flagellares Protein), woraus sich der O:H-Serotyp ergibt<sup>116</sup>. Derzeit sind bei *E. coli* 188 verschiedene O-Antigene und 56 verschiedene H-Antigene bekannt<sup>116</sup>. Selten werden zudem das K-Antigen (Kapsel) und das F-Antigen (Fimbrien) diagnostisch genutzt<sup>116</sup>.

*E. coli* stellen als überwiegend apathogene oder fakultativ pathogene Bakterien einen wichtigen Bestandteil der physiologischen Darmflora von Menschen und tierischen Warmblütern dar<sup>49</sup>. Als Opportunisten können *E. coli* aber auch intestinale und extraintestinale Erkrankungen verursachen. Sie verursachen rund 80 % aller Harnwegsinfektionen<sup>116</sup>. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle als Krankheitserreger bei Wundinfektionen, Appendizitis, Cholezystitis, Cholangitis und Sepsis<sup>49,116</sup>. Bei Neugeborenen werden Meningitiden am häufigsten durch *E. coli* verursacht<sup>116</sup>. Von diesen fakultativ pathogenen *E. coli* sind solche zu unterscheiden, die aufgrund ihrer Virulenzfaktoren obligat pathogen sind. Bei den obligat darmpathogenen *E. coli* werden die fünf Pathovaren Enteropathogener *E. coli* (EPEC), Enterotoxischer *E. coli* (ETEC), Enteroinvasiver *E. coli* (EIEC), Enteroaggregativer *E. coli* (EAEC) und Shigatoxin produzierender *E. coli* (STEC) unterschieden. Sie werden im Folgenden ausführlicher beschrieben. Bei der Diagnostik von Pathovaren steht weniger der Serotyp, sondern vielmehr die molekularbiologische Untersuchung von Virulenzgenen im Vordergrund.

EPEC lösen die Säuglingsdiarrhö aus. Sie besitzen die Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) mit den Genen für ein Typ-3-Sekretionssystem und für das Adhäsionsprotein Intimin (Vgl. 1.1.3). Sie adhären mithilfe des sogenannten *bundle forming pilus* (BFP), einem plasmidkodierten Protein, an das Dünndarmepithel. Die Adhäsion wird durch Intimin verstärkt. Über das Typ-3-Sekretionssystem werden Effektorproteine in die Epithelzelle injiziert. Die Mikrovilli und das Zytoskelett der

Darmepithelien werden zerstört, sodass es zum Zelltod kommt. Es entstehen sogenannte A/E-Läsionen (*attaching and effacing*). Klinisch resultiert eine wässrige bis breiige Diarrhö<sup>49,76,116</sup>.

Der ETEC ist ein häufiger Erreger der Reisediarrhö („Montezumas Rache“). ETEC adhären mithilfe von plasmidkodierten Fimbrien (*colonisation factor antigens* CFA I und CFA II) fest an das Epithel des proximalen Dünndarms. ETEC zeichnen sich durch die Produktion von hitzestabilen und hitzelablen Toxinen aus. Das hitzestabile Enterotoxin ST aktivieren die zelluläre Guanylatzyklase. Das hitzelabile Toxin LT I, welches eine 80-prozentige Ähnlichkeit zum Cholera toxin des *Vibrio cholerae* aufweist<sup>116</sup>, aktiviert die zelluläre Adenylatzyklase. Über beide Mechanismen kommt es zur Wasser- und Elektrolytsekretion. Daraus resultiert eine sekretorische Diarrhö, die circa 5 Tage anhält und unter Umständen mit bedrohlichen Elektrolyt- und Wasserverlusten einhergeht<sup>49,76,116</sup>.

Eine Infektion mit EIEC führt zu einer ruhrähnlichen, wässrigen oder hämorrhagischen Diarrhö. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in Kolonepithel invadieren und sich intrazellulär vermehren können. Es folgt eine entzündliche Reaktion mit Ulzeration und Blutungen. Zudem verfügen EIEC über ein Enterotoxin (Sen), welches zusätzlich zu Elektrolyt- und Wassersekretion führt<sup>49,59,76,116</sup>.

EAEC verursachen häufig chronische Diarrhöen. Die Namensgebung der EAEC beruht auf der ziegelsteinförmigen, autoaggregativen Adhäsion, die sie an Darmepithelien ausbilden. Diese wird durch die aggregativen Adhärenzfimbrien (AAF/I-AAF/V) vermittelt<sup>40</sup>. AAFs spielen daher eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von EAEC<sup>35,128</sup>. Ihre Expression wird durch den Transkriptionsaktivator AggR, einem wichtigen Virulenzfaktor, reguliert<sup>72,77</sup>. Sowohl AAF, als auch AggR werden von Genen kodiert, die auf dem Plasmid pAA liegen<sup>40,75</sup>. Das hitzestabile Enterotoxin EAST, ebenfalls pAA-kodiert, verursacht durch die Aktivierung der Guanylatzyklase eine Diarrhö vom sekretorischen Typ<sup>76</sup>. Zudem verfügt die Mehrheit der EAEC über SPATEs (*Serine protease autotransporters toxins of Enterobacteriaceae*), die zur Kolonisation und Schädigung des Darmepithels beitragen<sup>8</sup>. Des Weiteren ist die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms und die Induktion einer erhöhten intestinalen Mukosaproduktion, was den Erreger vor dem Ausschwemmen aus dem Darm schützt, charakteristisch für EAEC<sup>116</sup>. Daraus resultieren häufig chronische Diarrhöen von über 14 Tagen und eine Malabsorption<sup>49,76,116</sup>.

STEC zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Produktion von Shigatoxin aus<sup>49,59,76,116</sup>. Sie werden im Kapitel 1.1.1 ausführlich besprochen.

### 1.1.1. Shigatoxin produzierende *Escherichia coli*

Als Shigatoxin produzierende *E. coli* (STEC) werden solche *E. coli* bezeichnet, die das Shigatoxin (Synonym: Verotoxin, Shiga-Like-Toxin) exprimieren können<sup>51</sup>. Neben wässrigen bis hämorrhagischen Diarrhöen können STEC durch Freisetzung dieses Zytotoxins das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen. Das Shigatoxin erhielt seinen Namen aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zu dem Toxin von *Shigella dysenteriae* Serotyp 1<sup>82</sup>. Dieser Virulenzfaktor wird von Bakteriophagen kodiert<sup>81,121</sup>. Es lassen sich zwei Hauptgruppen des Shigatoxins unterscheiden, Stx1 und Stx2<sup>115</sup>. Stx2 ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf und einer höheren Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines HUS assoziiert<sup>7</sup>. STEC, die zusätzlich das Intimin-kodierende Gen *eae* besitzen (Vgl 1.1.3), werden auch als EHEC, Enterohämorrhagische *E. coli*, bezeichnet<sup>44</sup>.

Das Reservoir der STEC stellen in erster Linie domestizierte Wiederkäuer (Rinder, Schafe, Ziegen) und Wildwiederkäuer (Rehe, Hirsche) dar. Die Übertragung auf den Mensch erfolgt hauptsächlich fäkal-oral über kontaminierte Nahrungsmittel oder über direkten Kontakt zu den Tieren<sup>124</sup>. Aufgrund der geringen Infektionsdosis (1 bis 100 Kolonie bildende Einheiten beim STEC O157<sup>86</sup>) ist aber auch eine direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragung über Schmierinfektionen möglich, was zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Epidemien beiträgt<sup>133</sup>.

Bei einer Infektion mit einem humanpathogenen STEC kann es zu unterschiedlichen Ausprägungen des Krankheitsbildes kommen. Entweder verläuft sie klinisch inapparent, oder es zeigen sich nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 3-4 Tagen gastroenteritische Symptome. Diese können von wässriger Diarrhö, Erbrechen und Übelkeit bis hin zur hämorrhagischen Kolitis (HC, 10-20 %) mit blutigem Durchfall, Abdominalkrämpfen und Fieber reichen. Bei 5-10 % der symptomatischen STEC-Infektionen kommt es circa 7 Tage nach Einsetzen der Diarrhö zudem zur Ausbildung des HUS<sup>43,66,133</sup>. Dieses vital bedrohliche Krankheitsbild wurde 1955 erstmals von Gasser und Gautier beschrieben und kann als typisches HUS durchfallassoziiert (Synonym: STEC-HUS, D+HUS) oder als atypisches HUS hereditär bedingt sein oder durch Medikamente und maligne Hypertension ausgelöst werden<sup>4,41,107</sup>. Es wird zu den thrombotischen Mikroangiopathien gezählt und zeichnet sich durch die Trias Thrombozytopenie, hämolytische Anämie und akutes Nierenversagen aus. Des Weiteren können neurologische Komplikationen wie Krampfanfälle, starke Kopfschmerzen und Enzephalopathie auftreten<sup>119</sup>. Das typische HUS hat in Deutschland eine Inzidenz von 0,11/100.000, tritt

gehäuft bei Kindern zwischen 2 bis 5 Jahren auf und ist bei Jungen und Mädchen gleich verteilt<sup>52</sup>. Die Letalität beträgt in der Akutphase 2 %<sup>133</sup>. Am häufigsten wird das typische HUS vom STEC O157:H7 ausgelöst<sup>117</sup>. Die Bakterien adhäreren an der Darmmukosa, von wo aus das Shigatoxin auf noch nicht vollständig verstandenem Weg in die Blutbahn gelangt<sup>66</sup>. Hier kommt es auf unterschiedlichen Wegen zur Endothelschädigung. Zum einen bindet das Shigatoxin mit seiner B-Untereinheit an den membranständigen Glykolipid-Gb3-Rezeptor und wird über rezeptorvermittelte Endozytose interniert<sup>56,104</sup>. Die katalytische A-Untereinheit wird freigesetzt und hemmt den Elongationsschritt der Proteinbiosynthese, woraufhin es zum Zelltod kommt<sup>23,82,119</sup>. Zum anderen greift das Shigatoxin in den alternativen Weg der Komplementkaskade ein. Es bindet an Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten, woraufhin Thrombozyten- und Thrombozyten/Leukozyten-Aggregate entstehen. Das Shigatoxin vermittelt die Bindung der Komplementfaktoren C3 und C9 an die Zellaggregate und initiiert die Aktivierung von C3. Zudem hemmt das Shigatoxin den Faktor H, welcher in der Komplementkaskade eine hemmende Funktion innehat. Über C3a, C5a und den *Membrane Attack Complex* (MAC, C5b-9) kommt es zur direkten Schädigung des Endothels, Entzündung und Bildung von Mikrothromben<sup>111</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es in der Niere neben der Schädigung des glomerulären Endothels auch zur kortikalen tubulären Nekrose kommt<sup>2,119</sup>. Die Diagnose des typischen HUS stützt sich auf den Erregernachweis (Stuhlkultur, molekularbiologischer Nachweis von Shigatoxin, serologischer Nachweis von IgM-Antikörpern) und zusätzlich auf den laborchemischen Kriterien des HUS<sup>73</sup>. Hierzu gehören die hämolytische Anämie, die Thrombozytopenie und die akute Nierenfunktionsstörung. Als Therapie werden in erster Linie supportive Maßnahmen und ein adäquates Flüssigkeitsmanagement empfohlen<sup>34,66</sup>. Je nach klinischer Symptomatik besteht die Indikation zur Nierenersatztherapie (Hämo-/ Peritonealdialyse) und zur Gabe von Erythrozyten- und Trombozytenkonzentrationen<sup>73</sup>. Die Deutsche Gesellschaft für Nephrologie sprach 2011 die Empfehlung zum therapeutischen Plasmaaustausch bei Patienten mit Hämolyse, renalen und/ oder neurologischen Komplikationen aus<sup>20</sup>. Dies ist aber nicht evidenzbasiert und zudem ist die Wirksamkeit umstritten, da Shigatoxin im Blut überwiegend Leukozyten-gebunden vorliegt<sup>62</sup>. Eine spezifische antibiotische Therapie wird nach AWMF- und DEGAM-Leitlinien (Stand 11/2016 und 06/2011) nicht empfohlen<sup>48,73</sup>. Wong *et al.* beobachteten bei der antibiotischen Therapie von O157:H7-Infektionen ein erhöhtes Risiko, an einem HUS zu erkranken<sup>125</sup>. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden in der Studie wie folgt erklärt: 1. Einige Antibiotika wie z.B.

Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Chinolone steigern die Produktion von Shigatoxin, wie *in vitro* Experimente zeigten<sup>45,85</sup>, 2. Durch die Lyse von STEC wird vermehrt Shigatoxin freigesetzt<sup>85</sup> und 3. Eine Antibiotika-vermittelte Schädigung der physiologischen Darmflora begünstigt das Wachstum von STEC. Neuere Studien konnten jedoch keine Korrelation zwischen der Gabe von Antibiotika und dem Auftreten eines HUS nachweisen, sodass diese Kontraindikation inzwischen kontrovers diskutiert wird<sup>65,85,100</sup>. Zudem zeichnet sich ab, dass verschiedene Antibiotika unterschiedliche Auswirkungen auf die Shigatoxinproduktion haben, sodass eine Wirkstoffklassen übergreifende Empfehlung nicht sinnvoll ist<sup>63</sup>. Antibiotika, welche die Proteinbiosynthese inhibieren, stimulieren die Shigatoxinproduktion *in vitro* nicht<sup>87,130,131</sup>. Für Azithromycin konnte im Gegenteil *in vivo* sogar nachgewiesen werden, dass es das Überleben der Versuchstiere bei O157:H7-Infektion signifikant erhöht<sup>83,131</sup>.

### 1.1.2. Seropathotypen von STEC

Der weltweit am häufigsten isolierte STEC-Stamm hat den Serotyp O157<sup>30</sup>. In Deutschland finden sich zudem auch vermehrt die Serotypen O26, O91, O103 und O145<sup>133</sup>. Die Einteilung in Serotypen anhand der Oberflächenantigene dient diagnostischen Zwecken (Vgl. 1.1). Sie besitzt jedoch keine Aussagekraft über die entstehenden klinischen Symptome, sondern lediglich die Virulenz- und Fitnessfaktoren der Bakterien<sup>132</sup>. Karmali *et al.* erstellten 2003 daher für STEC eine Klassifikation der Seropathotypen, welche die Virulenz der Stämme berücksichtigt<sup>44</sup>. Die Kategorisierung erfolgt anhand dessen, wie oft ein Serotyp bei Erkrankungen nachgewiesen wird, wie oft er an Ausbrüchen beteiligt ist und wie hoch seine Assoziation zum HUS und zur HC ist. Es werden 5 Klassen mit der Bezeichnung A-E definiert (Tabelle 1, abgewandelt nach Karmali *et al.*, 2003). Dem Seropathotyp A gehört beispielsweise der STEC O157:H7 an, welcher weltweit am häufigsten mit Ausbrüchen und HUS assoziiert ist<sup>95</sup>. Sowohl O91, als auch O104 gehören dem Seropathotyp C an: sie können ein HUS und eine HC auslösen, werden bei Erkrankung und Ausbrüchen aber insgesamt seltener beobachtet als O157. Die untersuchten Stämme wurden von Karmali *et al.* auf das Vorhandensein der Pathogenitätsinseln LEE und OI-122 getestet und es konnte festgestellt werden, dass die Seropathotypen in abnehmender Reihenfolge (A-E) immer seltener alle untersuchten

Virulenzgene aufwiesen<sup>44</sup>. Diese Klassifizierung der Seropathotypen verdeutlicht, dass verschiedene STEC-Serotypen unterschiedliche humanpathogene Potenziale besitzen.

Sero-pathotyp	Relative Inzidenz	Assoziation mit Ausbrüchen	Assoziation mit HUS/ HC	Serotypen
A	Hoch	Gewöhnlich	Ja	O157:H7, O157:NM
B	Moderat	Ungewöhnlich	Ja	O103:H2, O26:H11, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Niedrig	Selten	Ja	O91:H21, O104:H21, O113:H21
D	Niedrig	Selten	Nein	Verschiedene
E	Nicht human-pathogen	Nicht beteiligt	Nein	Verschiedene

Tabelle 1: Seropathotypen von Shigatoxin produzierenden *E. coli* nach Karmali *et al.*, 2003.

### 1.1.3. Adhärenzfaktoren von STEC

Die bakteriellen Adhärenzfaktoren dienen der Anheftung und Kolonisation von Bakterien an abiotische und biologische Oberflächen, wie z.B. Epithel. Im Gastrointestinaltrakt bietet die Adhäsion den Bakterien Schutz vor peristaltischen Bewegungen und Ausschwemmung. Zudem stellt die Anheftung den initialen Schritt in der Infektion des Wirts dar. Adhärenzfaktoren spielen daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese und stellen somit auch potenzielle therapeutische Ansatzpunkte dar<sup>64</sup>.

Es lassen sich die spezifische und die unspezifische Adhäsion unterscheiden. Eine unspezifische Form der Adhäsion stellt die Biofilmbildung dar. Der Biofilm ist eine Ansammlung von Bakterien, die von einer extrazellulären Matrix umschlossen ist. Die Bakterien adhären als Agglomerat an biologischen und abiotischen Oberflächen<sup>33</sup>. In der Medizin ist der Biofilm unter anderem bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen und nosokomialen Infektionen relevant<sup>17,101</sup>. Die Bildung des Biofilms wird durch den Kontakt zu Oberflächen und durch Umwelteinflüsse initiiert<sup>60</sup>. Dazu zählen beispielsweise Eisenmangel, Umgebungstemperatur und ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck<sup>14,19,92</sup>. Bei *Staphylococcus aureus* konnte gezeigt

werden, dass auch subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika und Ethanol die Biofilmbildung induzieren<sup>46,93</sup>. Der Biofilm ist ein strukturell komplexes, dynamisches System<sup>33</sup>. Im Folgenden wird die Biofilmbildung von *E. coli* beschrieben. Sie kann in vier Phasen eingeteilt werden: zuerst haften die Bakterien reversibel an oberflächliche, beispielsweise humane Matrixproteine. Durch die Herunterregulierung der Flagellensynthese wechseln die Bakterien vom planktonischen in den sessilen Zustand<sup>126</sup>. Es folgt die feste Anheftung der Bakterien an die Oberfläche durch die Adhäsionsorganellen Typ I Fimbriae und *curli fimbriae*<sup>126</sup>. Anschließend wächst und reift der Biofilm. Der Autotransporter Antigen 43 (Ag43) fördert dabei die Zell-zu-Zell-Adhäsion, wodurch die dreidimensionale Struktur entsteht<sup>122</sup>. Es wird eine extrazelluläre Matrix aus EPS (*extracellular polymeric substances*) gebildet, die aus Wasser, Polysacchariden ( $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glycosamin-Polymere (PGA), Cellulose, Colansäure), Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und anderen Metaboliten besteht<sup>25</sup>. Anschließend kommt es wieder zur Umwandlung der Bakterien in ihren planktonischen Zustand und zum Herauslösen aus dem Biofilm<sup>122</sup>. Die Bakterien verteilen sich weiter im Wirtsorganismus. Im Biofilm sind basale zelluläre Funktionen reduziert<sup>33</sup>. Aufgrund der reduzierten Wachstumsrate, des veränderten Genexpressionsmusters und des mechanischen Hindernisses durch die Matrix sind die Bakterien unempfindlicher gegenüber Antibiotika<sup>13,60,99</sup>. Biofilme sind deshalb nur schwer zu eradizieren<sup>13,17</sup>. Das stellt ein therapeutisches Problem und ein hohes pathogenes Potenzial dar.

Die spezifische Adhäsion wird durch Adhäsine, eine Gruppe unterschiedlicher Proteine, vermittelt<sup>64</sup>. Sie haften an bestimmten Zielstrukturen des Wirts, woraus sich eine relative Organspezifität des Erregers ergibt<sup>39</sup>. Ein Stamm kann aber auch mehrere verschiedene Adhäsine besitzen<sup>39</sup>. Man unterscheidet zwischen fimbralen Adhäsinen (z.B. P- und S-Fimbrien) und afimbralen Adhäsinen (z.B. Intimin).

EHEC besitzen definitionsgemäß das Gen *eae*, welches ein Teil der Pathogenitätsinsel *locus of enterocyte effacement* (LEE) ist und für Intimin kodiert. Dieses Adhäsine ist notwendig für die Ausbildung von *attaching and effacing lesions* (A/E Läsionen)<sup>71,90</sup> (Vgl. 1.1). Das Intimin stellt neben dem Shigatoxin einen wichtigen Virulenzfaktor der EHEC dar. Trotzdem werden auch schwere Erkrankungen bei Infektionen mit *eae*-negativen STEC-Stämmen beobachtet<sup>76</sup>. Der Serotyp O91 ist hierbei der häufigste<sup>58</sup>. 15 % der *eae*-negativen STEC-Stämme kodieren mit *eibG* für das Protein EibG<sup>68</sup>. Bei *eae*-positiven Stämmen wurde dieses Gen nicht gefunden<sup>58,68</sup>. Der Serotyp O91 besitzt am häufigsten das *eibG*-Gen<sup>68</sup>. Das Protein gehört zu einer Gruppe von membranständigen Adhäsinen, den

sogenannten *E. coli* *immunoglobulin-binding proteins* (Eib)<sup>68</sup>. Sie gehören zu den trimeren Autotransporter Adhäsinen (TAA)<sup>57</sup>. Diese Adhäsine sind in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien verankert<sup>57</sup>. Obwohl Eib zuerst in kommensalen *E. coli*-Stämmen beschrieben wurden<sup>103</sup>, werden sie vergleichsweise häufig in STEC gefunden<sup>68</sup>. Es gibt sechs Hauptgruppen: EibA, EibB, EibC, EibD, EibE, EibF und EibG. Sie binden auf nicht immunogene Art an den Fc-Teil von humanen Immunglobulinen IgG<sup>55</sup>. Für EibC, EibD, EibF und EibG gilt das auch für IgA<sup>58</sup>.

Lu *et al.* konnten zudem zeigen, dass EibG bei *eae*-negativen O91-Stämmen die Adhäsion an HEp2-Zellen vermittelt<sup>58</sup>. Sie bilden dabei ein besonderes Adhärenzmuster aus, das *chain-like adherence pattern* (CLAP)<sup>58,68</sup>. Die Bakterien haften dabei kettenförmig aneinander und am Epithel. Die Untergruppen EibG- $\alpha$  und EibG- $\beta$  formen lange Ketten und EibG- $\gamma$  kürzere (atypisches CLAP)<sup>68</sup>. Laborstämme mit einem *eibG*-Klon bilden das CLAP ebenfalls aus<sup>58</sup>. O91-STECS, deren *eibG* durch ein Transposon unterbrochen wurde, verlieren ihre Fähigkeit zur Ausbildung des CLAP<sup>58</sup>. Lu *et al.* deuteten daher, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen EibG und dem Auftreten des CLAP gibt<sup>58</sup>.

## 1.2. O104:H4-Epidemie in Deutschland 2011

Im Jahr 2011 gab es in Deutschland einen großen STEC-Ausbruch, welcher sich vor allem auf die nördlichen Bundesländern konzentrierte. Er begann im Mai, erreichte am 22.5.2011 seinen Gipfel und wurde am 26.7.2011 vom Robert-Koch-Institut für beendet erklärt<sup>96</sup>. Als Infektionsvehikel wurden Sprossen eruiert<sup>96</sup>. Dieser Ausbruch zeichnete sich durch einige Besonderheiten aus. Der *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL) exprimierende Ausbruchsstamm hatte den Serotyp O104:H4<sup>94,97</sup>. Er zeigte sowohl typische Virulenzfaktoren eines Enteroaggregativen *E. coli*, als auch die eines Shigatoxin produzierenden *E. coli*<sup>5,94</sup>. Er besaß das EAEC-typische Plasmid pAA, das für AAF/I, AggR und andere Virulenzfaktoren kodierte<sup>3,94</sup>. Zugleich besaß der Ausbruchsstamm aber auch den STEC-charakteristischen Stx2-Prophagen<sup>94</sup>. Es wird angenommen, dass der enteroaggregative Stamm O104:H4 den Stx2-Prophagen über horizontalen Gentransfer gewonnen hat und somit virulenter geworden ist<sup>94,97</sup>. Dieser Ausbruchsstamm wird daher auch als STEAEC, Shigatoxin produzierender enteroaggregativer *E. coli*, bezeichnet<sup>12</sup>. Zudem fiel auf, dass der Ausbruchsstamm eine ungewöhnliche Anzahl und Kombination an SPATEs aufwies, die wahrscheinlich zu der hohen systemischen Aufnahme von

Shigatoxin beitragen<sup>94</sup>. Diese Kombination der Virulenzfaktoren trägt zu der Erklärung bei, warum sich der Ausbruchstamm in der Schwere der Erkrankungen klinisch wie ein EHEC verhielt, obwohl er genotypisch keiner war.

Insgesamt wurden in Deutschland 3816 Erkrankte gemeldet, wovon 855 ein HUS entwickelten (22 %)<sup>26,96</sup>. Dieser Prozentsatz ist höher als ins früheren STEC-Ausbrüchen. Bei den HUS-Patienten handelte es sich überwiegend um Erwachsene (88 %), wohingegen in den Vorjahren 69 % der HUS-Fälle Kinder betraf<sup>96</sup>. Zudem erkrankten mehr Frauen als Männer. Von den STEAEC-Infizierten waren 58 % und von den HUS-Patienten 68 % weiblich<sup>96</sup>. Die Inkubationszeit war mit 8 Tagen länger als die des STEC O157:H7<sup>96</sup>. Insgesamt verstarben 35 Patienten an einem HUS (4,1 %) und 18 an einer Gastroenteritis (0,6 %)<sup>26,96</sup>. Zudem war die bakterielle Ausscheidedauer auffällig lang. Bei HUS-Patienten lag sie im Median bei 13-14 Tagen und bei Nicht-HUS-Patienten im Median bei 33-34 Tagen<sup>96</sup>. Der Grund für die verlängerte Ausscheidung lag vermutlich in der aggregativen Adhäsion der Bakterien am Darmepithel<sup>26,123</sup>.

### **1.2.1. Dekolonisationstherapie des STEAEC O104:H4**

Eine weitere Besonderheit dieses O104:H4-Ausbruchs lag in der medikamentösen Therapie. Es wurde erstmals Eculizumab als *Off-Label*-Medikament bei persistierendem HUS und neurologischen Komplikationen eingesetzt<sup>54,65</sup>. Es handelt sich dabei um einen rekombinanten, humanisierten monoklonalen Antikörper, der an den Komplementfaktor C5 bindet und seine Spaltung in das proentzündliche C5a und C5b, einem Bestandteil des MAC, verhindert<sup>134</sup>. Dieses Medikament ist seit 2009 zur Behandlung des atypischen HUS zugelassen. Abschließende Studien zur Wirksamkeit beim typischen HUS stehen jedoch noch aus. Im Rahmen der Therapie mit Eculizumab wurde zusätzlich Azithromycin als obligate Meningokokkenprophylaxe verabreicht. Darunter wurde die Eradikation von STEAEC O104:H4 beobachtet<sup>79</sup>. Nitschke *et al.* konnten daraufhin die Korrelation zwischen Azithromycin und der Dekolonisation belegen<sup>79</sup>. 22 Patienten mit einer O104:H4-Infektion erhielten Azithromycin für 14 Tage (500 mg an Tag 1-3 und 250 mg an Tag 4, 6, 8, 10, 12, 14) und eine Kontrollgruppe von 43 O104:H4-Infizierten erhielt kein Azithromycin. In der Interventionsgruppe wurde nur ein Dauerausscheider beobachtet (>28 d nach Einsetzen der Symptome), in der Kontrollgruppe hingegen 35, was einen signifikanten Unterschied darstellte. Anschließend erhielten 15 Dauerausscheider, die

zuvor kein Antibiotikum bekamen, Azithromycin (500 mg/d) für drei Tage. Alle Patienten hatten nach Beendigung der Therapie drei STEAEC-negative Stuhlproben, was eine erfolgreiche Dekolonisation darstellte. Es wurde weder die Entstehung eines HUS, noch das Wiederauftreten der Symptome oder STEAEC-positiver Stuhlproben beobachtet<sup>79</sup>.

Eine effektive Eradikationstherapie ist vor allem für Dauerausscheider von großer Bedeutung. Klinisch können sich durch die Dauerkolonisation eine chronisch intestinale Entzündung und persistierende Diarrhöen ausbilden<sup>84</sup>. Zudem unterliegen STEC-kolonisierte Patienten bestimmten Richtlinien des Infektionsschutzgesetzes, was eine große individuelle sozioökonomische Belastung darstellen kann. Unter anderem dürfen die Patienten öffentliche Einrichtungen wie Kindergärten und Schulen nicht besuchen und temporär nicht in Produktions- und Vertriebsstätten von Lebensmitteln tätig sein. Dadurch soll die Übertragungsrate vermindert werden. Bei Genesung und dreimaliger STEC-negativer Stuhlprobe wird dieses Verbot wieder aufgehoben<sup>133</sup>. Für Patienten, die zwar klinisch symptomfrei sind, aber immer noch positiv getestet werden, stellt das eine starke Einschränkung im Alltag dar.

### **1.3. Azithromycin**

Azithromycin ist ein halbsynthetisches Azalid aus der Gruppe der Makrolidantibiotika<sup>21,89</sup>. Als solches besitzt es einen 15-gliedrigen Laktoring, den Makrolidring, und ist strukturell eng mit dem Erythromycin verwandt<sup>21,89</sup>. Azithromycin zeichnet sich durch ein basisches Sauerstoffatom im Makrolidring aus<sup>37</sup>. Dadurch ist es säurestabiler als das Erythromycin<sup>88</sup>. Makrolide binden reversibel an die 50S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen. Die Translokation der Peptidyl-t-RNA von der Akzeptor- zur Donorstelle wird blockiert, wodurch die Elongation verhindert wird<sup>50</sup>. Durch diese Hemmung der Proteinbiosynthese wirkt Azithromycin bakteriostatisch<sup>37</sup>.

Die mittlere Bioverfügbarkeit beträgt nach einer oralen 500 mg Dosis etwa 37 %<sup>21,89</sup>. Die gleichzeitige Aufnahme größerer Speisen kann dies aber um bis zu 50 % reduzieren<sup>21</sup>. Azithromycin erreicht im Gewebe bis zu 50-fach höhere Spiegel als im Plasma. Das große Verteilungsvolumen (23 l/kg) und die niedrigen Serumspiegel (0,4 µg/ml) deuten auf eine hohe Gewebeeaffinität und intrazelluläre Akkumulation hin<sup>6,21,89</sup>. Dadurch ist es auch gegen intrazelluläre und zellwandlose Bakterien (z.B. Chlamydien, Mykoplasmen) wirksam<sup>6,16</sup>. Das Antibiotikum wird teilweise hepatisch metabolisiert, biliär ausgeschieden und besitzt

eine Halbwertszeit von ca. 2-3 d<sup>21,89</sup>. Daher ist oftmals eine einmalige Gabe von 1000 mg ausreichend (z.B. bei *Chlamydia trachomatis*)<sup>89</sup>. Azithromycin besitzt ein breites Wirkspektrum, wobei es aktiver gegen gram-negative Erreger (insb. *Haemophilus influenzae*) ist als Erythromycin<sup>6,88</sup>. Indikationen zur Verabreichung von Azithromycin sind: obere und untere Atemwegsinfektionen, akute Otitis media, Haut- und Bindegewebsinfektionen und unkomplizierte Genitalinfektionen durch *Chlamydia trachomatis* oder *Neisseria gonorrhoeae*<sup>6,21,88,89</sup>. Auch Diarrhöen, die durch den EAEC ausgelöst werden, können durch Azithromycin in der Dauer und Schwere limitiert werden<sup>22,27</sup>. Die Verordnung ist in erster Linie bei sehr schweren Verläufen oder älteren, immungeschwächten oder onkologischen Patienten indiziert<sup>32</sup>. Die Anwendung von Azithromycin bei EAEC-Infektionen war 2011 mit ausschlaggebend dafür, dieses Antibiotikum bei Dauerausscheidern von STEAEC O104:H4 zu verwenden<sup>80</sup>. Generell gilt Azithromycin jedoch als nicht gut wirksam gegen *E. coli*<sup>1</sup> und ist bei diesen Infektionen nicht das Antibiotikum der ersten Wahl.

#### 1.4. Zielsetzung

Infolge der erfolgreichen Dekolonisationstherapie wandten sich auch Patienten an das UKSH Campus Lübeck, die mit einem anderen STEC-Stamm als dem Ausbruchsstamm O104:H4 dauerhaft besiedelt waren. Von diesen Patienten stammen die Stuhlproben, aus denen die in dieser Arbeit untersuchten STEC isoliert wurden. Sie konnten ebenfalls erfolgreich mit Azithromycin (500 mg/d, 3 Tage) therapiert werden<sup>47</sup>. Es stellt sich die Frage, warum Azithromycin als ein Antibiotikum, welches als nicht sehr effektiv gegen *E. coli* gilt, trotzdem so gut in der Dekolonisationsbehandlung von STEC-Dauerausscheidern wirkt. In dieser Arbeit sollte daher *in vitro* die Interaktion zwischen STEC und Azithromycin, die dieser Therapie zu Grunde liegt, näher untersucht werden. Hierbei wurde der Fokus auf die Adhäsion der Bakterien an humane Epithelzellen gelegt, da dies ein entscheidender Schritt in der Pathogenese ist. Es sollte der Einfluss von Azithromycin sowohl auf die unspezifische Adhäsion, als auch auf die spezifische Adhäsion untersucht werden. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe deutete sich bereits an, dass STEC mit dem Serotyp O91 ihr Adhäsionsmuster CLAP verlieren, wenn sie mit Azithromycin beimpft werden. Da dies durch das Adhäsion EibG vermittelt wird, sollte im

Speziellen untersucht werden, welche Rolle dieses Protein in der Interaktion zwischen STEC und Azithromycin spielt.

## 2. Material

### 2.1. STEC-Stämme

Bei den verwendeten STEC-Stämmen handelte es sich um Wildtyp-Stämme, welche ab 2011 aus Stuhlproben von Dauerausscheidern isoliert wurden. Die Patienten waren mit anderen Stämmen als dem Ausbruchsstamm von 2011, O104:H4, kolonisiert.

Stamm	Serotyp	Charakteristika
DA01	O26:H11	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 24 µg/ml kettenförmige Adhärenz schwache Biofilmbildung
DA02	O16:H21	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 32 µg/ml diffuse Adhärenz schwache Biofilmbildung
DA07	O91:H14	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 16 µg/ml kettenförmige Adhärenz starke Biofilmbildung
DA08	O91:H14	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 24 µg/ml kettenförmige Adhärenz
DA09	O91:H14	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 16 µg/ml kettenförmige Adhärenz
DA11	O181:H49	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 24 µg/ml diffuse Adhärenz keine Biofilmbildung
DA18	O174:H21	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 16 µg/ml diffuse Adhärenz schwache Biofilmbildung

DA24	O91:H14	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 24 µg/ml kettenförmige Adhärenz starke Biofilmbildung
DA25	O103:H2/H25/H11	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 32 µg/ml diffuse Adhärenz starke Biofilmbildung
DA26	O91:H14	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 32 µg/ml kettenförmige Adhärenz starke Biofilmbildung
DA29	O146:H28	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 24 µg/ml diffuse Adhärenz starke Biofilmbildung
ST24	O156:H25	MHK <sub>Azithromycin</sub> = 24 µg/ml diffuse Adhärenz starke Biofilmbildung

**Tabelle 2: In der Arbeit verwendete STEC-Stämme**

## 2.2. Epitheliale Zelllinie

Die verwendete epitheliale Zelllinie HEP2 (Humane Epitheliomzellen Typ 2) wurde von der AG Rupp, Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie des UKSH Campus Lübeck, zur Verfügung gestellt.

### 2.3. Antikörper

Antikörper	Anbieter
Anti-Mouse IgG1 heavy chain, HRP ( <i>Horseradish-Peroxidase</i> )-konjugiert (Ziege)	abcam <sup>®</sup> , Cambridge, UK
Anti-DnaK IgG1 (Maus)	abcam <sup>®</sup> , Cambridge, UK
HRP( <i>Horseradish-Peroxidase</i> )-konjugiertes Fc-Fragment von humanem IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Antikörper

### 2.4. Kits

Kit	Anbieter
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
SuperSignal <sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Kits

### 2.5. Nährmedien und Agarplatten

Nährmedium/ Agarplatte	Zusammensetzung/ Anbieter
Antibiotikafreies Nährmedium für Zellkulturassay	500 ml DMEM High Glucose 4,5 g/l 16,6 ml HEPES 50 ml FCS
Antibiotikahaltiges Nährmedium für Zellkulturassay	500 ml DMEM High Glucose 4,5 g/l 16,6 ml HEPES 50 ml FCS 5 ml Penicillin/ Streptomycin- Lösung

Columbia-Blutagar + 5 % Schafsblut (COS)	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Dulbecco's MEM (DMEM)	Biochrom GmbH, Berlin
LB-Medium	20 g/l LB Broth, Sigma-Aldrich, Steinheim
Mac Conkey-Agar (MCK)	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Müller Hinton E-Agar (MHE)	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich

**Tabelle 5: In der Arbeit verwendete Nährmedien und Agarplatten**

## 2.6. Antibiotika

Antibiotikum	Anbieter
Azithromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Etest <sup>®</sup> Azithromycin	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin

**Tabelle 6: In der Arbeit verwendete Antibiotika**

## 2.7. Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Blotto	5 % (w/v) Milchpulver 0,05 % (v/v) TWEEN 1x TBS
Laemmli-Probenpuffer 3x	15 % (v/v) Glycerin 1,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,15 M Tris- Puffer, pH=6,8 7,5 % (w/v) SDS 0,03 % (w/v) Bromphenolblau ad 15 ml <i>A. dest</i>

Laufpuffer 10x	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 l <i>A. dest</i>
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	140 mM NaCl 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KCl 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=7,4
TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) 10x	0,5 M Tris-Puffer, pH=7,6 9 % (w/v) NaCl ad 1 l <i>A. dest</i>
TBS-T	1x TBS 250 µl Tween ad 500 ml <i>A. dest</i>
Transferpuffer 10x	0,48 M Tris-Puffer, pH=6,8 20 % (v/v) Methanol 0,39 M Glycin ad 1 l <i>A. dest</i> pH=9,0-9,4
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH=8,0 0,1 mM EDTA

**Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Lösungen und Puffer**

## 2.8. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Anbieter
Bromphenolblau, Na-Salz	ROTH, Karlsruhe
Chlorwasserstoff (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ROTH, Karlsruhe

---

Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> , FCS)	PAN™ Biotech, Aidenbach
Gentianaviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Giemsa	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	ROTH, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HEPES-Puffer (1 M)	Biochrom GmbH, Berlin
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	ROTH, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	ROTH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma® Base (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma® Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin- EDTA 1x	Life Technologies, Darmstadt
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
α-D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
100 % Ethanol, vergällt	Baker Avantor Performance, Deventer, Niederlande
70 % Isopropanol	ROTH, Karlsruhe

---

**Tabelle 8: In der Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien**

## 2.9. Verbrauchs- und Hilfsmaterialien

Verbrauchs- und Hilfsmaterial	Anbieter
Amersham™ Protran™ 0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
BD Falcon Tubes, 15 ml, 50 ml	BD Bioscience, Durham, USA
Cellstar® 12 Well Cell Culture Plate, steril, mit Deckel	Greiner bio-one, Kremsmünster
Cellstar® 96 Well Suspension Culture Plate, steril, mit Deckel	Greiner bio-one, Kremsmünster
Cellstar® cell culture flask, 550 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster
Cryobank™	Mast Diagnostica, Reinfeld
Einmalöse, 10 µl	Greiner bio-one, Kremsmünster
FastPrep 24 Lysing Matrix B	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Filterpapier	Bio-Rad, München
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Immersionsöl	OLYMPUS, Hamburg
MENZEL-Deckgläser	Menzel, Braunschweig
MENZEL-Objektträger	Menzel, Braunschweig
MILLEX®GV Filter Unit Durapore®, 0,22 µm	Merck, KGaA, Darmstadt
nUView Precast Gels, Tris-Glycine NB 4-20 %	NuSeq, Lane Cove, Australien
Parafilm M® Laboratory Film	Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Trifill Multi Channel Pipetter Reservoir	Camlab, Cambridge, UK

**Tabelle 9: In der Arbeit verwendete Verbrauchs- und Hilfsmaterialien**

## 2.10. Geräte und Hardware

Gerät/ Hardware	Anbieter
Biofuge® 22R Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Infinite M200 Microplate Reader	TECAN, Männedorf, Schweiz
Magnetrührer	Gerhardt, Königswinter
Mikroliterpipetten Reference®, Research Plus®	Eppendorf Hamburg
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, Hercules, USA
Nanophotometer P330	Implen, Inc., Westlake Village, USA
peQLab Electrophoresis Power Supply EV231	VWR Life Science Competence Center, Erlangen
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Pipetus®	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage GJ	Kern, Balingen
Precellys® 24	bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Schüttelinkubator SM-30 Control, Inkubationshaube TH 30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sterilbank Biohit	Antares, Köln
Systemmikroskop BX51	OLYMPUS, Hamburg
Systemmikroskopkamera SC30	OLYMPUS, Hamburg
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA

Ultraschallgerät Sonopuls HD 2070	Bandelin electronic, Berlin
UV Transluminator Fusion Fx7	Vilber Lourmat, Eberhardzell
VortexGenie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

**Tabelle 10: In der Arbeit verwendete Geräte und Hardware**

## 2.11. Software

Software	Anbieter
analySIS getIT OLYMPUS Imaging	OLYMPUS, Hamburg
BIO-1D 12.14	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Fusion Molecular Imaging	Vilber Lourmat, Eberhardzell
GraphPad Prism® 7	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
i-control™ 1.9	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Image J	Wayne Rasband
Microsoft Office 2014	Microsoft Corporation, Redmount, USA

**Tabelle 11: In der Arbeit verwendete Software**

## **3. Methoden**

### **3.1. Kultivierung von *E. coli***

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf COS-Platten, die über Nacht (16-24 h) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Bereits beimpfte Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert und zu Beginn eines Experiments erneut ausgestrichen. Für eine Vorkultur in Flüssigmedium wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm schüttelnd inkubiert.

#### **3.1.1. Langzeitaufbewahrung in Kryokulturen**

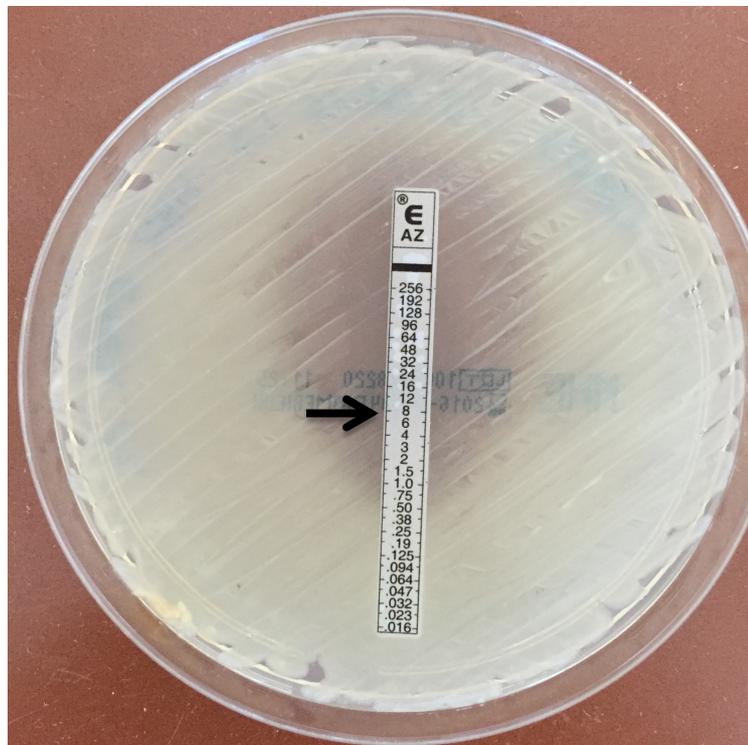
Zur Langzeitaufbewahrung der bakteriellen Stämme wurden Kryokulturen angefertigt. Von einem am Vortag frisch angeimpften Festnährmedium wurden mehrere Kolonien mit einer sterilen 10 µl-Öse aufgenommen und in ein Cryobank™- Röhrchen überführt. In der kryoprotektiven, hypertonen Lösung hafteten die Bakterien an Glaskugeln. Die Kryokulturen wurden bei -80 °C eingefroren und gelagert. Bei erneuter Verwendung wurden die Röhrchen langsam auf Eis aufgetaut, eine Glaskugel entnommen und auf einer COS-Platte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Bevor dieser Stamm einem Versuch zugeführt wurde, wurde er ein zweites Mal auf eine COS-Platte überimpft und bebrütet, um eine Verzerrung der Versuche durch verlangsamtes Wachstum auszuschließen.

#### **3.1.2. Messung der optischen Dichte**

Um näherungsweise die Konzentration von Bakterien in einem Flüssigmedium zu bestimmen, wurde die optische Dichte ermittelt. Am *Nanophotometer P330* wurde die Probe bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das Medium als Referenz gemessen. Die anschließende Verdünnung der Vorkultur auf einen gegebenen OD<sub>600</sub>-Zielwert erfolgte dem jeweiligen Versuchsprotokoll entsprechend.

### 3.2. Minimale Hemmkonzentration von Azithromycin

Zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Azithromycin wurde der Epsilon-Test (E-Test) angewandt. Dazu wurde ein *Etest*<sup>®</sup>-Streifen auf eine mit dem zu testenden Stamm beimpfte MHE-Platte gelegt. Der *Etest*<sup>®</sup> enthielt Azithromycin, wobei die Konzentration des Antibiotikums entlang des Streifens exponentiell abnahm. Von dort ausgehend diffundierte Azithromycin in die Agarplatte. Bei der Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht entstand so ein ellipsenförmiger Hemmhof im Bakterienrasen. An der Schnittstelle zwischen Hemmhof und *Etest*<sup>®</sup> kann auf dem Streifen die MHK abgelesen werden (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Epsilon-Test.** Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Azithromycin lässt sich an der Schnittstelle zwischen Hemmhof und Teststreifen ablesen (Pfeil). In diesem Beispiel beträgt die MHK 8 µg/ml. Der ellipsenförmige Hemmhof entsteht durch die Diffusion von Azithromycin vom *Etest*<sup>®</sup> in die Agarplatte.

### 3.3. Wachstumskurven

Um zu untersuchen, inwiefern das Wachstum in Abhängigkeit von Azithromycin verzögert wird, wurden Wachstumskurven von Shigatoxin produzierenden *E. coli* erstellt. Die Kultur erfolgte unter Zugabe von Azithromycin in unterschiedlichen, jedoch stets subinhibitorischen Konzentrationen.

Für die Vorkultur wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stamms von einer frischen COS-Platte in 5 ml LB-Medium bzw. 5 ml DMEM überführt. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Am Folgetag wurde die Vorkultur mit LB-Medium bzw. DMEM auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt, um näherungsweise die gleiche Konzentration an Bakterien in allen Ansätzen zu erzielen. Dem Medium wurde Azithromycin in den Konzentrationen 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml und 4 µg/ml hinzugefügt. Von der Kultur wurden jeweils 3,5 ml im Doppelansatz in eine 12er Wellplatte überführt und die Zwischenräume mit 5 ml *Aqua bidest* aufgefüllt, um ein Austrocknen zu verhindern. Mithilfe des *Infinite M200 Microplate Reader* wurde die Wachstumskurve bei 37 °C für 16 h aufgezeichnet. In einem Intervall von 30 min wurde pro Well an 25 Stellen die Absorption bei 600 nm gemessen. Vor jeder Messserie wurde die Platte für 10 s mit einer Amplitude von 2 mm geschüttelt, um die Bakterien homogen zu verteilen. Von allen 25 Absorptionswerten, die zu einem Zeitpunkt gemessen wurden, wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

### **3.4. Biofilmassay**

Mithilfe dieses Assays kann die Ausbildung eines Biofilms an Plastikoberflächen unter dem Einfluss von Azithromycin semi-quantitativ untersucht werden (In Anlehnung an Christensen *et al.*)<sup>11</sup>.

Eine Einzelkolonie des zu untersuchenden Stamms wurde mithilfe einer sterilen 10 µl-Öse von einer MCK-Platte in 5 ml LB-Medium überführt. Diese Vorkultur wurde für 4 h im Schüttelinkubator bei 37 °C bebrütet, sodass sich die Bakterien zum Untersuchungszeitpunkt in der logarithmischen Phase befanden. Es wurden pro Ansatz 2 ml DMEM 1 % Glucose in sterile Pipettierschalen vorgelegt und Azithromycin in den Konzentrationen 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml und 4 µg/ml hinzugefügt. Von der Vorkultur wurden 20 µl hinzupipettiert. Anschließend wurden pro Well 200 µl der Suspension auf eine 96er Wellplatte transferiert. Es wurde jeweils ein Vierfachansatz durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Am nächsten Tag wurde das Medium mit den Bakterien, welche nicht durch einen Biofilm am Boden des Wells hafteten, durch Ausklopfen auf Zellstoff entfernt. Zur Fixierung wurden die Wellplatten bei offenem Deckel im Brutschrank getrocknet. Die Bakterien wurden für 15 min mit 50 µl Gentiana violett pro Well gefärbt. Anschließend wurden

Farbrückstände vorsichtig mit *Aqua dest*, das tangential an der Platte entlanglief, entfernt. Die Wellplatte wurde abermals getrocknet. Die fixierten und gefärbten Bakterien wurden durch eine 15 minütige Inkubation mit 150 µl 70 % Isopropanol vom Plastik gelöst und resuspendiert. Anschließend konnte die Absorption bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm im *Infinite M200 Microplate Reader* gemessen werden. Ein Wert von <0,1 war als Biofilm-negativ definiert, 0,1 bis 0,4 als schwach Biofilm bildend und >0,4 als stark Biofilm bildend.

### 3.5. Zellkulturassay

Der Zellkulturassay diente der Beurteilung des Adhäsionsmusters der einzelnen STEC-Stämme, sowie der quantitativen Bestimmung des Einflusses von Azithromycin auf die Adhäsion.

Zu Beginn wurde die Zellkulturflasche mit HEp2-Zellen makro- und mikroskopisch auf Verunreinigungen untersucht und anschließend mit 30 ml PBS gewaschen. Dann wurden 5 ml Trypsin hinzupipettiert, gleichmäßig über dem Zellrasen verteilt und für 5 min inkubiert, wodurch sich die Epithelzellen vom Flaschenboden lösten. Die Suspension wurde in einen 50 ml Falcontube mit 10 ml PBS 20 % FCS transferiert, um die Reaktion abzustoppen, und anschließend bei 4000 rpm und 30 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml antibiotikahaltigem Nährmedium (2.5) resuspendiert. Mit einer sterilen Pinzette wurde je ein autoklaviertes Deckglas in die Vertiefungen einer sterilen 12er Wellplatte platziert. In jedes Well wurden 50 µl der HEp2-Zellsuspension sowie 1 ml des antibiotikahaltigen Nährmediums pipettiert. Die Zellkultur wurde für zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der zu untersuchende Stamm wurde auf einer COS-Platte frisch ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am nächsten Tag wurde von diesem Agar eine Kolonie mit einer sterilen 10 µl Öse in 5 ml LB-Medium transferiert. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator angezüchtet.

Am dritten Tag wurde der Nährmedienüberstand der Wellplatte abpipettiert und die Wells mit je 1 ml PBS gewaschen, um Antibiotikarückstände zu eliminieren. Dann wurde je 1 ml antibiotikafreies Nährmedium (2.5) und Azithromycin mit den Zielkonzentrationen 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml und 4 µg/ml in die Wells pipettiert.

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 50 µl der Vorkultur hinzugefügt. Die Zellkultur wurde für 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Im Anschluss wurden die Epithelzellen und Bakterien fixiert und gefärbt. Dazu wurde der Überstand verworfen und die Zellen dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden sie mit je 0,5 ml 70 % Ethanol für 5 min fixiert und anschließend 4 min lang mit je 0,5 ml Giemsa gefärbt. Die Wells wurden so lange mit *Aqua dest* gespült, bis alle freien Farbrückstände herausgewaschen waren. Die Deckgläser wurden auf Objektträger platziert und getrocknet.

### **3.5.1. Mikroskopie und Auswertung**

Mikroskopisch wurde jeder Ansatz des Zellkulturassays nach HEp2-Zelldichte, Bakteriendichte, Adhärenz der Bakterien an HEp2-Zellen, Adhärenz der Bakterien an das Deckglas und Adhärenzmuster beurteilt. Bei einer hundertfachen Vergrößerung wurden jeweils 16 digitale Aufnahmen gemacht (4 Reihen à 4 Bilder). Mithilfe von *ImageJ* wurden in 16 bzw. 8 Aufnahmen die HEp2-Zellen und Bakterien ausgezählt und anschließend das Verhältnis von Bakterien pro Zelle gebildet.

### **3.6. SDS-PAGE und Semi-dry Western Blot**

Die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist ein Verfahren zur Auftrennung eines Proteingemisches anhand des Molekulargewichts (nach Laemmli)<sup>53</sup>. Hierbei wird die Probe zuerst in einem reduzierenden Puffer bei 95 °C erhitzt, sodass Wasserstoff- und Disulfidbrücken aufgebrochen und die Proteine denaturiert werden. Das im Probenpuffer enthaltene anionische SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet in einem festen Verhältnis an die Proteine, sodass diese eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Dadurch werden die Proteine nur anhand ihrer Größe, nicht aber anhand ihrer Ladung getrennt. Die Proben werden auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetragen und wandern im Spannungsfeld in Richtung Anode. Das Gel fungiert dabei als Sieb, durch welches kleine Proteine schneller und somit eine längere Strecke migrieren können als große.

Die aufgetrennten Proteine werden anschließend durch einen Western Blot auf eine Trägermembran transferiert. Das Gel wird kathodenseitig auf die Membran gelegt und eine

elektrische Spannung angelegt. Die SDS-beladenen Proteine wandern in Richtung Anode auf die Membran. Die Detektion erfolgt, wie in dieser Arbeit der Fall, z.B. durch Chemilumineszenz. Die Trägermembran wird mit einem primären Antikörper inkubiert, der sich gegen das zu untersuchende Protein richtet. Dann wird der sekundäre, HRP (*Horseradish-Peroxidase*)-konjugierte Antikörper hinzugegeben, der am Fc-Teil des primären Antikörpers bindet. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol. Die frei werdende Lumineszenz kann mithilfe einer Analysekamera aufgenommen werden.

### 3.6.1. Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden zwei Methoden angewandt und ihre Effektivität im Western Blot verglichen. Für beide Methoden wurde eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator angezchtet. Davon wurde die Hauptkultur mit einer  $OD_{600}=0,05$  in 250 ml LB-Medium angesetzt. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einem Stopfen versehen und die Inkubation fortgesetzt. Nach 5,5 h und 24 h wurden jeweils 30 ml (Mechanischer Zellaufschluss) bzw. 100 ml (Zellaufschluss durch Sonifizierung) entnommen und in Falcontubes überführt. Die Bakterien der ersten Probe befanden sich so in der exponentiellen, die der zweiten Probe in der stationären Wachstumsphase. Die Suspension wurde anschließend für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Nun folgte entweder der mechanische Zellaufschluss oder der Zellaufschluss durch Sonifizierung.

#### Mechanischer Zellaufschluss:

Die Zellpellets wurden in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde in ein *Lysing Matrix B*-Röhrchen überführt. Dies enthält 0,1 mm große Beads zur mechanischen Lyse von grampositiven und gramnegativen Bakterien. Die Probe wurde im *Precellys 24* 30 s bei 6800 rpm für 30 s lysiert. Um die Beads abzusenken, wurde anschließend die Suspension bei 4000 rpm und 4 °C für 25 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Proteinprobe entnommen und die Konzentration gemessen (3.6.2).

### Zellaufschluss durch Sonifizierung:

Die Zellpellets wurden in 8 ml PBS-Puffer resuspendiert, 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert und wieder in 8 ml PBS-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden sie mithilfe des Ultraschallgeräts *Sonopuls HD 2070* für 20 s bei einer Amplitude von 70 % sonifiziert. Die Suspension wurde erneut für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Die Proteinprobe wurde aus dem Überstand entnommen und die Konzentration gemessen (3.6.2).

Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.6.2. Proteinkonzentrationsmessung**

Die Proteinkonzentration wurde am *Nanophotometer P330* mit der *Submicroliter Cell* gegen PBS als Referenz gemessen. Das Funktionsprinzip beruht auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz, wonach sich die Konzentration eines homogen gelösten Stoffes anhand seiner Absorption berechnen lässt. Die Wellenlänge des monochromatischen Lichts, bei der aromatische Aminosäuren maximal absorbieren, ist  $\lambda = 280$  nm.

$$E_{\lambda} = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = c \times \varepsilon_{\lambda} \times l$$

- $E_{\lambda}$ = Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$
- $I$ = Intensität des transmittierten Lichts
- $I_0$ = Intensität des einfallenden Lichts
- $c$ = Konzentration der absorbierenden Substanz
- $\varepsilon_{\lambda}$ = dekadischer Extinktionskoeffizient
- $l$ = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

### **3.6.3. SDS-PAGE**

Die extrahierten Proteine wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit dem Laemmli-Probenpuffer auf 30 µg Protein in 25 µl verdünnt. Die Probe wurde im *Thermomixer comfort* bei 95 °C und 600 rpm für 5 min aufgekocht, um die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufzubrechen. Die Probe wurde sofort auf ein *nUView Precast Gel* aufgetragen. Zusätzlich wurden 10 µl der *Spectra Multicolor Broad Range*

*Protein Ladder* als Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Gele wurden bereits in der Vorbereitung in das *Mini-PROTEAN® Tetra System* eingespannt. Die Kammer wurde bis zu der vorgegeben Markierung mit 1x Laufpuffer gefüllt und an das Netzgerät angeschlossen. Die Gelelektrophorese lief 1 h bei 150 V, 300 mA und 150 W. Aufgrund der Blaufärbung des Laemmli-Probenpuffers mit Bromphenolblau konnte beurteilt werden, ob die Proben weit genug gewandert waren.

#### **3.6.4. Semi-dry-Western Blot und Detektion von EibG und DnaK**

In Vorbereitung auf den *Semi-dry-Western Blot* wurden Filterpapiere für 1 min in Transferpuffer eingelegt. Dann wurden die Filterpapiere, eine Nitrocellulosemembran, das Gel und wiederum Filterpapiere bündig in die *Trans-Blot®*-Kammer eingespannt und vorsichtig ausgestrichen, um Luftblasen zu entfernen. Es wurde eine Spannung von 10 V bei 300 mA und 120 W für 1 h angelegt.

Im Anschluss wurde die Membran, an der die transferierten Proteine hafteten, dreimal für 10 min mit 25 ml PBS-T gewaschen. Freie Proteinbindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation mit 25 ml Blotto blockiert. Es folgten abermals drei Waschschrte mit 25 ml PBS-T für 10 min. Die Membranen, auf denen EibG detektiert werden sollte, wurden über Nacht mit 0,1 µg/ml HRP-konjugiertem Fc-Fragment von humanem IgG unter leichtem Schwenken inkubiert. Hierbei handelte es sich um eine Abwandlung des klassischen Western Blots, da in diesem Fall das zu detektierende Protein EibG selber die Fc-bindende Eigenschaft aufweist und nicht von einem konjugierten Antikörper gebunden wird (2.5). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit 25 ml PBS-T gewaschen, um ungebundene Fc-Fragmente zu entfernen.

Die Membranen, bei denen das DnaK nachgewiesen werden sollte, wurden über Nacht mit 0,2 µg/ml des primären Antikörpers Anti-DnaK-IgG1 inkubiert. Dann erfolgten zwei Waschschrte mit PBS-T, bevor der sekundäre Antikörper (Anti-Mouse IgG1 heavy chain) mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml für 1 h hinzupipettiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte mithilfe des Chemilumineszenz-Kits *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* und der Analysekamera *UV Transluminator Fusion Fx7*. Die verwendete Software war *Fusion Molecular Imaging, Vilber Lourmat, Deutschland*.

### **3.6.5. Densitometrie**

Zur quantitativen Auswertung der Signalintensität einzelner Banden im Western Blot wurde die Software *BIO-1D*, *Vilber Lourmat, Deutschland*, verwendet.

### **3.7. Statistik**

Zur statistischen Auswertung und Erstellung von Grafiken wurde die Software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 7, *GraphPad Inc., USA* verwendet. Bei jeder statistischen Auswertung ist angegeben, welcher Test angewandt wurde. Das Signifikanzniveau wurde bei  $\alpha=0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestimmung der MHK von Azithromycin im E-Test

Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Azithromycin wurde mithilfe des Epsilon-Tests bestimmt. Die Stämme DA07, DA09 und DA18 wiesen eine MHK von 16 µg/ml auf. Die Stämme DA01, DA08, DA11, DA24, DA29 und ST24 zeigten eine MHK von 24 µg/ml. Ein Wert von 32 µg/ml wurde bei den Stämmen DA02, DA25 und DA26 beobachtet (Tabelle 12). Die Konzentration von Azithromycin wurde in den Experimenten so gewählt, dass sie im subinhibitorischen Bereich lag. Somit war die höchste eingestellte Konzentration 16 µg/ml in den Western Blot-Versuchen und 4 µg/ml im Biofilmassay, im Zellkulturassay und in den Wachstumskurven.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse mit den Charakteristika der einzelnen Stämme findet sich im Anhang (Anhang Tabelle 19).

Stamm	MHK <sub>Azithromycin</sub>
DA01	24 µg/ml
DA02	32 µg/ml
DA07	16 µg/ml
DA08	24 µg/ml
DA09	16 µg/ml
DA11	24 µg/ml
DA18	16 µg/ml
DA24	24 µg/ml
DA25	32 µg/ml
DA26	32 µg/ml
DA29	24 µg/ml
ST24	24 µg/ml

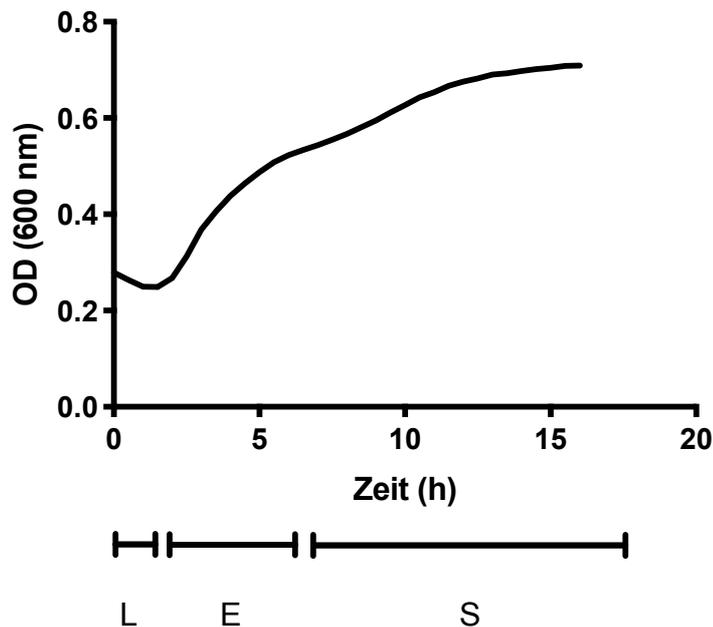
**Tabelle 12: Minimale Hemmkonzentration von Azithromycin.** Die Tabelle zeigt die MHK (Azithromycin) der einzelnen Stämme, die mit dem Epsilon-Test ermittelt wurden.

## 4.2. Wachstumskurven unter Azithromycin

Von den Stämmen DA02, DA07, DA08 und DA09 wurden exemplarische Wachstumskurven mit und ohne Azithromycin erstellt. Die Konzentration des Antibiotikums wurde so gewählt, dass sie mit 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml und 4 µg/ml im subinhibitorischen Bereich lag. Es sollte untersucht werden, ob diese Konzentrationen ausreichen, um eine Wachstumshemmung zu bewirken. Zudem sollte der zeitliche Ablauf der einzelnen Wachstumsphasen dargestellt werden. Jede Wachstumskurve wurde dreimal gemessen und anschließend wurde der arithmetische Mittelwert für jeden Messzeitpunkt ermittelt.

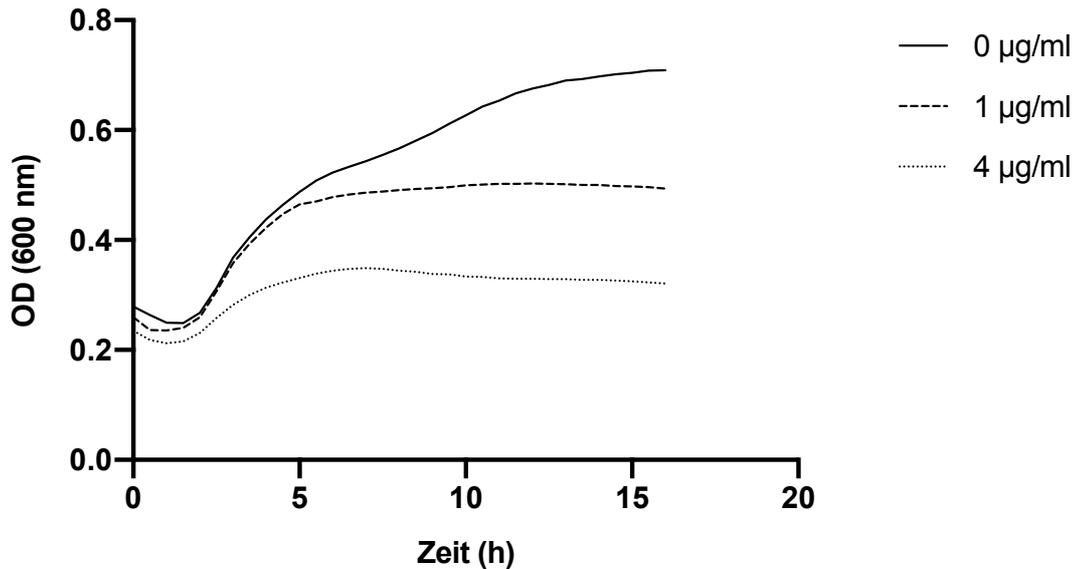
Als Flüssigmedium wurde zunächst DMEM verwendet, um einheitliche Versuchsbedingungen mit dem Zellkulturassay zu schaffen. Jedoch war der Farbumschlag des Indikators bei den Ansätzen unterschiedlich stark, sodass keine verwertbaren Absorptionswerte gemessen werden konnten. Daher wurde auf das Flüssigmedium LB umgestellt.

Im Folgenden ist beispielhaft die Wachstumskurve von DA02 dargestellt. Der Versuchsansatz mit 0 µg/ml Azithromycin stellt die normale Wachstumskurve dar. Es lassen sich die Phasen des Bakterienwachstums erkennen. Bei DA02 liegt die Latenzphase bei ca. 0-2 h, die exponentielle Phase bei ca. 2-7 h und die stationäre Phase beginnt ab ca. 7 h (Abbildung 2). Die Wachstumskurven der Stämme DA07, DA08 und DA09 ohne Azithromycin zeigen ähnliche zeitliche Abläufe der Wachstumsphasen. Bei diesen Stämmen ist die Latenzphase bei ca. 0-2 h (DA07), 0-1 h (DA08) bzw. 0-1 h (DA09), die exponentielle Phase bei 2-4 h (DA07), 1-3 h (DA08) bzw. 1-3 h (DA09) und anschließend beginnt die stationäre Phase. Die Wachstumskurven der Stämme DA07, DA08 und DA09 finden sich im Anhang (Anhang Abbildungen 15, 16, 17).



**Abbildung 2: Wachstumskurve von DA02.** Dargestellt ist die Wachstumskurve als Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte (OD (600 nm)) von DA02 über 16 h. Es lassen sich die folgenden Wachstumsphasen erkennen: Latenzphase (L) von 0-2 h, Exponentielle Wachstumsphase (E) von ca. 2-7 h, Stationäre Wachstumsphase (S) ab ca. 7 h. n=3.

Anschließend wurden die Wachstumskurven unter dem Einfluss von Azithromycin gemessen. Zur besseren Übersichtlichkeit werden im Folgenden nur die Wachstumskurven des Stammes DA02 mit den Azithromycinkonzentrationen 0 µg/ml, 1 µg/ml und 4 µg/ml graphisch dargestellt. Die Kurven mit 0 µg/ml und 1 µg/ml liegen in den ersten fünf Stunden dicht beieinander und zeigen ein sehr ähnliches, exponentielles Wachstum. Erst zu Beginn der stationären Phase zeigt die Wachstumskurve mit 1 µg/ml Azithromycin im Vergleich zur Nativkurve reduzierte Absorptionswerte. Die Wachstumskurve mit 4 µg/ml Azithromycin liegt jedoch ab Beginn der exponentiellen Wachstumsphase deutlich unter den anderen Kurven (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Wachstumskurven von DA02 unter Azithromycin.** Dargestellt sind die Wachstumskurven als Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte (OD (600 nm)) von DA02 mit 0 µg/ml (durchgezogene Kurve), 1 µg/ml (gestrichelte Kurve) und 4 µg/ml (gepunktete Kurve) Azithromycin über 16 h. Die Wachstumskurven mit 0 µg/ml und 1 µg/ml sind in den ersten 5 h dicht beieinander, anschließend zeigt die Wachstumskurve mit 0 µg/ml ein stärkeres Wachstum. Die Wachstumskurve mit 4 µg/ml Azithromycin zeigt durchgehend niedrigere Absorptionswerte. Jeweils n=3.

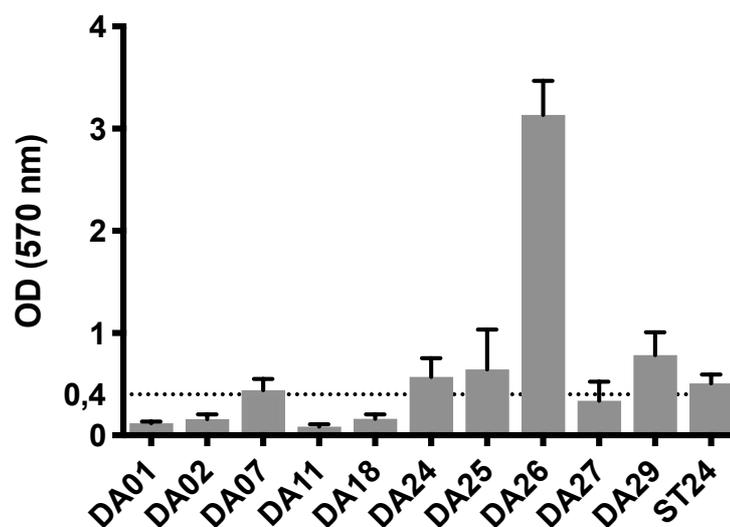
Die Wachstumskurven der Stämme DA07, DA08 und DA09 sind zur besseren Übersichtlichkeit dem Anhang beigelegt (Anhang Abbildungen 15, 16, 17). Bei DA07 stellen sich die Wachstumskurven mit 0 µg/ml und 1 µg/ml Azithromycin in der Latenz- und exponentiellen Phase ähnlich dar und erst ab der stationären Phase flacht die Wachstumskurve mit 1 µg/ml Azithromycin im Vergleich zur Wachstumskurve ohne Azithromycin deutlich ab. Die Wachstumskurve mit 4 µg/ml Azithromycin zeigt in allen Wachstumsphasen eine Abflachung im Vergleich zu den anderen beiden Kurven und hat zudem eine leichte zeitliche Verzögerung der exponentiellen und stationären Phase um jeweils ca. 1 h (Anhang Abbildung 15). Bei DA08 zeigen sich bei der Wachstumskurve mit 1 µg/ml Azithromycin reduzierte Adsorptionswerte ab der exponentiellen Phase, sowie eine zeitliche Verzögerung der exponentiellen und stationären Phase von jeweils ca. 1 h im Vergleich zur Wachstumskurve ohne Azithromycin. Im Vergleich zur Wachstumskurve mit 1 µg/ml Azithromycin stellt sich die Wachstumskurve mit 4 µg/ml Azithromycin ab Beginn ihrer exponentiellen Phase abgeflacht dar und die Wachstumsphasen sind jeweils wiederum um ca. 1 h verzögert (Anhang Abbildung 16). Der Stamm DA09 stellt sich ähnlich dar wie DA08. Auch hier zeigt sich eine Abflachung der Wachstumskurven mit Azithromycin ab Beginn der exponentiellen Phase, wobei diese bei 4 µg/ml Azithromycin stärker ausgeprägt ist als bei 1 µg/ml Azithromycin. Zudem zeigt sich auch hier eine

zeitliche Verzögerung der Wachstumsphasen um jeweils 1 h (1 µg/ml) bzw. 2 h (4 µg/ml) (Anhang Abbildung 17).

### 4.3. Biofilmassay unter subinhibitorischen Azithromycinkonzentrationen

In diesem Assay wurde quantitativ der Einfluss von Azithromycin auf die Biofilmbildung untersucht. Die Konzentrationen des Antibiotikums befanden sich mit 0-4 µg/ml im subinhibitorischen Bereich (4.1). Dadurch wurde verhindert, dass der beobachtete Effekt im Biofilmassay lediglich auf eine Wachstumshemmung zurückzuführen ist.

Zunächst wurden die Stämme DA01, DA02, DA07, DA11, DA18, DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24 in einem einfachen Assay ohne Azithromycin auf ihre Fähigkeit, einen Biofilm auszubilden, hin untersucht. Jeder Stamm wurde dreimal im Vierfachansatz untersucht, sodass sich jeweils 12 Einzelmesswerte ergaben. Eine Absorption bei 570 nm von <0,1 war als Biofilm-negativ definiert, 0,1-0,4 als schwach Biofilm bildend und >0,4 als stark Biofilm bildend. Der Stamm DA11 war mit einer  $OD_{570} = 0,09$  Biofilm-negativ. Die Stämme DA01 ( $OD_{570} = 0,12$ ), DA02 ( $OD_{570} = 0,15$ ) und DA18 ( $OD_{570} = 0,16$ ) waren schwach Biofilm bildend. Die Stämme DA07 ( $OD_{570} = 0,44$ ), DA24 ( $OD_{570} = 0,57$ ), DA25 ( $OD_{570} = 0,64$ ), DA26 ( $OD_{570} = 3,14$ ), DA29 ( $OD_{570} = 0,79$ ) und ST24 ( $OD_{570} = 0,51$ ) waren starke Biofilmbildner (Abbildung 4). Sie wurden in den folgenden Biofilmassays unter dem Einfluss von Azithromycin weiter untersucht.



**Abbildung 4: Biofilmbildung der STEC-Stämme im Biofilmassay.** Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen optischen Dichte (OD (570 nm)) mit jeweils 12 Einzelmesswerten. Die gestrichelte Linie liegt bei  $OD(570\text{ nm})=0,4$ . Die Stämme DA07, DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24 sind mit einer  $OD(570\text{ nm}) >0,4$  starke Biofilmbildner.

Die stark Biofilm bildende Stämme DA07, DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24 wurden anschließend im Biofilmassay für 4 h bei 0-4 µg/ml Azithromycin inkubiert. Jeder Stamm wurde wieder dreimal im Vierfachansatz untersucht, sodass sich jeweils 12 Einzelmesswerte ergaben. Alle untersuchten Stämme zeigten bei diesen Bedingungen eine signifikante Reduktion der Biofilmbildung. Da es sich um nicht parametrische, unverbundene Werte handelte, wurde zur statistischen Auswertung der *Kruskal-Wallis-Test* angewandt. Bei dem Stamm DA25 konnte bereits ab einer Azithromycinkonzentration von 1 µg/ml eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Bei den Stämmen DA07, DA26, DA29 und ST24 zeigte sich ein signifikanter Effekt ab 2 µg/ml. Die Biofilmbildung von DA24 wurde ab 3 µg/ml Azithromycin signifikant reduziert (Abbildung 5). Zur besseren Übersichtlichkeit findet sich eine Zusammenfassung der Charakteristika der einzelnen Stämme im Anhang (Anhang Tabelle 19).

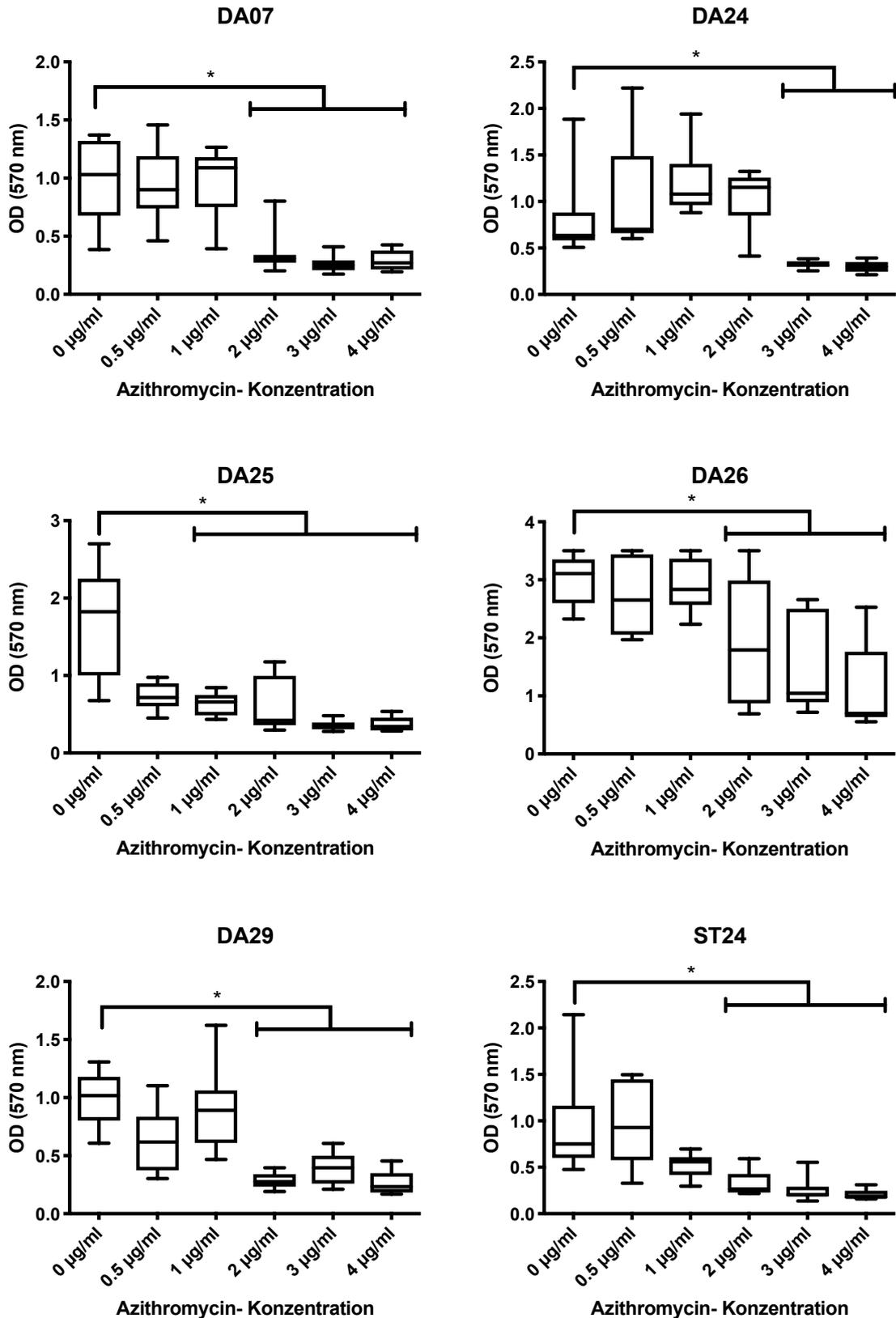
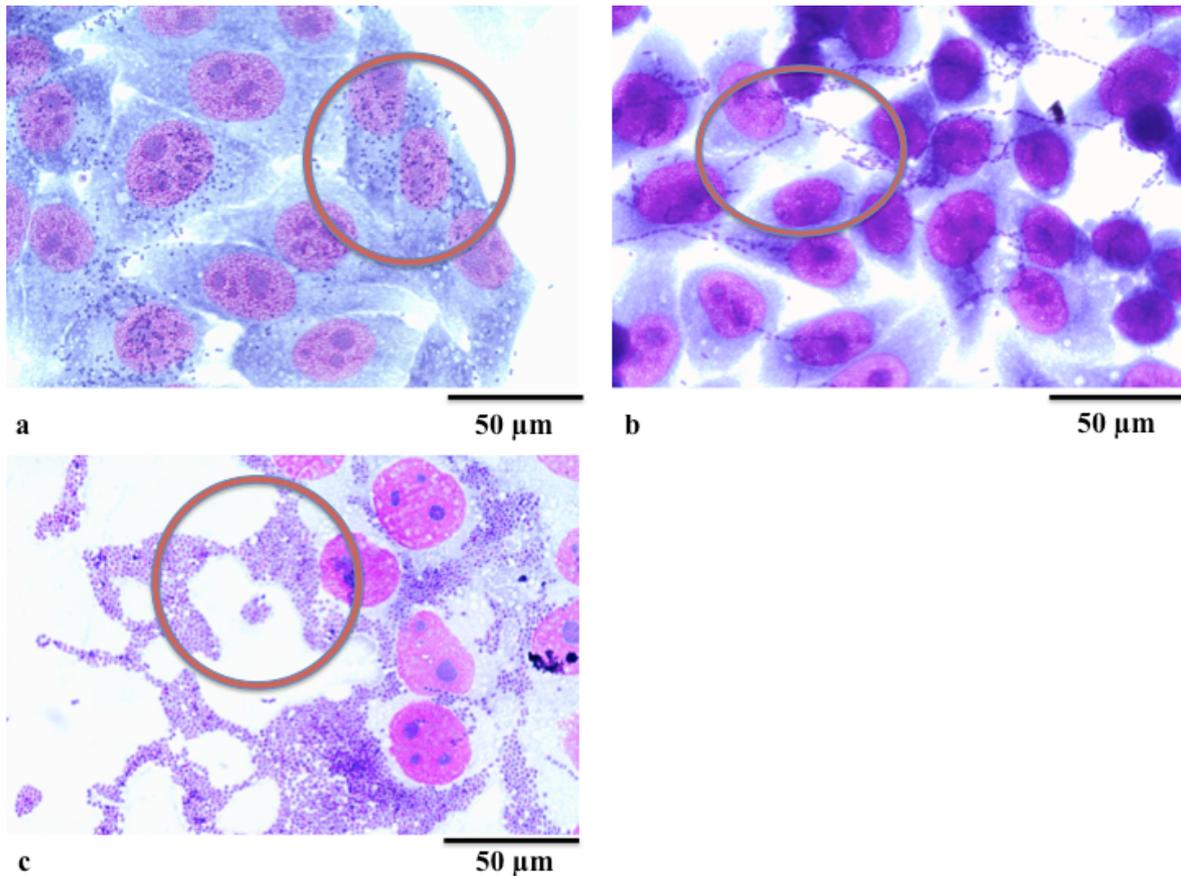


Abbildung 5: Biofilmassay unter Azithromycin bei den Stämmen DA07, DA24, DA25, DA26, DA29, ST24. Es wurde die optische Dichte (OD (570 nm)) in Abhängigkeit von der Azithromycinkonzentration (0-4 µg/ml) gemessen. Dargestellt ist jeweils ein Boxplot, welcher den Median und das 25.- und 75. Quartil anzeigt. Die Whisker zeigen das Konfidenzintervall (CI) von 95 % an. Es wurden jeweils 12 Einzelmesswerte einbezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis*-Test. Eine signifikante Reduktion zeigte sich bei DA25 ab 1 µg/ml, bei DA07, DA26, DA29 und ST24 ab 2 µg/ml und bei DA24 ab 3 µg/ml Azithromycin. \* $p < 0,05$ .

#### 4.4. Phänotypische Charakterisierung anhand des Adhärenzmusters

Die phänotypische Charakterisierung der STEC-Stämme erfolgte im Zellkulturassay anhand ihrer Adhärenz an HEP2-Zellen. Dabei wurden vier verschiedene Muster unterschieden: kettenförmige Adhärenz (CLAP), diffuse Adhärenz, aggregative Adhärenz und fehlende Adhärenz<sup>76</sup>. Die Stämme DA02, DA11, DA18, DA25, DA29 und ST24 konnten dem diffusen Adhärenztyp zugeordnet werden. Hierbei adhären die Bakterien ungeordnet an den Epithelzellen (Abbildung 6a). Dem kettenförmigen Adhärenztyp (CLAP) konnten die Stämme DA01, DA07, DA24 und DA26 zugeordnet werden. Die Stämme DA08 und DA09 waren in der Arbeitsgruppe bereits als CLAP-ausbildend bekannt<sup>106</sup>. Je 10-15 Bakterien liegen in Ketten einzeln hintereinander, wobei die Länge zwischen den Stämmen leicht variiert (Abbildung 6b). Bis auf DA01 (O26:H11) hatten diese Stämme alle den Serotyp O91:H14. Der Stamm DA01 zeigte eine besonders breite, aggregative Kettenbildung, sodass die Zuordnung zum kettenförmigen Adhärenztyp nicht eindeutig war. Die Stämme DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24 zeigten zudem ein sehr starkes autoaggregatives Verhalten, wodurch die Diskriminierung von einzelnen Bakterien im Zellkulturassay stark erschwert wurde. Diese Stämme adhärten zudem in unterschiedlich starker Ausprägung als Biofilm an der Glasoberfläche (Abbildung 6c). Keiner der untersuchten Stämme wies eine fehlende Adhärenz auf. Bei der aggregativen Adhärenz liegen die Bakterien in Ziegelstein-ähnlichen Verbänden aneinander. Dieser Phänotyp wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Zur besseren Übersichtlichkeit findet sich eine Zusammenfassung der Charakteristika der einzelnen Stämme im Anhang (Anhang Tabelle 19).



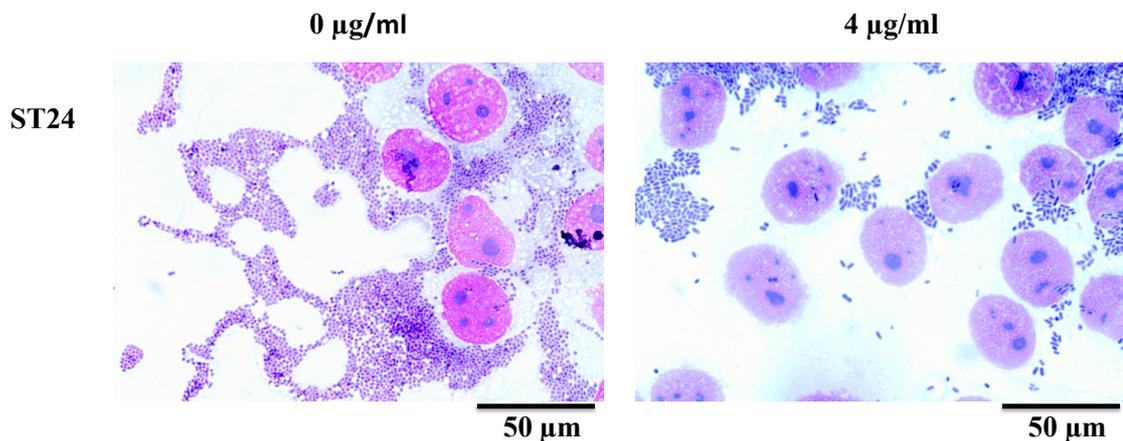
**Abbildung 6: Adhärenzmuster von STEC im Zellkulturassay.** **a:** Diffuser Adhärenztyp am Beispiel von DA11. Charakteristisch ist eine nicht geordnete Adhärenz der STEC an die HEp2-Zellen. **b:** CLAP-Adhärenztyp am Beispiel von DA07. Die Bakterien adhären kettenförmig aneinander. **c:** Autoaggregatives Verhalten und Biofilmbildung am Beispiel von ST24. Die Bakterien haften massenhaft aneinander und an der Glasoberfläche. Die Balken zeigen 50 µm an. Giemsa-Färbung, 100x Vergrößerung.

#### 4.5. Qualitative Beurteilung des Zellkulturassays unter Azithromycin

Im Zellkulturassay wurde die Auswirkung von Azithromycin auf die Adhäsion von Shigatoxin produzierenden *E. coli* an humane Epithelzellen untersucht. Die Konzentration des Antibiotikums wurde mit 0-4 µg/ml so gewählt, dass sie sich im subinhibitorischen Bereich befand (4.1.). Hierdurch sollte vermieden werden, dass der beobachtete Effekt im Zellkulturassay lediglich auf eine Wachstums hemmung zurückzuführen ist.

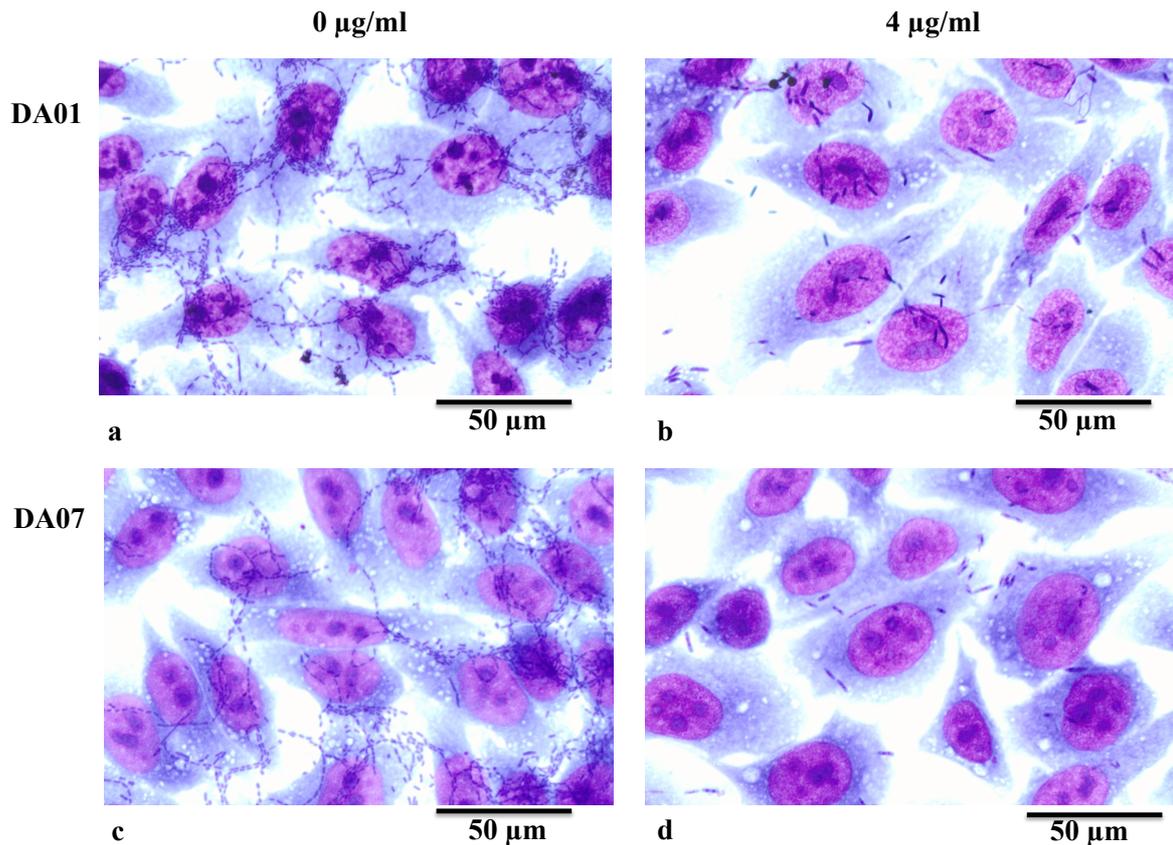
Es konnte beobachtet werden, dass die Anzahl an Bakterien, die an Epithelzellen adhären, mit steigender Azithromycinkonzentration bei allen untersuchten Stämmen sank. In der Abbildung 7 ist hierfür beispielhaft der Stamm ST24 dargestellt. In der Aufnahme, die dem Zellkulturassay mit 4 µg/ml Azithromycin entstammt, lässt sich eine verminderte Anzahl an Bakterien im Vergleich zu der Aufnahme mit 0 µg/ml erkennen

(Abbildung 7). Jedoch war es aufgrund des teilweise sehr stark auto-aggregativen Verhaltens nicht bei jedem Stamm möglich, diese Reduktion zu quantifizieren (4.6). Diese auto-aggregativen Stämme waren die Folgenden: DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24. In der Abbildung 7 ist beispielhaft der Stamm ST24 abgebildet, der nicht ausgezählt werden konnte.



**Abbildung 7:** Zellkulturassay von ST24 mit 0 µg/ml und 4 µg/ml Azithromycin. Die Anzahl an Bakterien, die an HEp2-Zellen adhären, ist bei 4 µg/ml Azithromycin im Vergleich zu 0 µg/ml Azithromycin reduziert. Giemsa-Färbung, 100x Vergrößerung. Die Balken zeigen 50 µm an.

Es wurde zudem beobachtet, dass die Stämme, die ein CLAP ausbilden, bei steigender Konzentration von Azithromycin dieses kettenförmiges Adhärenzmuster verlieren. Die Bakterien adhären vereinzelt und diffus an den Epithelzellen. Exemplarisch sind die Stämme DA01 und DA07 dargestellt (Abbildung 8). Dieser Effekt wurde bereits ab 0,5 µg/ml Azithromycin beobachtet. Des Weiteren ließ sich erkennen, dass die Bakterien nach Inkubation mit Azithromycin elongiert erscheinen. Dies wurde jedoch nicht weiter quantifiziert.

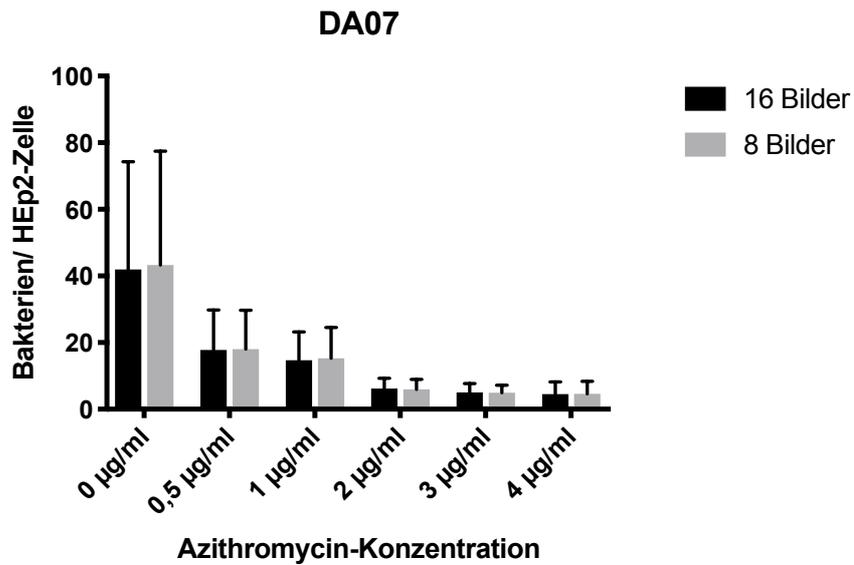
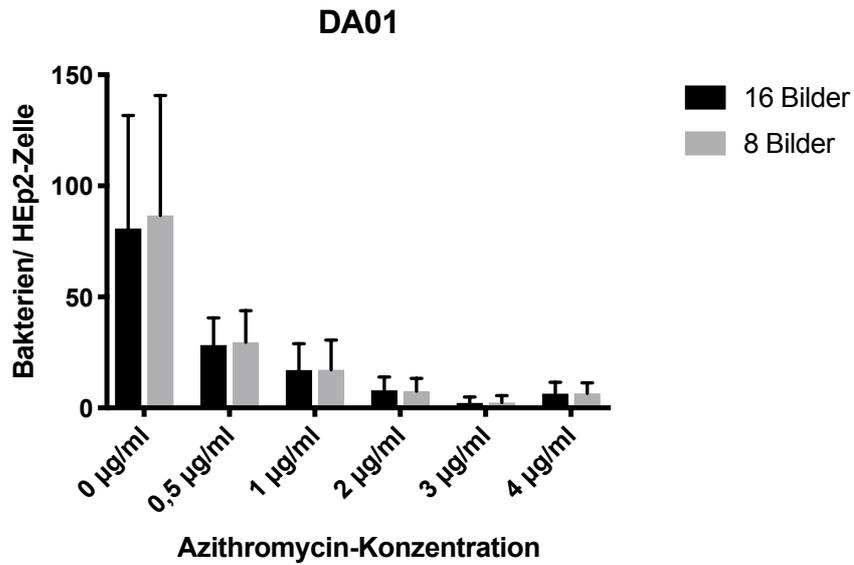


**Abbildung 8: Auflösung des CLAP-Adhärenzmusters unter Azithromycin im Zellkulturassay.** a: DA01 0  $\mu\text{g/ml}$  Azithromycin, b: DA01 4  $\mu\text{g/ml}$  Azithromycin, c: DA07 0  $\mu\text{g/ml}$  Azithromycin, d: DA07 4  $\mu\text{g/ml}$  Azithromycin. Bei 0  $\mu\text{g/ml}$  Azithromycin weisen die Stämme DA01 (a) und DA07 (c) eine kettenförmige Adhärenz (CLAP) auf. Bei einer Azithromycinkonzentration von 4  $\mu\text{g/ml}$  bilden DA01 (b) und DA07 (d) kein CLAP mehr aus. Die Bakterien adhären einzeln und diffus verteilt. Die Balken zeigen 50  $\mu\text{m}$  an. Giemsa-Färbung, 100x Vergrößerung.

#### 4.6. Quantitative Beurteilung des Zellkulturassays unter Azithromycin

Im Folgenden wurde bei den Stämmen DA01, DA02, DA07, DA11 und DA18 im Zellkulturassay untersucht, wie die Adhäsion der Bakterien unter verschiedenen subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin beeinflusst wird. Diese Stämme wurden für den Versuch ausgesucht, da sie nicht stark autoaggregativ adhärten und eine quantitative Auszählung somit möglich war. Insgesamt wurde somit jeder Stamm aus dieser Arbeit entweder im Biofilmassay oder im Zellkulturassay mindestens einmal quantitativ auf den Einfluss von Azithromycin untersucht. Lediglich die Stämme DA08 und DA09 wurden nicht mitgeführt, da sie bereits in der Arbeitsgruppe auf ihr Verhalten unter Azithromycin untersucht wurden<sup>106</sup> und sie in dieser Arbeit nur als Positivkontrolle für die EibG-Detektion im Western Blot dienten (4.7).

Bei jedem Zellkulturassay entstanden pro Ansatz 16 mikroskopische Aufnahmen bei einer 100-fachen Vergrößerung. Anhand der Stämme DA01 und DA07 wurde zunächst verglichen, ob die quantitative Auswertung von 8 Bildern zu einem statistisch vergleichbaren Ergebnis führt wie die Auswertung von allen 16 Bildern. Bei den Aufnahmen wurden die HEp2-Zellen und die Bakterien gezählt und das Verhältnis zueinander gebildet. Wenn nur 8 Bilder quantitativ ausgewertet wurden, wurde jede zweite Aufnahme im Schachbrettmuster ausgewählt. Auf diese Weise wurden jeweils drei Zellkulturassays ausgewertet, sodass jeweils 48 bzw. 24 Einzelmesswerte entstanden. Im t-Test zeigte sich weder bei DA01, noch bei DA07 ein signifikanter Unterschied zwischen den korrespondierenden Werten (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Quantitative Auswertung des Zellkulturassays mit 16 Bildern gegenüber 8 Bildern anhand von DA01 und DA07.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnisse von DA01 und DA07 bei 48 Einzelmesswerten (3x16 Bilder) bzw. 24 Einzelmesswerten (3x8 Bilder) unter 0-4 µg/ml Azithromycin. Die Bilder wurden bei 100x Vergrößerung aufgenommen. Zur statistischen Auswertung wurden multiple t-Tests angewandt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den korrespondierenden Werten.

In den folgenden Zellkulturassays wurden daher nur 8 der 16 mikroskopisch aufgenommenen Bilder quantitativ ausgewertet.

Bei den Stämmen DA01, DA02, DA07, DA11 und DA18 zeigte sich eine deutliche Abnahme des Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnisses bei Inkubation mit subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin. Die errechneten Werte wiesen bei den Stämmen

DA01, DA02 und DA18 bereits bei 0,5 µg/ml und bei DA07 und DA11 ab 1 µg/ml eine signifikante Reduktion auf. Zur statistischen Auswertung wurde der *Kruskal-Wallis*-Test angewandt, da es sich um nicht parametrische, unverbundene Werte handelt (Abbildung 10).

Eine Zusammenfassung dieser Charakteristika der einzelnen Stämme findet sich im Anhang (Anhang Tabelle 19).

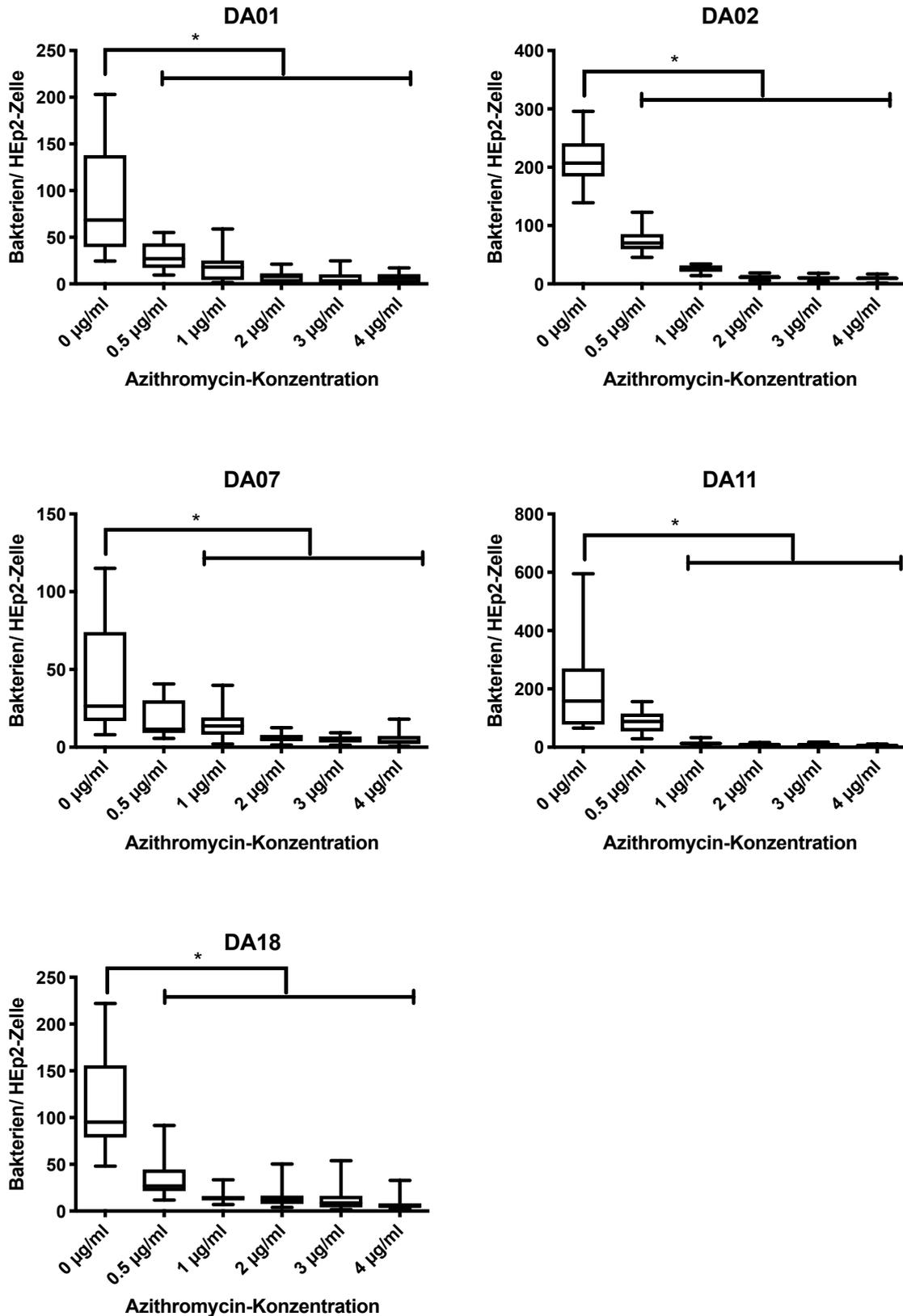


Abbildung 10: Zellkulturassay unter Azithromycin bei DA01, DA02, DA07, DA11 und DA18. Es ist jeweils das Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnis unter 0-4 µg/ml Azithromycin dargestellt. Der Boxplot zeigt jeweils den Median sowie das 25.- und 75. Quartil an. Die Whisker stellen das Konfidenzintervall (CI) von 95 % dar. Es wurden jeweils 24 Einzelmesswerte einbezogen. Zur statistischen Auswertung wurde der *Kruskal-Wallis*-Test angewandt. Eine signifikante Reduktion zeigte sich bei DA01, DA02 und DA18 ab 0,5 µg/ml und bei DA07 und DA11 ab 1 µg/ml Azithromycin. \* $p < 0,05$ .

## 4.7. Detektion von EibG

Lu *et al.* beschrieben erstmals eine Assoziation zwischen der Expression von EibG und der Ausbildung der kettenförmigen Adhäsion (CLAP) an Epithelzellen. Es handelte sich dabei um Shigatoxin produzierende *E. coli* mit dem Serotyp O91<sup>58</sup>.

In den vorausgegangenen Zellkulturassays wurde gezeigt, dass die Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin vermindert ist und dass das CLAP-Adhärenzmuster aufgelöst wird (4.5, 4.6). Es sollte daraufhin untersucht werden, ob sich auch das Expressionsmuster von EibG bei Inkubation der Kulturen mit Azithromycin verändert. Daher wurden in dieser Versuchsreihe intrazelluläre Proteine von O91-positiven Stämmen mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und EibG im Western Blot detektiert.

Zu Beginn wurde evaluiert, welche Methode der Proteinextraktion sich am besten für diese Versuchsreihe eignet. Dazu wurden Bakterien des Stamms DA07 einmal mechanisch und einmal durch Sonifizierung lysiert (3.6.1). Die detektierten EibG-Banden wurden densitometrisch gemessen. Proben, die durch die Methode „Lysierung durch Sonifizierung“ aufbereitet wurden, ergaben bei der 5,5 h-Bande eine 4,49 mal und bei der 24 h-Bande eine 14,6 mal höhere Signalstärke als solche, die durch die Methode „Mechanische Lysierung“ entstanden (Tabelle 13).

Mechanisch 5,5 h	Mechanisch 24 h	Sonifizierung 5,5 h	Sonifizierung 24 h
100 %	191,4 %	449,3 %	2797,8 %

**Tabelle 13: Densitometrische Messung von EibG-Banden zum Vergleich von zwei Proteinextraktionsmethoden.** Dargestellt ist relative Signalstärke der EibG-Banden im Western Blot nach der Proteinextraktion durch „Mechanischen Lysierung“ bzw. „Lysierung durch Sonifizierung“ nach jeweils 5,5 h und 24 h.

Für alle folgenden Versuche wurde daher die Methode der Sonifizierung zur Proteinextraktion gewählt.

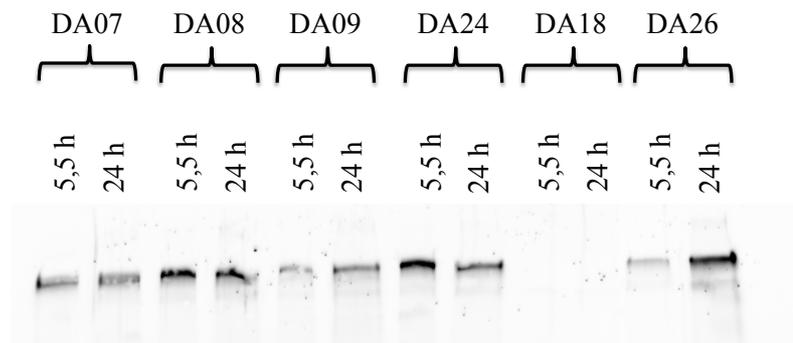
Die Stämme DA07, DA24, und DA26 hatten alle den Serotyp O91 und bildeten ein kettenförmiges Adhärenzmuster aus (4.4). Sie wurden auf die Expression von EibG untersucht. Die Stämme DA08 und DA09, ebenfalls Serotyp O91:H14, wurden als Positivkontrolle mitgeführt, da sie in der Arbeitsgruppe bereits als EibG-positiv bekannt waren<sup>106</sup>. DA18 mit dem Serotyp O174 und einem diffusen Adhärenztyp wurde als Negativkontrolle mitgeführt (Tabelle 14).

<b>Stamm</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Phänotyp</b>
DA01	O26:H11	Kettenförmige Adhärenz
DA02	O16:H21	Diffuse Adhärenz
<b>DA07</b>	<b>O91:H14</b>	<b>Kettenförmige Adhärenz</b>
<b>DA08</b>	<b>O91:H14</b>	<b>Kettenförmige Adhärenz</b>
<b>DA09</b>	<b>O91:H14</b>	<b>Kettenförmige Adhärenz</b>
DA11	O181:H49	Diffuse Adhärenz
DA18	O174:H21	Diffuse Adhärenz
<b>DA24</b>	<b>O91:H14</b>	<b>Kettenförmige Adhärenz</b>
DA25	O103:H2/H25/H11	Diffuse Adhärenz
<b>DA26</b>	<b>O91:H14</b>	<b>Kettenförmige Adhärenz</b>
DA29	O146:H28	Diffuse Adhärenz
ST24	O156:H25	Diffuse Adhärenz

**Tabelle 14: Serotypen und Phänotypen der untersuchten STEC-Stämme.** Fett markiert sind die Stämme, welche die Auswahlkriterien Serotyp O91 und kettenförmige Adhärenz für den Einschluss in die weiteren Experimente erfüllten.

Die Bakterien wurden gemäß dem Versuchsprotokoll ohne Azithromycin in Flüssigmedium inkubiert. Nach 5,5 h und 24 h wurden Proben der Kultur entnommen, sodass sie einmal der exponentiellen und einmal der stationären bakteriellen Wachstumsphase entsprangen. Die intrazellulären Proteine wurden nach der Methode „Lysierung durch Sonifizierung“ extrahiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt (3.6). Der Western Blot vom Stamm DA26 wurde nicht zeitgleich mit den anderen densitometrisch ausgewertet, da er eine sehr starke Signalentwicklung in der 24 h-Bande zeigte und somit eine kürzere Aufnahmezeit benötigte. Er wurde daher von einem separaten Gel entwickelt. Bei den Stämmen DA07, DA08, DA09, DA24 und DA26 konnten Banden von Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa detektiert werden (Abbildung 11). Dabei handelte es sich um das EibG-Tetramer, da es ein theoretisch ermitteltes Molekulargewicht von 216 kDa besitzt<sup>58</sup>. Die native trimere Form des EibG verlor während des Erhitzens der Proben seine Quartärstruktur, sodass sich die Monomere anschließend auch in Tetrameren zusammenlegen konnten. Es konnten Unterschiede in der Intensität der 5,5 h- und der 24 h-Banden beobachtet werden. Die densitometrisch ermittelten Werte wurden zwecks Vergleichbarkeit prozentual dargestellt, wobei die Signalstärke der 5,5 h-Bande eines jeden Stammes als 100 % diente. Bei DA07 war die Expression von EibG zu beiden

Zeitpunkten vergleichbar (Zunahme der Signalstärke der 24 h-Bande um 8,65 % gegenüber der 5,5 h-Bande). Bei DA24 war die Expression von EibG nach 5,5 h höher als nach 24 h (um 25,95 % reduzierte Signalstärke bei der 24 h-Bande), bei DA26 war es umgekehrt (um 426,35 % erhöhte Signalstärke bei der 24 h-Bande). DA08 und DA09 stellten sich den Erwartungen entsprechend als EibG-positiv und DA18 als EibG-negativ dar (Abbildung 11, Tabelle 15). Eine Zusammenfassung dieser Charakteristika der einzelnen Stämme findet sich auch im Anhang (Anhang Tabelle 19).



**Abbildung 11: Detektion von EibG im Western Blot nach 5,5 h und 24 h.** Die Stämme DA07, DA08, DA09, DA24 und DA26 stellten sich im Western Blot sowohl nach 5,5 h, als auch nach 24 h als EibG-positiv dar. Die detektierten Proteine hatten ein Molekulargewicht von ungefähr 200 kDa und entsprechen somit dem Tetramer von EibG (errechnetes Molekulargewicht: 216 kDa). Bei DA18 wurde kein EibG detektiert. Der Western Blot mit dem Stamm DA26 wurde separat von den anderen entwickelt, da er eine stärkere und raschere Signalentwicklung aufwies.

DA07 5,5 h	DA07 24 h	DA24 5,5 h	DA24 24 h	DA26 5,5 h	DA26 24 h
100 %	108,654 %	100 %	74,049 %	100 %	526,346 %

**Tabelle 15: Densitometrisch ermittelte Signalstärke der EibG-Banden im Western Blot von DA07, DA24 und DA26 nach 5,5 h und 24 h.** Zur Vergleichbarkeit wurden die densitometrisch gemessenen Signalstärken der EibG-Banden prozentual angegeben, wobei der Messwert der 5,5 h-Banden jeden Stammes als 100 % gewertet wurde.

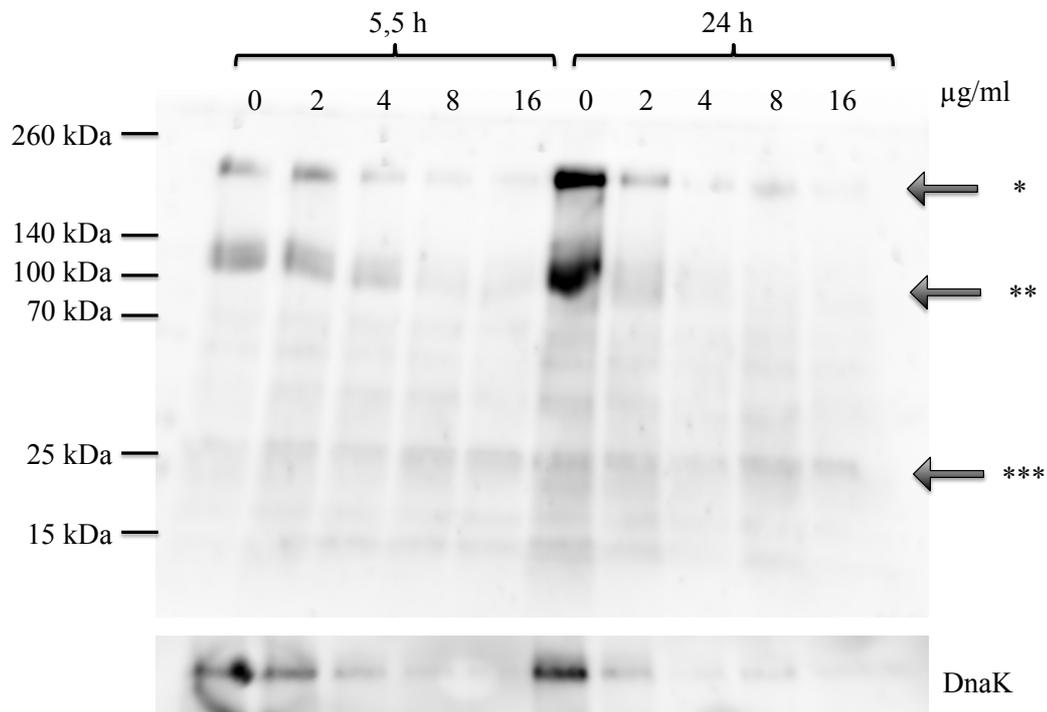
Aufgrund dieser drei unterschiedlichen Expressionsmuster wurden die Stämme DA07, DA24 und DA26 dem folgenden Versuch zugeführt. Es wurde untersucht, wie sich die EibG-Expression im Western Blot darstellt, wenn die Inkubation der Bakterien unter Zugabe von Azithromycin erfolgte. Die Konzentrationen des Antibiotikums wurde so gewählt, dass sie mit 0 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml und 16 µg/ml im subinhibitorischen Bereich lagen. Die Proben wurden abermals nach 5,5 h und nach 24 h Inkubation entnommen. Neben EibG wurde zudem zeitgleich das Protein DnaK detektiert. Hierbei handelt es sich um ein in *E. coli* konstant exprimiertes Protein aus der Familie der *Heat Shock Proteins*<sup>61</sup>. Es sollte als Referenz dienen und eine korrekte Probenapplikation anzeigen. Von jedem Stamm wurden drei Western Blots erstellt, aber aus Gründen der

Überschaubarkeit wurde in dieser Arbeit jeweils nur ein Western Blot exemplarisch abgebildet.

Der Stamm DA26 zeigte Banden im Bereich von ca. 220 kDa, die dem EibG-Tetramer entsprechen, und zudem weniger intensive Banden bei ca. 120 kDa und 25 kDa. Aufgrund des Molekulargewichts lassen sich erstere dem EibG-Dimer zuordnen, welches ein theoretisch ermitteltes Molekulargewicht von 108 kDa besitzt. Die anderen Banden lassen sich als Abbruchfragmente von EibG interpretieren. Ein vergleichbares Bandenmuster wurde in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen, der Übersichtlichkeit wegen aber nur hier einmal beispielhaft abgebildet (Abbildung 12). Von den Western Blots von DA24 und DA07 werden nur die Ausschnitte mit den EibG-Tetramer-Banden gezeigt.

Zudem ließ sich bei DA26 beobachten, dass die 0 µg/ml-Bande nach 24 h intensiver ist als die korrespondierende 5,5 h-Bande (Zunahme der densitometrischen Signalstärke um 302,3 %). Die EibG-Expression nahm somit über die Zeit zu. Innerhalb eines Zeitpunktes nahm die Expression bei steigender Azithromycinkonzentration ab. Bei den 5,5 h-Proben sank die Signalstärke von 100 % (0 µg/ml) auf 33,55 % (4 µg/ml), 18,56 % (8 µg/ml) und 20,25 % (16 µg/ml). Lediglich bei der 2 µg/ml-Bande gab es einen Anstieg der Signalstärke um 21,46 % gegenüber der 0 µg/ml-Bande. Die 24 h-Proben zeigten ein ähnliches Muster mit 100 % bei 0 µg/ml, 17,34 % bei 2 µg/ml, 4,76 % bei 4 µg/ml, 11,45 % bei 8 µg/ml und 3,44 % bei 16 µg/ml (Tabelle 16).

Im selben Versuchsansatz konnte zudem DnaK bei einem Molekulargewicht von 70 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 12). Bei 0 µg/ml Azithromycin ist der densitometrisch gemessene Wert der 24 h-Bande nur gering gegenüber der 5,5 h-Bande verändert (Abnahme von 100 % bei 5,5 h auf 89,8 % bei 24 h). Somit entspricht diese Beobachtung der erwarteten kontinuierlichen Expression von DnaK. Jedoch wurde auch hier, entgegen der Erwartungen, eine Verminderung der Bandenintensität bei steigender Azithromycin-Konzentration beobachtet. Zum Zeitpunkt 5,5 h sank die Signalstärke von 100 % (0 µg/ml) auf 55,76 % (2 µg/ml), 19,3 % (4 µg/ml), 9,35 % (8 µg/ml) und 6,99 % (16 µg/ml). Bei den 24 h-Banden sank die Signalstärke von 100 % (0 µg/ml) auf 23,58 % (2 µg/ml), 5,86 % (4 µg/ml), 13,27 % (8 µg/ml) und 2,57 % (16 µg/ml) (Tabelle 16).



**Abbildung 12: Detektion von EibG und DnaK bei DA26.** Dargestellt sind zwei Western Blots mit EibG- bzw. DnaK-Banden nach einer Inkubation von DA26 für 5,5 h bzw. 24 h mit 0-16 µg/ml Azithromycin. Bei EibG zeigen sich folgende Banden: \*EibG-Tetramer (216 kDa), \*\*EibG-Dimer (108 kDa), \*\*\*EibG-Abbruchfragment (ca. 25 kDa). Die DnaK-Bande befindet sich bei ca. 70 kDa.

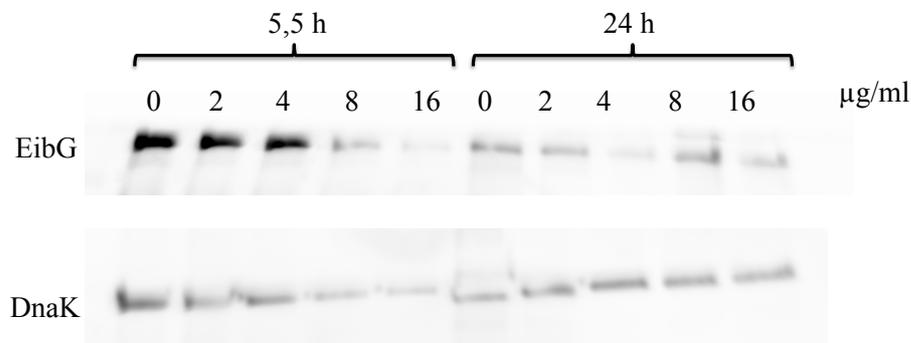
		0 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml
<b>EibG</b>	5,5 h	100 %	121,46 %	33,55 %	18,56 %	20,25 %
	24 h	100 %	17,34 %	4,76 %	11,45 %	3,44 %
<b>DnaK</b>	5,5 h	100 %	55,76 %	19,3 %	9,35 %	6,99 %
	24 h	100 %	23,58 %	5,86 %	13,27 %	2,57 %

**Tabelle 16: Signalstärken der EibG- und DnaK-Banden im Western Blot von DA26.** Es sind die Signalstärken der EibG-Tetramer- bzw. DnaK-Banden nach 5,5 h bzw. 24 h Inkubation von DA26 mit 0-16 µg/ml Azithromycin dargestellt. Die Werte sind prozentual zu den Messwerten der jeweiligen 0 µg/ml-Banden angegeben.

Derselbe Versuch wurde mit dem Stamm DA24 durchgeführt. Auch hier ließen sich sowohl EibG als auch DnaK detektieren (Abbildung 13). Bei den dargestellten EibG-Banden handelte es sich um das Tetramer mit 216 kDa. Die Intensität der EibG-Banden bei 0 µg/ml war bei der 24 h-Probe geringer als bei der 5,5 h-Probe (Abnahme der Signalstärke um 63,6 %). Die Expression von EibG nahm somit über die Zeit ab. Zudem ließ sich auch hier eine verminderte Expression von EibG unter steigenden

Konzentrationen des Antibiotikums beobachten. Bei den 5,5 h-Banden sank die Signalstärke von 100 % (0 µg/ml) über 85,3 % (2 µg/ml), 84,3 % (4 µg/ml) und 24,6 % (8 µg/ml) auf 7,4 % (16 µg/ml). Die Signalstärke der 24 h-Banden wurde ebenfalls mit steigender Azithromycinkonzentration geringer. Nur die Signalintensität der 8 µg/ml-Bande wies einen Anstieg gegenüber der 4 µg/ml-Bande auf (0 µg/ml: 100 %, 2 µg/ml: 62,1 %, 4 µg/ml: 26,6 %, 8 µg/ml: 94,9 %, 16 µg/ml: 52,1 %).

Bei den 5,5 h-Proben von DnaK ließ sich ebenfalls eine verringerte Bandenintensität bei Inkubation mit Azithromycin beobachten (0 µg/ml: 100 %, 2 µg/ml: 60 %, 4 µg/ml: 56,3 %, 8 µg/ml: 25,4 %, 16 µg/ml: 18,5 %). Die gemessene Signalstärke der 24 h-Bande bei 0 µg/ml war mit einer Abnahme um 64,3 % gegenüber der 5,5 h-Bande jedoch sehr viel geringer als erwartet. Zudem war sie geringer als die Signalstärken der 24 h-Banden unter Azithromycin. Da dieser Wert nicht kongruent zu den DnaK-Expressionsmustern der anderen beiden Stämme ist, wurde er als Messfehler interpretiert. Bei den 24 h-Banden mit 2-16 µg/ml Azithromycin ließ sich wieder der Trend der abnehmenden Signalstärke erkennen (2 µg/ml: 145,5 %, 4 µg/ml: 158,7 %, 8 µg/ml: 124,3 %, 16 µg/ml: 120,2 %) (Tabelle 17).



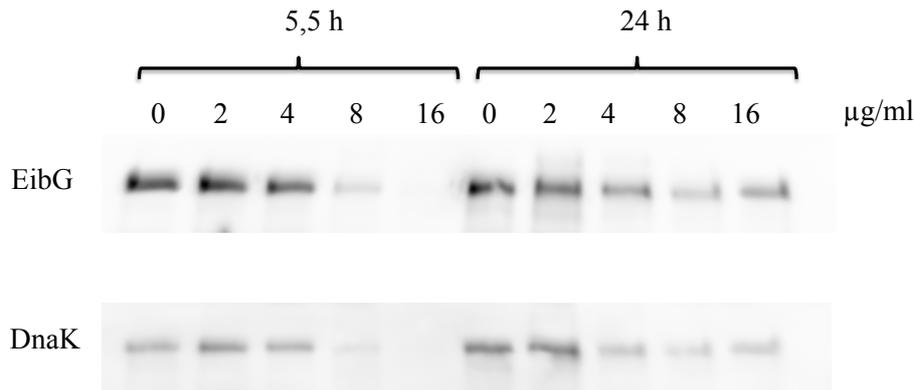
**Abbildung 13: Detektion von EibG und DnaK bei DA24.** Abgebildet sind die Ausschnitte von zwei Western Blots nach der einer Inkubation von DA24 für 5,5 h bzw. 24 h mit 0-16 µg/ml Azithromycin. Es sind die Banden des EibG-Tetramers (216 kDa) und die Banden von DnaK (70 kDa) dargestellt.

		0 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml
<b>EibG</b>	5,5 h	100 %	85,3 %	84,3 %	24,58 %	7,39 %
	24 h	100 %	62,06 %	26,58 %	94,89 %	52,06 %
<b>DnaK</b>	5,5 h	100 %	60,04 %	56,29 %	25,42 %	18,52 %
	24 h	100 %	145,5 %	158,67 %	124,25 %	120,15 %

**Tabelle 17: Signalstärken der EibG- und DnaK-Banden im Western Blot von DA24.** Es sind die Signalstärken der EibG-Tetramer- bzw. DnaK-Banden nach 5,5 h bzw. 24 h Inkubation von DA24 mit 0-16 µg/ml Azithromycin dargestellt. Die Werte sind prozentual zu den Messwerten der jeweiligen 0 µg/ml-Banden angegeben.

Der Stamm DA07 wurde ebenfalls diesem Versuch zugeführt. Im dargestellten Ausschnitt des Western Blots sind die EibG-Tetramere und DnaK zu erkennen (Abbildung 14). Hier ließ sich beobachten, dass die Expression von EibG bei 0 µg/ml Azithromycin nach 5,5 h und 24 h sehr ähnlich ist (Abnahme der Signalstärke um 13,36 % nach 24 h). Auffällig ist aber, dass sich die Expression unter 2 µg/ml des Antibiotikums kaum veränderte. Bei der 5,5 h-Bande betrug die Signalstärke immer noch 99,43 % der 0 µg/ml-Bande und bei der 24 h-Bande waren es noch 96,51 %. Erst ab 4 µg/ml lässt sich bei beiden Probezeitpunkten eine Reduktion der Expression erkennen (5,5 h: 4 µg/ml: 72,9 %, 8 µg/ml: 14,7 %, 16 µg/ml: 4,9 %. 24 h: 4 µg/ml: 53,6 %, 8 µg/ml: 30 %, 16 µg/ml: 45,5 %).

Die Expression von DnaK ist zwischen den Zeitpunkten 5,5 h und 24 h bei 0 µg/ml Azithromycin ähnlich (24 h: Reduktion um 12,3 %). Unter Azithromycin werden die Bandenintensitäten geringer. Zum Zeitpunkt 5,5 h sinkt die Bandenintensität von 100 % (0 µg/ml) auf 80,6 % (2 µg/ml), 30,8 % (4 µg/ml), 33,8 % (8 µg/ml) und 66,5 % (16 µg/ml). Bei 24 h beträgt die Bandenintensität 51,1 % (4 µg/ml), 81,1 % (8 µg/ml) bzw. 72,4 % (16 µg/ml) der Bandenintensität bei 0 µg/ml. Lediglich die 2 µg/ml-Bande hat mit 116,4 % eine dezent größere Signalstärke als die 0 µg/ml-Bande (Tabelle 18).



**Abbildung 14: Detektion von EibG und DnaK bei DA07.** Abgebildet sind die Ausschnitte von zwei Western Blots mit nach der einer Inkubation von DA07 für 5,5 h bzw. 24 h mit 0-16 µg/ml Azithromycin. Es sind die Banden des EibG-Tetramers (216 kDa) und die Banden von DnaK (70 kDa) dargestellt.

		0 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml
<b>EibG</b>	5,5 h	100 %	99,43 %	72,91 %	14,73 %	4,85 %
	24 h	100 %	96,51 %	53,59 %	29,97 %	45,49 %
<b>DnaK</b>	5,5 h	100 %	80,63 %	30,83 %	33,78 %	66,51 %
	24 h	100 %	116,36 %	51,13 %	81,11 %	72,38 %

**Tabelle 18: Signalstärken der EibG- und DnaK-Banden im Western Blot von DA07.** Es sind die Signalstärken der EibG-Tetramer- bzw. DnaK-Banden nach 5,5 h bzw. 24 h Inkubation von DA07 mit 0-16 µg/ml Azithromycin dargestellt. Die Werte sind prozentual zu den Messwerten der jeweiligen 0 µg/ml-Banden angegeben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Stämme DA07, DA24 und DA26 EibG unterschiedlich exprimieren. Bei DA24 war die Expression nach 5,5 h höher als nach 24 h, bei DA26 war es anders herum und bei DA07 war die Expression zu beiden Zeitpunkten vergleichbar.

Dennoch ließ sich bei den untersuchten Stämmen ein einheitliches Muster erkennen, wonach die Expression von EibG unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin sank. Entgegen der Erwartungen ließ sich dasselbe Verhalten auch bei dem Referenzprotein DnaK beobachten. Da die Reduktion der Expression bei allen drei Versuchen vergleichbar war, konnte DnaK trotzdem als Marker für die korrekte Probenapplikation herangezogen werden.

## 5. Diskussion

Im Jahr 2011 gab es in Norddeutschland eine Epidemie, die durch einen Shigatoxin produzierenden enteroaggregativen *E. coli* (STEAEC) ausgelöst wurde. Der Ausbruchsstamm hatte den Serotyp O104:H4<sup>5</sup>. Bei infizierten Patienten kam es zu Diarrhöen und zur Hämorrhagischen Kolitis, sowie zum klinisch schwerwiegenden Hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) und zu neurologischen Komplikationen<sup>66,96</sup>. Eine spezifische Therapie mit Antibiotika wird grundsätzlich bei Infektionen durch Shigatoxin produzierenden *E. coli* (STEC) nicht empfohlen<sup>32</sup>. Hintergrund ist die Annahme, dass Antibiotika über eine vermehrte Produktion und Freisetzung des Shigatoxins die Entstehung eines HUS begünstigen<sup>45,125</sup>. Das Shigatoxin wirkt sich unter anderem dysregulierend auf die Komplementkaskade aus<sup>111</sup>, wodurch Endothelschäden und Mikrothromben entstehen<sup>111</sup>. Diese verursachen wiederum die Endorganschäden in bspw. den Nieren<sup>2,119</sup>. Um diesem entgegenzuwirken, wurde während des Ausbruchs 2011 erstmals Eculizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den Komplementfaktor C5, als *Off-Label*-Medikament bei schweren Krankheitsverläufen und neurologischen Komplikationen eingesetzt<sup>54,65</sup>. Zusätzlich zu Eculizumab wurde das Makrolidantibiotikum Azithromycin als obligate Meningokokkenprophylaxe verabreicht. Hierunter zeigte sich eine rasche STEAEC-Dekolonisation der Patienten. Dieser Zusammenhang konnte in einer Studie von Nitschke *et al.* bestätigt werden<sup>79</sup>. Eine dreitägige Therapie mit Azithromycin (500 mg/d) stellte sich als effektiv und sicher dar, da das Entstehen eines HUS unter der Therapie nicht beobachtet wurde<sup>79</sup>. Daraufhin wandten sich auch Dauerausscheider, bei denen ein anderer STEC-Stamm als der Ausbruchsstamm nachgewiesen wurde, hilfesuchend an das UKSH, Campus Lübeck. Auch diese Patienten konnten effektiv dekolonisiert werden<sup>47</sup>. Von diesen Patienten stammen die Stuhlproben, aus welchen die in dieser Arbeit untersuchten Stämme isoliert wurden. Eine effektive Eradikationstherapie hat insofern einen hohen Stellenwert, als eine Dauerkolonisation eine subklinische, chronische Inflammation des Darms bewirken kann<sup>84</sup>. Zudem ist die psychosoziale Belastung der Dauerausscheider hoch, da sie ihren beruflichen und sozialen Alltag aufgrund der Hygieneschutzrichtlinien nicht wie gewohnt ausüben können<sup>80,135</sup>. Außerdem konnten Nitschke *et al.* zeigen, dass ohne eine Dekolonisationstherapie eine hohe Rate an Dauerausscheidern besteht, welche wiederum eine persistierende Transmission des Erregers bewirken<sup>80</sup>.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Mechanismen, die der klinisch beobachteten Dekolonisation nach Azithromycingabe zugrunde liegen, *in vitro* untersucht.

Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Azithromycin der einzelnen Stämme bestimmt. Diese lag bei 16 µg/ml (DA07, DA09 und DA18), 24 µg/ml (DA01, DA08, DA11, DA24, DA29 und ST24) oder 32 µg/ml (DA02, DA25 und DA26). *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis* und *Neisseria gonorrhoeae* gelten bei einer MHK von  $\leq 0,25$  µg/ml als sensibel und bei  $> 0,5$  µg/ml bereits als resistent gegenüber Azithromycin<sup>89</sup>. Bei *Staphylococcus* spp. liegen diese Grenzwerte bei  $\leq 1$  µg/ml bzw.  $> 2$  µg/ml Azithromycin<sup>89</sup>. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass die untersuchten STEC nicht sehr sensibel für Azithromycin sind. Es stellt sich daher die Frage, weshalb Azithromycin dennoch so effektiv in der Dekolonisationstherapie von STEC wirkt<sup>79</sup>.

Dies wurde im Folgenden näher untersucht. Dabei war die zentrale Fragestellung, welchen Effekt Azithromycin auf die Interaktion zwischen STEC und humanen Epithelzellen hat. Es wurde im Speziellen die Biofilmbildung und die spezifische Adhärenz untersucht, da sie eine wichtige Rolle in der Entstehung von bakterieller Dauerbesiedlung spielen und somit möglicherweise im Rahmen der Dekolonisationstherapie durch Azithromycin beeinflusst wurden<sup>17,64</sup>.

Zunächst wurde im Biofilmmassay überprüft, welche Stämme die Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzen. Es wurde zwischen starker Biofilmbildung ( $OD_{570} > 0,4$ ), schwacher Biofilmbildung ( $OD_{570} = 0,1-0,4$ ) und fehlender Biofilmbildung ( $OD_{570} < 0,1$ ) unterschieden. Sechs Stämme waren starke Biofilmbildner (DA07, DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24). Alle untersuchten Stämme mit dem Serotyp O91 (DA07, DA24, DA26) waren somit starke Biofilmbildner. Die Stämme DA01, DA02 und DA18 waren schwache Biofilmbildner und DA11 stellte sich als Biofilm-negativ dar. Dass bis auf eine Ausnahme (DA11) alle Stämme die Fähigkeit zur Biofilmbildung aufwiesen, erklärt die klinisch beobachtete Dauerausscheidung dieser STEC. Die Bakterien haften durch den Biofilm fest an das intestinale Epithel und werden so vor der natürlichen Eradikation durch Peristaltik und Ausschwemmung geschützt.

Um auf die eingangs genannte Fragestellung Bezug zu nehmen, wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich die Biofilmbildung unter dem Einfluss von Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen (0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml und 4 µg/ml) verändert. In diesen Versuch wurden die starken Biofilmbildner DA07, DA24, DA25, DA26, DA29 und ST24 eingeschlossen. Bei allen Stämmen zeigte sich ab 1-

3 µg/ml Azithromycin eine signifikante Hemmung der Biofilmbildung. Diese Konzentrationen liegen deutlich unterhalb der MHK von Azithromycin der einzelnen Stämme (1/32-1/8 der MHK). Es ist daher davon auszugehen, dass die Reduktion der gemessenen optischen Dichte nicht auf einer Wachstumshemmung der Bakterien beruht. Vielmehr war die Anzahl der Bakterien in der Suspension verringert, da sie aufgrund einer beeinträchtigten Biofilmbildung an der Glasoberfläche während der Waschschriffe abgespült wurden. Diese Beobachtung ist kongruent zu anderen *in vitro* und *in vivo* Studien, in welchen Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen auch bei *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* die Biofilmbildung reduziert oder verzögert<sup>28,31,36,74</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurde bei diesen Spezies wie folgt erklärt: Azithromycin ist bereits in subinhibitorischen Konzentrationen ein *quorum sensing inhibitor* (QSI)<sup>31,74,118</sup>. *Quorum sensing* bezeichnet die Fähigkeit von Bakterien, über chemische Signalmoleküle (*Autoinducer*) zu interagieren und die Genexpression zu regulieren. Die *Autoinducer* werden von *quorum sensing* Bakterien produziert und freigesetzt. Ihre Konzentration steigt bei zunehmender Zellpopulationsdichte, woraufhin es ab der Überschreitung einer stimulatorischen Schwelle zur Alteration der Genexpression kommt. Dadurch wird unter anderem die Motilität, Sporulation, Virulenz und Biofilmbildung reguliert<sup>70</sup>. QSI wie Azithromycin haben somit einen hemmenden Effekt auf die Biofilmformation<sup>9,24,31</sup>. Dieser Mechanismus könnte auch auf die untersuchten STEC übertragbar sein.

Zudem wirken Makrolidantibiotika wie Azithromycin auch in subinhibitorischen Konzentrationen hemmend auf die Produktion von Adhäsinen<sup>109,110</sup>. Dadurch wird die Adhäsion unter den Bakterien und zwischen Bakterium und Oberfläche unterbunden, welche den initialen Schritt zur Ausbildung eines Biofilms darstellt. Bei STEC mit dem Serotyp O91 ist EibG ein solches Adhäsine, welches in der äußeren Membran verankert ist<sup>58</sup>. Merkel konnte 2013 nachweisen, dass auffällig viele *eibG*-positive Stämme ein fehlendes oder nicht typisierbares Flagellin hatten (H/Hnt)<sup>67</sup>. Er stellte die Hypothese auf, dass die eingeschränkte Motilität die Expression von anderen Virulenzfaktoren wie dem Adhäsine EibG begünstigt<sup>67</sup>. Er konnte zudem nachweisen, dass EibG während der Biofilmtransformation vermehrt exprimiert wird<sup>67</sup>. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass bei den O91-Stämmen die beobachtete reduzierte Biofilmbildung unter Azithromycin zumindest teilweise auf der verminderten Synthese von EibG beruht. Jedoch lässt sich dies nicht auf alle untersuchten Stämme übertragen, da solche, die keinen O91-Serotyp haben, nicht mit dem Vorhandensein des Gens *eibG* assoziiert sind. Sie werden

aber dennoch im selben Maße in der Biofilmbildung gehemmt wie die Stämme mit einem O91-Serotyp. Es ist daher zu vermuten, dass neben dem EibG noch andere Adhäsine an der Biofilmbildung beteiligt sind und durch Azithromycin in ihrer Biosynthese gehemmt werden.

Um weitere Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Azithromycin auf die STEC zu gewinnen, wurde in einem nächsten Schritt die spezifische Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen untersucht. Lu *et al.* beschrieben 2006, dass STEC mit dem Serotyp O91 an humanen Epithelzellen ein spezielles kettenförmiges Adhärenzmuster ausbilden, das sogenannte CLAP (*chain like adherence pattern*)<sup>58</sup>. Dieses Adhärenzmuster wird durch das Adhäsिन EibG vermittelt<sup>58</sup>. Um Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Adhäsionsproteinen wie dem EibG zu ziehen, wurde daher zunächst überprüft, welche Adhärenzmuster die Stämme ausbilden. Dafür wurden alle Stämme im Zellkulturassay phänotypisch charakterisiert. Die STEC wurden für 3 h in einem Nährmedium zusammen mit HEP2-Zellen inkubiert, so dass sie an die Epithelzellen adhäreren konnten. Anschließend wurden die Zellen gefärbt und mikroskopiert. Bei der phänotypischen Beurteilung der Adhärenzmuster wurde zwischen der kettenförmigen Adhärenz (CLAP), der diffusen Adhärenz, der aggregativen Adhärenz und der fehlenden Adhärenz unterschieden. Sechs Stämme konnten dem diffusen Adhärenztyp zugeordnet werden (DA02, DA11, DA18, DA25, DA29, ST24). Sechs andere Stämme präsentierten sich mit einem CLAP (DA01, DA07, DA08, DA09, DA24, DA26). Fünf von diesen Stämmen mit einem CLAP hatten den Serotyp O91 (DA07, DA08, DA09, DA24 und DA26). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Lu *et al.*, wonach der Serotyp O91 mit der Ausbildung des CLAP assoziiert ist<sup>58</sup>. Lediglich der Stamm DA01 hatte einen anderen Serotyp (O26:H11), zeigte aber trotzdem eine kettenförmige Adhärenz. Im Vergleich zu den O91-Stämmen bildete er jedoch größere Ketten aus, in welchen die Bakterien wenig geordnet aneinander adhärerten. Somit war die Zuordnung von DA01 zum CLAP nicht eindeutig. Alternativ könnte es sich hierbei um einen diffusen Adhärenztyp mit einem stark autoaggregativen Verhalten handeln. Keiner der in dieser Arbeit untersuchten Stämme zeigte ein aggregatives Adhärenzmuster. Damit unterscheiden sich diese Stämme von dem Ausbruchsstamm O104:H4 von 2011, welcher als enteroaggregativer *E. coli* das Plasmid pAA besitzt. Dies kodiert für AAFs, den *aggregative adherence fimbriae*, die das Bakterium in der intestinalen Mukosa verankern und das aggregative Adhärenzmuster bewirken<sup>78</sup>. In Kombination mit anderen Faktoren, wie den cytotoxischen Serinprotease-Autotransportern (SPATEs), bewirkt diese Adhärenz eine lokale Inflammation und

Epitheldestruktion, was dazu führt, dass eine relativ große Menge an Shigatoxin systemisch aufgenommen wird<sup>18,78</sup>. Das erklärt unter anderem die hohe Virulenz des Erregerstamms und stellt einen wesentlichen Unterschied zu den hier untersuchten Stämmen dar. Zudem scheint die aggregative Adhärenz ein Grund dafür zu sein, warum bei dem Ausbruchsstamm O104:H4 die Ausscheidendauer verhältnismäßig lang war<sup>26,96,123</sup>. Nach der phänotypischen Charakterisierung der Adhärenzmuster der STEC wurde untersucht, welchen Einfluss Azithromycin auf die Adhäsion der STEC an HEp2-Zellen hat. Der Versuchsaufbau des Zellkulturassays wurde beibehalten, jedoch fand nun die Inkubation der Zellen zusammen mit Azithromycin statt. Die Konzentration von Azithromycin wurde so gewählt, dass sie im subinhibitorischen Bereich lag (0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml). Es wurde zum einen qualitativ untersucht, welche mikroskopisch erkennbaren Veränderungen der Adhäsion auftreten, und zum anderen quantitativ ausgewertet, wie sich das Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnis unter Azithromycin verändert. Nur Bakterien, die ausreichend an den Epithelzellen adhärten, wurden nicht durch die Waschschriffe abgespült. Nach einer dreistündigen Inkubation wurden die Zellen gefärbt, mikroskopische Aufnahmen gemacht und die Bakterien im Verhältnis zu den HEp2-Zellen ausgezählt. Einige Stämme stellten sich im Zellkulturassay jedoch stark autoaggregativ dar, wodurch die Bakterien nicht einzeln diskriminiert werden konnten und eine quantitative Auszählung nicht möglich war. Diese Stämme waren gleichzeitig aber auch diejenigen Stämme, welche starke Biofilmbildner waren. Die stark autoaggregative Adhärenz war demnach das mikroskopische Korrelat des Biofilms im Zellkulturassay. Die starken Biofilmbildner wurden bereits im Biofilmassay auf den Einfluss von Azithromycin untersucht. Somit wurde jeder Stamm mindestens einmal entweder im Biofilmassay oder im Zellkulturassay quantitativ auf den Effekt von Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen untersucht. Der Stamm DA07 war als einziger ein starker Biofilmbildner, der aber trotz der aggregativen Adhärenz noch quantitativ im Zellkulturassay erfasst werden konnte. Daher wurde er sowohl im Zellkulturassay als auch im Biofilmassay unter dem Einfluss von Azithromycin untersucht. Im Zellkulturassay wurden unter Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen die folgenden drei Beobachtungen gemacht. Zum einen konnte im Zellkulturassay beobachtet werden, dass die Stämme, die ein CLAP ausbildeten, dieses Adhärenzmuster unter Azithromycin verloren. Die Bakterien adhärten nur noch vereinzelt und diffus verteilt an den HEp2-Zellen. Da EibG für die Ausbildung des CLAP notwendig ist<sup>58</sup>, ließe sich

ableiten, dass Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen die Synthese von EibG inhibiert würde.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Anzahl der Bakterien, die an den Epithelzellen haften, bei allen Stämmen sank. Bei den Stämmen, die quantitativ ausgewertet werden konnten, trat eine signifikante Reduktion des Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnisses bereits ab einer Azithromycinkonzentration von 0,5-1 µg/ml ein. Da diese Konzentration nur 1/64 bis 1/16 der MHK von Azithromycin der untersuchten Stämme entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass der Reduktion des Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnisses tatsächlich eine Adhäsionsminderung und keine Wachstumshemmung zugrunde liegt. Dieselbe Erkenntnis liefert auch der Vergleich zu den Wachstumskurven unter 0-4 µg/ml Azithromycin, die exemplarisch von den Stämmen DA02, DA07, DA08 und DA09 gemessen wurden. Es zeigte sich beispielsweise bei DA02 während der Latenz- und exponentiellen Wachstumsphase kein Unterschied in den Wachstumskurven mit 0 µg/ml und 1 µg/ml Azithromycin. Die Bakterien befinden sich zum Zeitpunkt der Auswertung des Zellkulturassays nach der dreistündigen Inkubation in der exponentiellen Wachstumsphase. Somit zeigt sich beispielhaft an dem Stamm DA02, dass die signifikante Reduktion des Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnisses bei 0,5 µg/ml Azithromycin nicht auf einer Wachstumshemmung beruht. Bei den Stämmen DA07, DA08 und DA09 zeigte sich zwar eine dezente Wachstumshemmung während der exponentiellen Phase unter Azithromycin, diese fiel aber deutlich geringer aus als der Effekt, welcher im Zellkulturassay beobachtet wurde. Es kann demnach zusammenfassend festgehalten werden, dass die Adhäsion der STEC unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin beeinträchtigt ist. Diese Beobachtung deckt sich mit Studien, welche ebenfalls eine verminderte Adhäsion von *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* und *E. coli* an Epithelzellen unter dem Einfluss von subinhibitorischen Konzentrationen von Makrolidantibiotika zeigten<sup>10,29,102,129</sup>. Dieser Effekt konnte in diversen Studien unter anderem auf eine reduzierte Synthese von Pilin und der dadurch verminderten Ausbildung von Pili zurückgeführt werden<sup>29,109,112,129</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch andere Adhäsions-vermittelnde Proteine, wie zum Beispiel das Protein II bei *Neisseria gonorrhoeae*, bei subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen vermindert synthetisiert werden<sup>109,112</sup>. Daher kann darauf geschlossen werden, dass auch in diesem Zellkulturassay die verminderte Anheftung auf eine reduzierte Synthese von Adhäsinen zurückzuführen ist. Bei den untersuchten O91-Stämmen könnte es sich hierbei um EibG handeln, welches als Adhäsine bei *eae*-negativen

STEC beschrieben wurde<sup>58,67</sup>. Die Adhäsion ist jedoch auch bei Stämmen reduziert, welche einen anderen Serotyp als O91 haben und somit nicht als EibG-exprimierend beschrieben sind. Es stellt sich daher die Frage, ob EibG tatsächlich das Adhäsins ist, welches über eine verminderte Synthese zum dargestellten Effekt führt.

Die dritte Beobachtung im Zellkulturassay war, dass die Bakterien unter Azithromycin elongiert erschienen. Da die Elongation der STEC unter Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen in der Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen wurde<sup>106</sup>, wurde in dieser Arbeit auf die quantitative Auswertung verzichtet. Die Verlängerung eines Bakteriums ist auf eine Inhibierung der Zellteilung zurückzuführen<sup>105</sup>, was durch einen generellen Zellstress aufgrund von ungünstigen Umgebungsbedingungen ausgelöst werden kann<sup>15,98,120,127</sup>. Pulvertaft beschrieb bereits 1952, dass auch Antibiotika wie beispielsweise Penicillin in bestimmten Konzentrationen die Elongation von *E. coli* bewirken können<sup>91</sup>. Der Effekt von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika konnte später wie folgt erklärt werden: Durch die Inaktivierung des *penicillin binding protein 3* (PBP3) durch das Antibiotikum wird das SOS-Response induziert, was im Bakterium einen Schutzmechanismus zur Reparatur von DNA-Schäden darstellt. Daraufhin wird die Polymerisation von FtsZ gehemmt. FtsZ ist ein Protein, welches normalerweise den Z-Ring (Teilungsring) bildet und damit die bakterielle Zellteilung initiiert<sup>69</sup>. Der genaue Wirkmechanismus von Azithromycin in Hinblick auf die Hemmung der Zellteilung ist jedoch noch unklar. Ein Review von Shyrock *et al.* zeigt zusammengefasst für eine Reihe an Proteinen (z.B. Adhäsine, Exotoxine und Exoenzyme), dass ihre Synthese bereits unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin reduziert ist<sup>109</sup>. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass auch die Biosynthese von FtsZ inhibiert ist. Die Z-Ringe unterliegen einem ständigen Turnover, da die Halbwertszeit nur etwa 30 s beträgt<sup>114</sup>. Daher würde sich eine Supprimierung der Biosynthese von FtsZ durch Azithromycin unmittelbar auf die Zellteilung auswirken, wodurch die Elongation zeitnah im Zellkulturassay nachvollziehbar ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die Biofilmbildung als auch die Adhäsion der STEC an Epithelzellen durch Azithromycin reduziert werden. Diese Effekte können auf eine verminderte Proteinbiosynthese von Adhäsinen hinweisen. Im Zellkulturassay zeigte sich, dass sich das Adhärenzmuster CLAP unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin auflöst. In einer Publikation von Lu *et al.* wurde EibG als das Adhäsins bei *eae*-negativen STEC mit dem Serotyp O91 beschrieben<sup>58</sup>, welches für die Ausbildung des CLAP verantwortlich ist<sup>58</sup>. Daher lässt sich vermuten, dass

Azithromycin maßgeblich über eine Inhibierung der Biosynthese von EibG eine Biofilm- und Adhäsionsminderung bei STEC mit dem Serotyp O91 bewirkt. Um dies genauer darzustellen, wurde in einem nächsten Schritt mithilfe von SDS-PAGE und Western Blot das Expressionsmuster von EibG unter dem Einfluss von Azithromycin untersucht.

Zunächst wurden alle Stämme, die einen O91-Serotyp hatten und das CLAP zeigten, auf die Existenz von EibG untersucht. Das waren die Stämme DA07, DA24 und DA26. Zudem wurden die Stämme DA08 und DA09 als Positivkontrolle mitgeführt, da sie in der Arbeitsgruppe bereits als EibG-positiv bekannt waren<sup>106</sup>. Der Stamm DA18 mit dem Serotyp O174:H21 und einem diffusem Adhärenzmuster wurde als Negativkontrolle mitgeführt, da er weder dem Serotyp O91, noch dem Adhärenzmuster CLAP entsprach, welche zusammen mit dem Vorhandensein von *eibG* assoziiert sind<sup>58</sup>. Die STEC wurden für 5,5 h bzw. 24 h im Nährmedium inkubiert und anschließend wurden die zellulären Proteine extrahiert. Die Proteinextraktionsmethode durch Sonifizierung zeigte sich als effektiver als die mechanische Lyse und wurde aus diesem Grund weiter angewandt. Ein definiertes Probenvolumen mit einer standardisierten Proteinkonzentration wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurde EibG im Western Blot dargestellt. Den Erwartungen entsprechend konnte bei den Stämmen DA07, DA08, DA09, DA24 und DA26 EibG im Western Blot detektiert werden und bei DA18 nicht. Diese Beobachtung deckt sich mit den bereits genannten Ergebnissen von Lu *et al*<sup>58</sup>. Bei den Stämmen DA07, DA24 und DA26 zeigte sich ein unterschiedliches Expressionsmuster von EibG über die Zeit. Bei DA07 ließ sich nach 5,5 h ungefähr gleich viel EibG detektieren wie nach 24 h, bei DA24 nahm die Expression von EibG über die Zeit ab und bei DA26 nahm die Expression über die Zeit zu. Das zeigt, dass EibG nicht konstant exprimiert wird.

Als nächstes wurde untersucht, wie sich die Expression von EibG bei Inkubation der STEC mit Azithromycin verändert. Aufgrund der unterschiedlichen Expression von EibG über die Zeit, die bereits beschrieben wurde, konnte nicht nur ein Stamm repräsentativ für alle drei untersucht werden. Daher wurden alle drei Stämme in den nächsten Versuch eingeschlossen. Der bisher beschriebene Versuchsaufbau blieb bestehen, aber nun wurden die STEC zusammen mit Azithromycin inkubiert. Die Konzentrationen des Antibiotikums wurden mit 0 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml und 16 µg/ml so gewählt, dass sie im subinhibitorischen Bereich lagen. Die Inkubation erfolgte für 5,5 h bzw. 24 h. Somit stammte eine Probe aus der exponentiellen und eine aus der stationären Wachstumsphase. Eine Orientierung für die Wachstumsphasen lieferten die Wachstumskurven von den Stämmen DA02, DA07, DA08 und DA09, die zuvor angefertigt wurden. Zusätzlich zu

EibG sollte das *Heat Shock Protein* DnaK dargestellt werden, welches konstant exprimiert wird<sup>61</sup>, um eine isolierte Expressionsveränderung von EibG nachvollziehen zu können. Bei allen drei Stämmen konnten EibG-Banden mit ca. 200-240 kDa detektiert werden, welche den Tetrameren von EibG entsprechen<sup>58</sup>. Die native trimere Form (162 kDa) wurde durch das Erhitzen der Proben auf 95 °C unter reduzierenden Bedingungen aufgelöst, und beim Abkühlen bildete sich die tetramere Form des EibG, welches ein theoretisch ermitteltes Molekulargewicht von 216 kDa besitzt. Zudem zeigten sich Banden mit 100-120 kDa, welche dem Dimer (108 kDa) entsprechen, und weniger scharf begrenzte Banden bei ca. 25 kDa, die vermutlich durch Abbruchfragmente des EibG entstanden. Bei allen drei Stämmen nahm innerhalb eines Zeitpunktes (5,5 h bzw. 24 h) die Expression des EibG bei steigender Azithromycin-Konzentration deutlich ab. Dies wurde bei allen drei Stämmen unabhängig von dem nativen Expressionsmuster über die Zeit beobachtet. Gorby *et al.* konnten ähnliche Beobachtungen anstellen, wonach subinhibitorische Konzentrationen von Azithromycin bei *Neisseria gonorrhoeae* die Expression von Pilin inhibierten<sup>29</sup>. Interessanterweise nahm jedoch auch die Expression von DnaK unter Azithromycin ab. Somit scheint Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen nicht nur auf die Biosynthese von EibG, sondern auch auf die von DnaK hemmend zu wirken. Das lässt vermuten, dass eventuell auch andere, hier nicht untersuchte Adhäsions-vermittelnde Proteine in ihrer Biosynthese inhibiert wurden. Es konnte bereits für verschieden Proteine (z.B. Adhäsine, Exotoxine, Exoenzyme) gezeigt werden, dass ihre Expression unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin reduziert ist<sup>109</sup>. Da in den Untersuchungen dieser Arbeit jedoch immer dieselbe Menge an Proteinen pro Bahn aufgetragen wurde, lässt sich ableiten, dass es nicht zu einer allgemeinen, gleichmäßigen Hemmung der gesamten Proteinbiosynthese kam, sondern dass sich das Verhältnis aller exprimierten Proteine zueinander veränderte. Eine mögliche Erklärung für die inkomplette Hemmung der Proteinbiosynthese bietet die folgende Hypothese, die Gorby *et al.* beschrieben<sup>29,108,113</sup>: Die bakteriellen Ribosomen reagieren in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation unterschiedlich stark auf den Einfluss von niedrig konzentrierten Antibiotika. Membrannahe Ribosomen, welche vor allem an der Biosynthese von Exoenzymen und Exotoxinen beteiligt sind, werden bei niedrigeren Konzentrationen eher in ihrer Funktion gehemmt als solche Ribosomen, die zentraler sind. Dies lässt sich auch auf EibG und andere Adhäsine übertragen, da es sich hierbei ebenfalls um Exoproteine handelt. Des Weiteren fällt auf, dass beim Stamm DA07 die Expression von EibG bei 2 µg/ml Azithromycin noch fast unverändert ist, wohingegen im Zellkulturassay schon ab 1 µg/ml

eine signifikante Reduktion der Adhäsion beobachtet werden kann. Die Biofilmbildung von DA07 war bereits bei 2 µg/ml Azithromycin signifikant reduziert. Ebenso lässt sich bei dem Stamm DA26 eine Diskrepanz zwischen der Hemmung der Biofilmbildung und der verminderten EibG-Expression feststellen. DA26 zeigt bereits ab einer Azithromycinkonzentration von 2 µg/ml eine signifikante Reduktion der Biofilmbildung. Im Western Blot zeigt sich jedoch bei einer Inkubation der Bakterien mit derselben Konzentration über 5,5 h, was derselben Wachstumsphase der Bakterien wie im Biofilmmassay entspricht, sogar eine Zunahme der Signalstärke der EibG-Bande um 21 %. Somit ist es somit unwahrscheinlich, dass die verminderte Adhäsion im Zellkulturassay bzw. die verminderte Biofilmbildung dieser beiden Stämme auf einer alleinigen Reduktion der EibG-Expression beruht.

Bei dem Stamm DA24 zeigt sich hingegen schon ab einer Azithromycinkonzentration von 2 µg/ml eine Reduktion der Signalstärke der EibG-Bande um 15 %, wohingegen die Biofilmbildung erst ab 3 µg/ml Azithromycin gehemmt wurde. Im Western Blot zeigt sich in der nächsten Konzentrationsstufe von 4 µg/ml keine weitere Reduktion der EibG-Expression. Es scheint daher keine Korrelation zwischen der Abnahme der EibG-Biosynthese und der reduzierten Biofilmbildung zu geben.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass unter subinhibitorischen Konzentrationen von Azithromycin nicht nur isoliert EibG, sondern auch DnaK und damit womöglich auch noch andere Proteine vermindert synthetisiert werden. Zudem tritt die Hemmung der Biosynthese von EibG bei DA07 und DA26 bei höheren und bei DA24 bei niedrigeren Konzentrationen von Azithromycin ein als die Hemmung der Adhäsion bzw. der Biofilmbildung. Es ist daher kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der EibG-Expression und den Beobachtungen im Zellkultur- und Biofilmmassay erkennbar. Des Weiteren ließ sich eine Supprimierung der Biofilmbildung und der Adhäsion an HEp2-Zellen auch bei STEC-Stämmen nachweisen, welche weder den Serotyp O91 hatten, noch das CLAP ausbildeten und somit nicht mit dem Vorhandensein von *eibG* assoziiert sind. Daher lässt sich ableiten, dass die reduzierte Adhäsion und Biofilmbildung unter Azithromycin nicht in erster Linie auf einer verminderten EibG-Biosynthese beruht. Es erscheint wahrscheinlicher, dass die Hemmung im Zellkultur- und Biofilmmassay auf einer partiellen Hemmung der bakteriellen, ribosomalen Proteinbiosynthese basiert, welche auch die Adhäsine betrifft. Dies wäre, wie bereits beschrieben, auch kongruent zu der Annahme von Gorby *et al.*, wonach die bakterielle Proteinbiosynthese in Abhängigkeit von der Lokalisation der Ribosomen unterschiedlich stark durch niedrig konzentrierte Antibiotika

gehemmt wird<sup>29</sup>. Des Weiteren erschienen die Bakterien unter Azithromycin elongiert, was Ausdruck eines generellen Zellstresses mit veränderter Genexpression sein kann<sup>15,98,120,127</sup>. Es ist zu vermuten, dass die reduzierte Adhäsion und Biofilmbildung auf einem Zusammenspiel von mehreren Faktoren, insbesondere von mehr Adhäsinen als nur dem EibG, beruht.

Vor dem Hintergrund der hier beschriebenen Ergebnisse wäre es sehr interessant, weiterführende Untersuchungen zu anderen Adhäsinen, die ebenfalls eine Rolle spielen könnten, anzustellen. Um Aufschluss darüber zu gewinnen, welche Proteine während der Adhäsion vermehrt exprimiert werden, bietet sich eine RNA-Extraktion an. Es sollten STEC, die zusammen mit HEp2-Zellen inkubiert wurden, verglichen werden mit solchen STEC, die ohne HEp2-Zellen keine Möglichkeit zur Ausübung einer Adhäsion hätten. Von den in Frage kommenden Proteinen sollte daraufhin ebenfalls eine Expressionsanalyse (SDS-PAGE und Western Blot) bei Inkubation der Bakterien mit Azithromycin erfolgen, um zu untersuchen, inwiefern sie an der Adhäsionsminderung beteiligt sind.

Zudem sollten in einem nächsten Schritt auch Stämme mit einem anderen Serotyp als O91 auf Adhäsine untersucht werden, da diese nachweislich ebenfalls mit Adhäsions- und Biofilmreduktion auf Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen reagieren. Dies könnte Aufschluss auf Adhäsine geben, die eventuell auch bei O91-Stämmen neben dem EibG existieren.

Eine Studie von Wong *et al.* trug maßgeblich zur Zurückhaltung bei der antibiotischen Therapie von STEC-Infektionen bei, weil dabei ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines HUS beobachtet wurde<sup>125</sup>. Bei denjenigen Patienten, die in dieser Studie nach Antibiotikagabe ein HUS entwickelten, handelte es sich bei dem Medikament jedoch entweder um Trimethoprim/Sulfamethoxazol oder um ein Cephalosporin<sup>125</sup>. Diese wirken im Gegensatz zu Azithromycin bakterizid und können somit über eine bakterielle Lyse die Freisetzung von Shigatoxin begünstigen. Zudem handelte es sich in der Studie von Wong *et al.* um einen STEC mit dem Serotyp O157:H7, welcher dem Seropathotyp A angehört und somit als hoch virulent einzustufen ist<sup>44,125</sup>. Die STEC, welche in diversen Studien aus Stuhlproben von Dauerausscheidern isoliert wurden, haben jedoch als non-O157-Serotypen einen weniger virulenten Seropathotyp<sup>38,47,80</sup>. Sie sind per se mit einem geringeren Risiko für die Entstehung eines HUS assoziiert<sup>38</sup>, da sie zum einen über weniger Virulenzfaktoren (z.B. *eae*, *stx2*) verfügen<sup>38,44,47</sup> und zum anderen das Auftreten eines HUS primär in den ersten zwei Wochen einer STEC-Infektion beobachtet wird und

nicht bei Dauerkolonisation<sup>42</sup>. Die Ergebnisse der Studie von Wong *et al.* lassen sich daher nicht auf eine Dekolonisationstherapie mit Azithromycin übertragen. Um das tatsächliche Risiko der Therapie mit Azithromycin beurteilen zu können, ist es wichtig, den Mechanismus aufzuklären, der zur STEC-Dekolonisation nach der Gabe des Antibiotikums führt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Adhäsion und Biofilmbildung der STEC an humane Epithelzellen unter Azithromycin vermindert ist. Übertragen auf *in vivo*-Szenarien bedeutet das, dass die Erreger leichter aus dem Darm eliminiert werden. Das erklärt die Dekolonisation von STEC-Patienten, die in der Studie von Nitschke *et al.* beschrieben wurde<sup>79</sup>. Es ist von klinischer Bedeutung, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Azithromycin die Adhäsion der Bakterien beeinträchtigt. Die Zellen werden aus dem Darm eliminiert, ohne lysiert zu werden, wodurch es zur Freisetzung von Shigatoxin kommen würde. Das trägt zu der Erklärung bei, warum klinisch unter einer Therapie mit Azithromycin keine Entstehung eines HUS bei den Patienten beobachtet wurde<sup>38,47,80</sup> und diese Dekolonisationstherapie damit in dieser Hinsicht risikoarm ist.

## 6. Zusammenfassung

Während des Ausbruchs eines Shigatoxin produzierenden enteroaggregativen *E. coli* (STEAEC) im Jahr 2011<sup>96</sup> konnte klinisch gezeigt werden, dass eine dreitägige Therapie mit Azithromycin 500 mg zu einer Eradikation dieser Bakterien aus dem Magen-Darm-Trakt führt<sup>79</sup>. In Folge dieser Erkenntnisse wandten sich Dauerausscheider von Shigatoxin produzierenden *E. coli* (STEC), die mit einem anderen Stamm als dem Ausbruchsstamm O104:H4 besiedelt waren, hilfeschend an das UKSH Lübeck. Auch sie konnten erfolgreich mit Azithromycin dekolonisiert werden<sup>47</sup>. Diese Arbeit sollte *in vitro* die Interaktion zwischen diesen STEC, ihrer Adhäsion an Epithelzellen und Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen untersuchen. Die Aufklärung des Wirkmechanismus ist unerlässlich für eine Risikoevaluierung der Therapie in Hinblick auf die mögliche antibiotikainduzierte Entstehung eines Hämolytisch-urämischen Syndroms.

Neun von zehn untersuchten Stämmen besaßen die Fähigkeit zur Biofilmbildung. Dies erklärt die klinisch beobachtete Dauerausscheidung dieser STEC. Es wurde festgestellt, dass Azithromycin schon in subinhibitorischen Konzentrationen signifikant die Biofilmbildung von STEC inhibiert. Im Zellkulturassay zeigten sechs Stämme ein diffuses Adhärenzmuster und weitere sechs Stämme ein kettenförmiges Adhärenzmuster, das CLAP, welches durch das Adhäsion EibG zustande kommt und mit dem Serotyp O91 assoziiert ist<sup>58</sup>. Es fiel auf, dass keiner der untersuchten Stämme ein aggregatives Adhärensmuster ausbildete, was einen wichtigen Unterschied zu dem Ausbruchsstamm O104:H4 darstellt<sup>78</sup>. Azithromycin reduzierte in subinhibitorischen Konzentrationen signifikant die Adhäsion der Bakterien an HEp2-Zellen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte von Azithromycin im Biofilm- und Zellkulturassay auf eine veränderte Expression von dem Adhäsion EibG zurückzuführen sind. Bei allen untersuchten Stämmen, die den Serotyp O91 hatten und das CLAP ausbildeten, konnte die Expression von EibG mittels Western Blot nachgewiesen werden. Durch die Inkubation der Stämme mit Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen konnte eine Expressionsminderung von EibG beobachtet werden. Jedoch konnte kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der reduzierten Biosynthese von EibG und der verminderten Biofilmbildung bzw. Adhäsion nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlicher, dass die Bakterien unter Azithromycin in subinhibitorischen Konzentrationen einer relativ unspezifischen Hemmung der Proteinbiosynthese, einschließlich die der Adhäsine, unterliegen sind. Dass die Adhäsion der STEC an Epithelzellen unter Azithromycin reduziert ist, erklärt die rasche Elimination der Bakterien aus dem Darm. Die Bakterien werden dabei nicht lysiert, wodurch das Risiko einer HUS-Entwicklung bestehen würde.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adam D, Doerr HW, Link H & Lode H: *Die Infektiologie*. 1. Auflage, 131-132, Berlin, Springer-Verlag, 2004
2. Barrett TJ, Potter ME & Wachsmuth IK: Continuous peritoneal infusion of Shiga-like toxin II (SLT II) as a model for SLT II-induced diseases. *J. Infect. Dis.* **159**, 774–7 (1989)
3. Berger P, Knödler M, Förstner KU, Berger M, Bertling C, Sharma CM, Vogel J, Karch H, Dobrindt U & Mellmann A: The primary transcriptome of the *Escherichia coli* O104:H4 pAA plasmid and novel insights into its virulence gene expression and regulation. *Nat. Publ. Gr.* (2016) doi:10.1038/srep35307
4. Berns JS, Kaplan BS, Mackow RC & Hefter LG: Inherited hemolytic uremic syndrome in adults. *Am. J. Kidney Dis.* **19**, 331–4 (1992)
5. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G & Karch H: Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 671–676 (2011)
6. Blasi F, Cazzola M, Tarsia P, Cosentini R, Aliberti S, Santus P & Allegra L: Expert Opinion on Pharmacotherapy Azithromycin and lower respiratory tract infections. *Expert Opin. Pharmacother* **6**, 2335–2351 (2005)
7. Boerlin P, Mcewen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP & Gyles CL: Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 497–503 (1999)
8. Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, Krogfelt KA & Nataro JP: Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 294–301 (2009)
9. Brackman G & Coenye T: Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 5–11 (2015)
10. Braga PC & Piatti G: Interference by subinhibitory concentrations of azithromycin with the mechanism of bacterial adhesion to human epithelial cells. *Chemotherapy* **39**, 432–7 (1993)
11. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM & Beachey EH: Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical

- devices. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 996–1006 (1985)
12. Clements A, Young JC, Constantinou N & Frankel G: Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **3**, 71–87 (2012)
  13. Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–22 (1999)
  14. Cramton SE, Ulrich M, Götz F & Döring G: Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **69**, 4079–85 (2001)
  15. D’Ari R & Huisman O: Novel Mechanism of Cell Division Inhibition Associated with the SOS Response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **156**, 243–250 (1983)
  16. Dandekar T, Jain P, Pereyre S, Goret J & Bébéar C: Mycoplasma pneumoniae: Current Knowledge on Macrolide Resistance and Treatment *Mycoplasma pneumoniae* Macrolide Resistance and Treatment. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016)
  17. Darouiche RO: Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N Engl J Med* **350**, 1422–1429 (2004)
  18. Dautin N: Serine protease autotransporters of *enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins (Basel)*. **2**, 1179–206 (2010)
  19. Deighton M & Borland R: Regulation of Slime Production in *Staphylococcus epidermidis* by Iron Limitation. *Infect. Immun.* **61**, 4473–4479 (1993)
  20. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie: Therapeutische Apheresebehandlung bei EHEC assoziiertem HUS. (2011) Available at: <http://www.dgfn.eu/aktuell/ehec-informationen/fuer-das-fachpublikum/therapeutische-apheresebehandlung-bei-ehec-assoziiertem-hus.html>. (Accessed: 2nd April 2017)
  21. Drew RH & Gallis HA: Azithromycin--spectrum of activity, pharmacokinetics, and clinical applications. *Pharmacotherapy* **12**, 161–73 (1992)
  22. Dupont HL: Therapy for and Prevention of Traveler’s Diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 78–84 (2007)
  23. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T & Igarashi K: Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* **171**, 45–50 (1988)
  24. Favre-Bonté S, Köhler T & Delden C Van: Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C 4 -HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 598–604 (2003)

25. Flemming H-C & Wingender J: The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–33 (2010)
26. Frank C *et al.*: Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany for the HUS Investigation Team. *N Engl J Med* **365**, 1771–80 (2011)
27. Giddings SL, Stevens AM & Leung DT: Traveler’s Diarrhea. *Med Clin North Am.* **100**, 317–330 (2016)
28. Gillis RJ & Iglewski BH: Azithromycin Retards *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5842–5845 (2004)
29. Gorby GL & McGee ZA: Antimicrobial Interference with Bacterial Mechanisms of Pathogenicity: Effect of Sub-MIC Azithromycin on Gonococcal Piliation and Attachment to Human Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2445–2448 (1990)
30. Griffin PM & Tauxe R V: The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**, 60–98 (1991)
31. Gui Z, Wang H, Ting D, Zhu W, Xiyi Z & Chu W: Azithromycin Reduces the Production of  $\alpha$ -hemolysin and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Indian J Microbiol* **54**, 114–117 (2014)
32. Hagel S, Epple H, Feurle GE, Kern W V, Lynen Jansen P, Malfertheiner P, Marth T, Meyer E, Mielke M & Andreas K: S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple. *Z Gastroenterol* **53**, 418–459 (2015)
33. Hall-Stoodley L, Costerton J & Stoodley P: Bacterial Biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
34. Hickey CA, Beattie TJ, Cowieson J, Miyashita Y, Strife CF, Frem JC, Peterson JM, Butani L, Jones DP, Havens PL, Patel HP, Wong CS, Andreoli SP, Rothbaum RJ, Beck AM & Tarr PI: Early volume expansion during diarrhea and relative nephroprotection during subsequent hemolytic uremic syndrome. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **165**, 884–9 (2011)
35. Hicks S, Candy DCA & Phillips AAD: Adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli* to Pediatric Intestinal Mucosa In Vitro. *Infect. Immun.* **64**, 4751–4760 (1996)
36. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Krogh Johansen H, Givskov M & Høiby N: Azithromycin Blocks Quorum Sensing and Alginate Polymer Formation and Increases the Sensitivity to Serum and Stationary-Growth-

- Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa* and Attenuates Chronic *P. aeruginosa* Lung Infection in Cfr<sup>-/-</sup> Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3677–3687 (2007)
37. Jelić D & Antolović R: From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **5**, 29 (2016)
  38. Jensen C, Schiellerup P, Olsen KEP, Scheutz F, Petersen E, Gerner-Smidt P, Mølbak K, Gerner P & Mølbak K: Scandinavian Journal of Infectious Diseases Antimicrobial treatment of asymptomatic carriers of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: An empiric study. *Scand. J. Infect. Dis.* **37**, 61–63 (2005)
  39. Johnson JR: Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 80–128 (1991)
  40. Johnson TJ & Nolan LK: Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 750–774 (2009)
  41. Kaplan BS, Chesney RW & Drummond KN: Hemolytic Uremic Syndrome in Families. *N. Engl. J. Med.* **292**, 1090–1093 (1975)
  42. Karch H: The Role of Virulence Factors in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) - Associated Hemolytic-Uremic Syndrome. *Semin. Thromb. Hemost.* **27**, 207–214 (2001)
  43. Karmali MA: Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**, 15–38 (1989)
  44. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K & Kaper JB: Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4930–4940 (2003)
  45. Kimmitt PT, Harwood CR & Barer MR: Toxin Gene Expression by Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 458–465 (2000)
  46. Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Rohde H, Kaulfers P-M & Mack D: Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 683–7 (2002)
  47. Knobloch JK-M, Niemann S, Kohl TA, Lindner U, Nitschke M, Sayk F & Solbach W: Whole-Genome Sequencing for Risk Assessment of Long-term Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 732–733 (2014)

48. Kochen M, Kaduszkiewicz H & Scherer M: S1-Leitlinie EHEC / HUS. (2011)  
doi:10.1056/NEJMc1100859
49. Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H & Pulverer G: *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Auflage, 303-310, München, Urban & Fischer, 2001
50. Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H & Pulverer G: *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Auflage, 228, München, Urban & Fischer, 2001
51. Konowalchuk J, Speirs JI & Stavric S: Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**, 775–779 (1977)
52. Kuehne A, Bouwknegt M, Havelaar A, Gilsdorf A, Hoyer P, Stark K & Werber D: Estimating true incidence of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* illness in Germany based on notification data of haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol. Infect.* **144**, 3305–3315 (2016)
53. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970)
54. Lapeyraque A-L, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, Boppel T, Kirschfink M, Oualha M, Proulx F, Clermont M-J, Le Deist F, Niaudet P & Schaefer F: Eculizumab in Severe Shiga-Toxin–Associated HUS. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2561–2563 (2011)
55. Leo JC & Goldman A: The immunoglobulin-binding Eib proteins from *Escherichia coli* are receptors for IgG Fc. *Mol. Immunol.* **46**, 1860–1866 (2009)
56. Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, De Grandis S & Karmali M: Glycolipid Binding of Purified and Recombinant *Escherichia coli* Produced Verotoxin in Vitro. *J. OP Biol. Chem.* **262**, 8834–8839 (1987)
57. Linke D, Riess T, Autenrieth IB, Lupas A & Kempf VAJ: Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.* **14**, 264–70 (2006)
58. Lu Y, Iyoda S, Satou H, Satou H, Itoh K, Saitoh T & Watanabe H: A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **74**, 5747–5755 (2006)
59. Madigan M, Martinko JM, Stahl DA & Clark DP: *Brock Mikrobiologie*. 13. Auflage, 1537-1539, München, Pearson, 2013
60. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA & Clark DP: *Brock Mikrobiologie*. 13. Auflage, 986-991, München, Pearson, 2013
61. Maleki F, Khosravi A, Nasser A, Taghinejad H & Azizian M: Bacterial Heat Shock

- Protein Activity. *J. Clin. Diagn. Res.* **10**, 1–3 (2016)
62. Maroeska D, Te Loo WM, Van Hinsbergh VWM, Van Den Heuvel LPWJ & Monnens LAH: Detection of Verocytotoxin Bound to Circulating Polymorphonuclear Leukocytes of Patients with Hemolytic Uremic Syndrome. *J AM Soc Nephrol* **12**, 800–806 (2001)
  63. McGannon CM, Fuller CA & Weiss AA: Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3790–8 (2010)
  64. Mcwilliams BD & Torres AG: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol Spectr.* **2**, 1–19 (2014)
  65. Menne J *et al.*: Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. *BMJ* **345**, e4565 (2012)
  66. Menne J, Kielstein JT, Wenzel U & Stahl RAK: Therapie des typischen hämolytisch-urämischen Syndroms. *Internist* **53**, 1420–1430 (2012)
  67. Merkel V: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG aus Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* – Stämmen. Naturwiss. Diss., Universität Bielefeld, 2013
  68. Merkel V, Ohder B, Bielaszewska M, Zhang W, Fruth A, Menge C, Borrmann E, Middendorf B, Mütling J, Karch H & Mellmann A: Distribution and phylogeny of immunoglobulin-binding protein G in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its association with adherence phenotypes. *Infect. Immun.* **78**, 3625–36 (2010)
  69. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H & Cohen SN: SOS Response Induction by B-Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science.* **305**, 1629–1631 (2004)
  70. Miller MB & Bassler BL: Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–199 (2001)
  71. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM & Giannella RA: Attaching and Effacing Activities of Rabbit and Human Enteropathogenic *Escherichia coli* in Pig and Rabbit Intestines. *Infect. Immun.* **41**, 1340–1351 (1983)
  72. Morin N, Tirling C, Ivison SM, Kaur AP, Nataro JP & Steiner TS: Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 344–55 (2010)
  73. Müller D, Holle J., Jordans I, Lange-Sperandio B, Mache C, Mockenhaupt C, Oh J,

- Pape L, Schaefer F, Vester U & Weber LT: S2k-Leitlinie: Hämolytisch-urämisches Syndrom im Kindesalter. (2016) Available at: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/166-0021\\_S2k\\_Haemolytisch-Uraemisches-Syndrom\\_2016-11\\_1.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/166-0021_S2k_Haemolytisch-Uraemisches-Syndrom_2016-11_1.pdf). (Accessed: 2nd April 2017)
74. Nalca Y, Jänsch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J & Häussler S: Quorum-Sensing Antagonistic Activities of Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a Global Approach. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1680–1688 (2006)
  75. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC & Levine MM: Aggregative Adherence Fimbriae I of Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediate Adherence to HEp-2 Cells and Hemagglutination of Human Erythrocytes. *Infect. Immun.* 2297–2304 (1992)
  76. Nataro JP & Kaper JB: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–201 (1998)
  77. Nataro JP, Yikang D, Yingkang D & Walker K: AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 4691–9 (1994)
  78. Navarro-Garcia F: *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–19 (2014)
  79. Nitschke M, Sayk F, Härtel C, Roseland RT, Hauswaldt S, Steinhoff J, Fellermann K, Derad I, Wellhöner P, Büning J, Tiemer B, Katalinic A, Rupp J, Lehnert H, Solbach W & Knobloch JK-M: Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* **307**, 1046–52 (2012)
  80. Nitschke M, Sayk F, Härtel C, Roseland RT, Hauswaldt S, Steinhoff J, Fellermann K, Derad I, Wellhöner P, Büning J, Tiemer B, Katalinic A, Rupp J, Lehnert H, Solbach W & Knobloch JK-M: Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA* **307**, 1046–52 (2012)
  81. O'Brien A, Newland J, Miller S, Holmes R, Smith H & Formal S: Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science.* **226**, 694–696 (1984)
  82. O'Brien AD & Holmes RK: Shiga and Shiga-Like Toxins. *Microbiol. Rev.* **51**, 206–220 (1987)

83. Ohara T, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Gondaira F, Tamura Y, Gejyo F, Zhang H-M & Yamamoto T: Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3478–83 (2002)
84. Okhuysen PC & DuPont HL: Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. *J. Infect. Dis.* **202**, 503–505 (2010)
85. Panos GZ, Betsi GI & Falagas ME: Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**, 731–742 (2006)
86. Paton J & Paton A: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 450–479 (1998)
87. Pedersen MG, Hansen C, Riise E, Persson S & Olsen KEP: Subtype-specific suppression of Shiga toxin 2 released from *Escherichia coli* upon exposure to protein synthesis inhibitors. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2987–91 (2008)
88. Peters DH, Friedel HA & McTavish D: Azithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* **44**, 750–99 (1992)
89. pfizermed.de: Zithromax® 250/500mg Filmtabletten. Available at: <https://www.pfizermed.de/medikamente/medikamente-a-bis-z/zithromax.htm>. (Accessed: 10th March 2017)
90. Phillips AD, Giron J, Hicks S, Dougan G & Frankel G: Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology* **146**, 1333–1344 (2000)
91. Pulvertaft R: The effect of antibiotics on growing cultures in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol* **64**, 75–89 (1952)
92. Rachid S, Cho S, Ohlsen K, Hacker J & Ziebuhr W: Induction of *Staphylococcus Epidermidis* Biofilm Formation by Environmental Factors: The Possible Involvement of the Alternative Transcription Factor SigB. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**, 159–166 (2002)
93. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker JR & Ziebuhr W: Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3357–3363 (2000)
94. Rasko DA *et al.*: Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–

- Uremic Syndrome in Germany. *N Engl J Med.* **365**, 709–717 (2011)
95. Robert-Koch-Institut: Virulenz Shigatoxin-produzierender *E.coli* (STEC) O157 im Vergleich zu STEC anderer Serogruppen. *Epidemiol. Bull.* **50**, 506–511 (2013)
  96. Robert-Koch-Institut: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. (2011) Available at: [http://edoc.rki.de/documents/rki\\_ab/reeFNxULvsdZo/PDF/262b4Pk2TGGs.pdf](http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/reeFNxULvsdZo/PDF/262b4Pk2TGGs.pdf). (Accessed: 19th January 2017)
  97. Rohde H *et al.*: Open-Source Genomic Analysis of Shiga-Toxin-Producing *E. coli* O104:H4. *N. Engl. J. Med.* **365**, 718–724 (2011)
  98. Rowlett VW, Mallampalli VKPS, Karlstaedt A, Dowhan W, Taegtmeier H, Margolin W & Vitrac H: The impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function 1. *J. Bacteriol.* (2017) doi:10.1128/JB.00849-16
  99. Russell A: Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 794–803 (2003)
  100. Safdar N, Said A, Gangnon RE & Maki DG: Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis. *JAMA* **288**, 996–1001 (2002)
  101. Salehzadeh A, Zamani H, Langeroudi MK & Mirzaie A: Molecular typing of nosocomial *Staphylococcus aureus* strains associated to biofilm based on the coagulase and protein A gene polymorphisms. *Iran J Basic Med Sci* **19**, 1325–1330 (2016)
  102. Salit IE: Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobials on meningococcal adherence. *Can. J. Microbiol.* **29**, 369–76 (1983)
  103. Sandt CH, Wang YD, Wilson RA & Hill CW: *Escherichia coli* strains with nonimmune immunoglobulin-binding activity. *Infect. Immun.* **65**, 4572–9 (1997)
  104. Sandvig K & van Deurs B: Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* **76**, 949–966 (1996)
  105. Scheffers D-J & Pinho MG: Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 585–607 (2005)
  106. Schütze S: Die Interaktion von Azithromycin mit Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* von Dauerausscheidern. Masterarbeit, Universität zu Lübeck, 2014
  107. Shen Y-M: Clinical evaluation of thrombotic microangiopathy: identification of

- patients with suspected atypical hemolytic uremic syndrome. *Thromb. J.* **14**, 19 (2016)
108. Shibl AM: Effect of antibiotics on production of enzymes and toxins by microorganisms. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 865–75 (1983)
  109. Shyrock T, Mortensen J & Baumholtz M: The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 505–512 (1998)
  110. Sofer D, Gilboa-Garber N, Belz A & Garber NC: ‘Subinhibitory’ Erythromycin Represses Production of *Pseudomonas aeruginosa* Lectins, Autoinducer and Virulence Factors. *Microbiol. Chemother.* **45**, 335–341 (1999)
  111. Ståhl A-L, Sartz L & Karpman D: Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood* **117**, 5503–5513 (2011)
  112. Stephens DS, Krebs JW & Mcgee23 ZA: Loss of Pili and Decreased Attachment to Human Cells by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* Exposed to Subinhibitory Concentrations of Antibiotics. *Infect. Immun.* **46**, 507–513 (1984)
  113. Stinson MW & Merrick JM: Extracellular Enzyme Secretion by *Pseudomonas lemoignei*. *J. Bacteriol.* **119**, 152–161 (1974)
  114. Stricker J, Maddox P, Salmon ED, Erickson HP & Mcintosh JR: Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3171–3175 (2002)
  115. Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK & O’Brien AD: Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **53**, 135–40 (1986)
  116. Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann S & Schulz T: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 228-237. (Springer-Verlag, 2016)
  117. Tarr PI, Gordon CA & Chandler WL: Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **365**, 1073–1086 (2005)
  118. Tateda K, Comte R, Pechere J-C, Hler TK, Yamaguchi K & Christian A: Azithromycin Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **45**, 1930–1933 (2001)
  119. Tesh VL & O’Brien AD: The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol. Microbiol.* **5**, 1817–1822 (1991)

120. Torres-Barceló C, Kojadinovic M, Moxon R & MacLean RC: The SOS response increases bacterial fitness, but not evolvability, under a sublethal dose of antibiotic. *Proceedings. Biol. Sci.* **282**, 20150885 (2015)
121. Unkmeir A & Schmidt H: Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* **68**, 4856–64 (2000)
122. Vogeleer P, Tremblay YDN, Mafu AA, Jacques M, Harel J, Faucher SP, Mason K & Kappler U: Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. (2014) doi:10.3389/fmicb.2014.00317
123. Vonberg RP *et al.*: Duration of Fecal Shedding of Shiga Toxin– Producing *Escherichia coli* O104:H4 in Patients Infected During the 2011 Outbreak in Germany: A Multicenter Study. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1132–1140 (2013)
124. WHO: *E. coli*. (2016) Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>. (Accessed: 9th March 2017)
125. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL & Tarr PI: The Risk of the Hemolytic–Uremic Syndrome after Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1930–1936 (2000)
126. Wood TK: Insights on *Escherichia coli* Biofilm Formation and Inhibition from Whole-Transcriptome Profiling Biofilm formation. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01768.x
127. Yadavalli SS, Carey JN, Leibman RS, Chen AI, Stern AM, Roggiani M, Lippa AM & Goulian M: Antimicrobial peptides trigger a division block in *Escherichia coli* through stimulation of a signalling system. *Nat. Commun.* **7**, 12340 (2016)
128. Yamamoto T, Endo S, Yokota T & Echeverria P: Characteristics of Adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli* to Human and Animal Mucosa. *Infect. Immun.* **59**, 3722–3739 (1991)
129. Yamasaki T, Ichimiya T, Hirai K, Hiramatsu K & Nasu M: Effect of Antimicrobial Agents on the Piliation of *Pseudomonas aeruginosa* and Adherence to Mouse Tracheal Epithelium. *J. Chemother.* **9**, 32–37 (1997)
130. Yoh M, Frimpong EK, Voravuthikunchai SP & Honda T: Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Can. J. Microbiol.* **45**, 732–9 (1999)
131. Zhang Q, Donohue-Rolfe A, Krautz-Peterson G, Sevo M, Parry N, Abeijon C &

- Tzipori S: Gnotobiotic Piglet Infection Model for Evaluating the Safe Use of Antibiotics against *Escherichia coli* O157:H7 Infection. *J Infect Dis.* **199**, 486–493 (2009)
132. Zingler G, Ott M, Blum G, Falkenhagen U, Naumann G, Sokolowska-Köhler W & Hacker J: Clonal analysis of *Escherichia coli* serotype O6 strains from urinary tract infections. *Microb. Pathog.* **12**, 299–310 (1992)
133. RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - EHEC-Erkrankung. Available at: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_EHEC.html#doc2374530bodyText1](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html#doc2374530bodyText1). (Accessed: 9th March 2017)
134. ALEXION Soliris 300 mg. (2015) Available at: <http://www.fachinfo.de/pdf/010559>. (Accessed: 3rd April 2017)
135. RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - EHEC-Erkrankung. Available at: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_EHEC.html#doc2374530bodyText1](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html#doc2374530bodyText1). (Accessed: 7th March 2017)

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

<b>AAF</b>	Aggregative Adhärenzfimbrien
<b><i>A. dest</i></b>	<i>Aqua destillata</i>
<b><i>A. bide</i></b>	<i>Aqua bidestillata</i>
<b>A/E-Läsion</b>	<i>Attaching and effacing lesion</i>
<b>Ag43</b>	Antigen 43
<b>AWMF</b>	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
<b>BFP</b>	<i>Bundle forming pilus</i>
<b>bspw.</b>	beispielsweise
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CFA</b>	<i>Colonisation factor antigens</i>
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>CLAP</b>	<i>Chain like adherence pattern</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COS</b>	Columbia-Blutagar + 5 % Schafsblut
<b>DEGAM</b>	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>D+HUS</b>	Durchfallassoziertes hämolytisch-urämisches Syndrom
<b>E-Test</b>	Epsilometer-Test
<b><i>eae</i></b>	<i>Escherichia coli attaching and effacing</i>
<b>EAEC</b>	Enter aggregativer <i>Escherichia coli</i>
<b>EAST</b>	Hitzestabiles Toxin von Enter aggregativen <i>Escherichia coli</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EHEC</b>	Enterohämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>
<b>Eib</b>	<i>Escherichia coli immunoglobulin-binding protein</i>
<b>EIEC</b>	Enteroinvasiver <i>Escherichia coli</i>
<b>EPEC</b>	Enteropathogener <i>Escherichia coli</i>
<b>EPS</b>	<i>Extracellular polymeric substances</i>

<b>ESBL</b>	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
<b>ETEC</b>	Enterotoxischer <i>Escherichia coli</i>
<b>E<sub><math>\lambda</math></sub></b>	Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda$
<b>F-Antigen</b>	Fimbrien-Antigen
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystallisable</i> , Teil des Immunglobulins
<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i>
<b>H-Antigen</b>	Flagellares Protein
<b>H<sup>-</sup></b>	Fehlendes flagellares Protein
<b>Hnt</b>	Nicht typisierbares flagellares Protein
<b>HC</b>	Hämorrhagische Colitis
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HEp2-Zellen</b>	Humane Epitheliumzellen Typ 2
<b>HRP</b>	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
<b>HUS</b>	Hämolytisch-urämisches Syndrom
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>K-Antigen</b>	Kapselantigen
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LEE</b>	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LT</b>	Hitzelabiles Enterotoxin von Enterotoxischen <i>Escherichia coli</i>
<b>MAC</b>	<i>Membrane Attack Complex</i>
<b>MCK</b>	Mac Conkey-Agar
<b>MHE</b>	Müller Hinton E-Agar
<b>MHK</b>	Minimale Hemmkonzentration
<b>n</b>	Anzahl
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Natriumhydrogenphosphat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>O-Antigen</b>	Variable O-spezifische Seitenkette des Lipopolysaccharids
<b>OD</b>	Optische Dichte

<b>p</b>	Wahrscheinlichkeit
<b>pAA</b>	<i>Aggregative adherence plasmid</i>
<b>PBP3</b>	<i>penicillin binding protein 3</i>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PBS-T</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung-Tween
<b>PGA</b>	$\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glycosamin-Polymere
<b>QSI</b>	<i>quorum sensing inhibitor</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SPATE</b>	<i>Serine protease autotransporters toxins of Enterobacteriaceae</i>
<b>spp.</b>	<i>Species pluralis</i>
<b>ST</b>	Hitzestabiles Enterotoxin von Enterotoxischen <i>Escherichia coli</i>
<b>STEAEC</b>	Shigatoxin produzierender enteroaggregativer <i>Escherichia coli</i>
<b>STEC</b>	Shigatoxin produzierender <i>Escherichia coli</i>
<b>STEC-HUS</b>	Typisches hämolytisch-urämisches Syndrom
<b>Stx</b>	Shigatoxin
<b>TAA</b>	Trimere Autotransporter Adhäsine
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Salzlösung
<b>TBS-T</b>	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
<b>t-RNA</b>	Transfer-Ribonukleinsäure
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>UKSH</b>	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b><math>\alpha</math></b>	Signifikanzniveau
<b><math>\lambda</math></b>	Wellenlänge

## 8.2. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Seropathotypen von Shigatoxin produzierenden <i>E. coli</i> nach Karmali <i>et al.</i> , 2003 .....	10
<b>Tabelle 2:</b> In der Arbeit verwendete STEC-Stämme .....	17-18
<b>Tabelle 3:</b> In der Arbeit verwendete Antikörper.....	19
<b>Tabelle 4:</b> In der Arbeit verwendete Kits .....	19
<b>Tabelle 5:</b> In der Arbeit verwendete Nährmedien und Agarplatten .....	19-20
<b>Tabelle 6:</b> In der Arbeit verwendete Antibiotika.....	20
<b>Tabelle 7:</b> In der Arbeit verwendete Lösungen und Puffer .....	20-21
<b>Tabelle 8:</b> In der Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	21-22
<b>Tabelle 9:</b> In der Arbeit verwendete Verbrauchs- und Hilfsmaterialien .....	23
<b>Tabelle 10:</b> In der Arbeit verwendete Geräte und Hardware.....	24-25
<b>Tabelle 11:</b> In der Arbeit verwendete Software.....	25
<b>Tabelle 12:</b> Minimale Hemmkonzentration von Azithromycin.....	35
<b>Tabelle 13:</b> Densitometrische Messung von EibG-Banden zum Vergleich von zwei Proteinextraktionsmethoden .....	50
<b>Tabelle 14:</b> Serotypen und Phänotypen der untersuchten STEC-Stämme .....	51
<b>Tabelle 15:</b> Densitometrisch ermittelte Signalstärke der EibG-Banden im Western Blot von DA07, DA24 und DA26 nach 5,5 h und 24 h .....	52
<b>Tabelle 16:</b> Signalstärken der EibG- und DnaK-Banden im Western Blot von DA26 .....	54
<b>Tabelle 17:</b> Signalstärken der EibG- und DnaK-Banden im Western Blot von DA24 .....	56
<b>Tabelle 18:</b> Signalstärken der EibG- und DnaK-Banden im Western Blot von DA07 .....	57
<b>Anhang Tabelle 19:</b> Zusammenfassung Ergebnisse .....	88

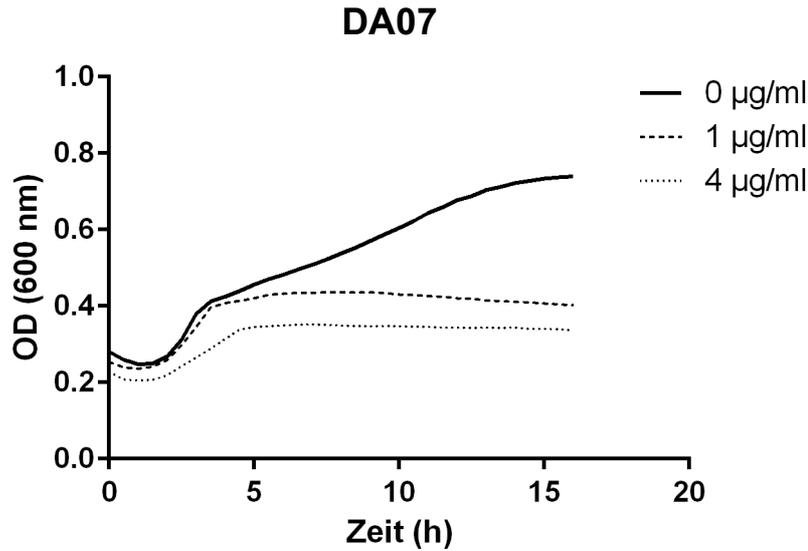
### 8.3. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Epsilometertest.....	27
<b>Abbildung 2:</b> Wachstumskurve von DA02 .....	37
<b>Abbildung 3:</b> Wachstumskurven von DA02 unter Azithromycin.....	38
<b>Abbildung 4:</b> Biofilmbildung der STEC-Stämme im Biofilmassay .....	39
<b>Abbildung 5:</b> Biofilmassay unter Azithromycin bei den Stämmen DA07, DA24, DA25, DA26, DA29, ST24 .....	41
<b>Abbildung 6:</b> Adhärenzmuster von STEC im Zellkulturassay.....	43
<b>Abbildung 7:</b> Zellkulturassay von ST24 mit 0 µg/ml und 4 µg/ml Azithromycin .....	44
<b>Abbildung 8:</b> Auflösung des CLAP-Adhärenzmusters unter Azithromycin im Zellkulturassay.....	45
<b>Abbildung 9:</b> Quantitative Auswertung des Zellkulturassays mit 16 Bildern gegenüber 8 Bildern anhand von DA01 und DA07 .....	47
<b>Abbildung 10:</b> Zellkulturassay unter Azithromycin bei DA01, DA02, DA07, DA11 und DA18 .....	49
<b>Abbildung 11:</b> Detektion von EibG im Western Blot nach 5,5 h und 24 h .....	52
<b>Abbildung 12:</b> Detektion von EibG und DnaK bei DA26 .....	54
<b>Abbildung 13:</b> Detektion von EibG und DnaK bei DA24 .....	55
<b>Abbildung 14:</b> Detektion von EibG und DnaK bei DA07 .....	57
<b>Anhang Abbildung 15:</b> Wachstumskurven von DA07 unter Azithromycin .....	89
<b>Anhang Abbildung 16:</b> Wachstumskurven von DA08 unter Azithromycin .....	89
<b>Anhang Abbildung 17:</b> Wachstumskurven von DA09 unter Azithromycin .....	90

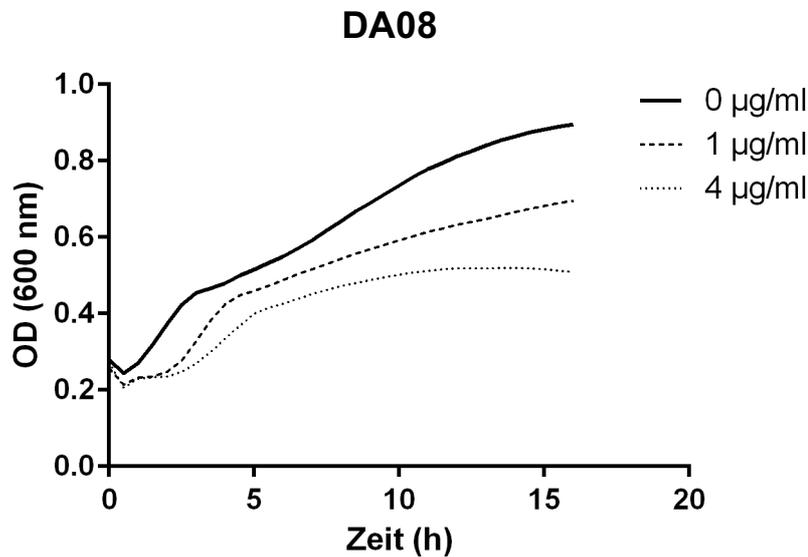
## 8.4. Anhang

Stamm	Serotyp	MHK	Biofilm	Biofilm-Red.	Adhäsionstyp	Adhäsionsred.	EibG
DA01	O26:H11	24 µg/ml	schwach	n.d.	kettenförmig	0,5 µg/ml	n.d.
DA02	O16:H21	32 µg/ml	schwach	n.d.	diffus	0,5 µg/ml	n.d.
DA07	O91:H14	16 µg/ml	stark	2 µg/ml	kettenförmig	1 µg/ml	positiv
DA08	O91:H14	24 µg/ml	n.d.	n.d.	kettenförmig	n.d.	positiv
DA09	O91:H14	16 µg/ml	n.d.	n.d.	kettenförmig	n.d.	positiv
DA11	O181:H49	24 µg/ml	negativ	n.d.	diffus	1 µg/ml	n.d.
DA18	O174:H21	16 µg/ml	schwach	n.d.	diffus	0,5 µg/ml	negativ
DA24	O91:H14	24 µg/ml	stark	3 µg/ml	kettenförmig	n.d.	positiv
DA25	O102:H2/ H25/H11	32 µg/ml	stark	1 µg/ml	diffus	n.d.	n.d.
DA26	O91:H14	32 µg/ml	stark	2 µg/ml	kettenförmig	n.d.	positiv
DA29	O146:H28	24 µg/ml	stark	2 µg/ml	diffus	n.d.	n.d.
ST24	O156:H25	24 µg/ml	stark	2 µg/ml	diffus	n.d.	n.d.

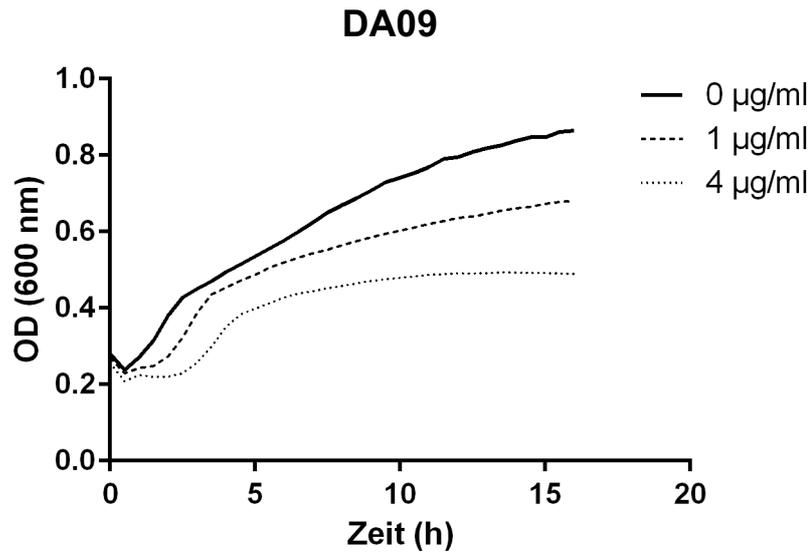
**Anhang Tabelle 19: Zusammenfassung Ergebnisse.** In der Tabelle sind die untersuchten STEC-Stämme, die Serotypen und die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche zusammengefasst. **MHK:** Minimale Hemmkonzentration von Azithromycin im E-Test, **Biofilm:** Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms im Biofilmmassay, **Biofilm-Red:** Azithromycin-konzentration, ab welcher die Biofilmbildung im Biofilmmassay signifikant reduziert ist, **Adhäsionstyp:** Adhärenzmuster an HEp2-Zellen im Zellkulturassay, **Adhäsionsred.:** Azithromycinkonzentration, ab welcher das Bakterien/HEp2-Zell-Verhältnis im Zellkulturassay signifikant reduziert ist, **EibG:** Detektion von EibG im Western Blot. n.d.= nicht durchgeführt.



**Anhang Abbildung 15: Wachstumskurven von DA07 unter Azithromycin.** Dargestellt sind die Wachstumskurven als Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte (OD (600 nm)) von DA07 mit 0 µg/ml (durchgezogene Kurve), 1 µg/ml (gestrichelte Kurve) und 4 µg/ml (gepunktete Kurve) Azithromycin über 16 h. In der nativen Wachstumskurve (0 µg/ml) lassen sich die bakteriellen Wachstumsphasen wie folgt erkennen: Latenzphase 0-2 h, exponentielle Phase 2-4 h, stationäre Phase ab 4 h. Die Wachstumskurven mit 0 µg/ml und 1 µg/ml sind in den ersten 4 h dicht beieinander, anschließend zeigt die Wachstumskurve mit 0 µg/ml ein stärkeres Wachstum. Die Wachstumskurve mit 4 µg/ml Azithromycin zeigt durchgehend niedrigere Absorptionswerte als die beiden anderen. Der Beginn der exponentiellen und stationären Phase ist um jeweils ca. 1 h verzögert. Jeweils n=3.



**Anhang Abbildung 16: Wachstumskurven von DA08 unter Azithromycin.** Dargestellt sind die Wachstumskurven als Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte (OD (600 nm)) von DA08 mit 0 µg/ml (durchgezogene Kurve), 1 µg/ml (gestrichelte Kurve) und 4 µg/ml (gepunktete Kurve) Azithromycin über 16 h. In der nativen Wachstumskurve (0 µg/ml) lassen sich die bakteriellen Wachstumsphasen wie folgt erkennen: Latenzphase 0-1 h, exponentielle Phase 1-3 h, stationäre Phase ab 3 h. Die Wachstumskurven mit 1 µg/ml zeigt im Vergleich zur Nativkurve ab der exponentiellen Phase reduzierte Adsorptionswerte sowie eine zeitliche Verzögerung der exponentiellen und stationären Phase um jeweils ca. 1 h. Die Wachstumskurve mit 4 µg/ml ist ab der exponentiellen Phase gegenüber 1 µg/ml weiter abgeflacht und die exponentielle und stationäre Phase ist jeweils wiederum um ca. 1 h verzögert. Jeweils n=3.



**Anhang Abbildung 17: Wachstumskurven von DA09 unter Azithromycin.** Dargestellt sind die Wachstumskurven als Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte (OD (600 nm)) von DA09 mit 0 µg/ml (durchgezogene Kurve), 1 µg/ml (gestrichelte Kurve) und 4 µg/ml (gepunktete Kurve) Azithromycin über 16 h. In der nativen Wachstumskurve (0 µg/ml) lassen sich die bakteriellen Wachstumsphasen wie folgt erkennen: Latenzphase 0-1 h, exponentielle Phase 1-3 h, stationäre Phase ab 3 h. Die Wachstumskurven mit 1 µg/ml und 4 µg/ml zeigen ab der exponentiellen Phase geringere Adsorptionswerte als die Wachstumskurve mit 0 µg/ml, bei 4 µg/ml ist dies stärker ausgeprägt als bei 1 µg/ml Azithromycin. Der Beginn der exponentiellen und stationären Wachstumsphase ist im Vergleich zur Nativkurve um jeweils 1 h (1 µg/ml) bzw. 2 h (4 µg/ml) verzögert. Jeweils n=3.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. J. Knobloch für das Überlassen dieses Themas und die Betreuung während der Anfertigung der Arbeit danken. Ganz besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir über diesen langen Zeitraum mit viel Engagement beiseite stand und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Des Weiteren danke ich der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie des UKSH Lübeck, dem Klinikdirektor Prof. Dr. J. Rupp und seinem Vorgänger Prof. Dr. W. Solbach dafür, dass ich meine experimentelle Arbeit in diesem Labor durchführen durfte. Zudem danke ich der AG Rupp für das Bereitstellen der HEp2-Zellkulturen.

Ich bedanke mich bei der Universität zu Lübeck für die Förderung durch das Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“.

Ich möchte mich ebenso bei meiner Arbeitsgruppe, vor allem bei S. Kreißig, J. Bimschas und K. Bäsler, für die Einarbeitung und Hilfestellung während der Laborarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner wundervollen Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer begleitet und mir meinen Weg ermöglicht haben. Zu guter Letzt möchte ich meinem Ehemann von ganzem Herzen für seine liebevolle und verständnisvolle Unterstützung danken!

## 10. Lebenslauf



### **Zur Person:**

Name: Leonie Dräger, geb. Schmidt  
Geboren: 1992 in Freiburg im Breisgau

### **Hochschulstudium:**

10/2011-11/2018: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
12/2018: Approbation als Ärztin

### **Zeitraum der Dissertation:**

2015-2019: Promotionsarbeit an der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie des UKSH Campus Lübeck  
2015: Förderung durch das Promotionsstipendium „Lübecker Exzellenzmedizin“