

**Bedeutung der  
Lipopolysaccharidstrukturen bei  
pathogenen *Vibrio cholerae* Stämmen  
für die Ausbildung von Cholera und  
Abgrenzung zu Umweltisolaten**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefan Schild

aus Ingolstadt

Würzburg, 2005

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

## Danksagung

Ein großes Dankeschön an alle die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dies gilt insbesondere für die alten Kollegen des Instituts für molekulare Infektionsbiologie bzw. des Zentrums für Infektionsforschung. Danke für zwei wunderbare Jahre. Ich denke besonders gerne an die Zeiten im Sommer bei 35°C und verplombten Fenstern zurück, wenn ich jetzt morgens in ein wohltemperiertes Labor komme. Ein großer Dank natürlich auch an unsere neue Heimat, dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie. Dank dem herzlichen Willkommen und der Hilfsbereitschaft haben wir schneller als erwartet Fuß gefasst und nahezu ohne Unterbrechung weiter an unseren Projekten arbeiten können. Vielen Dank an die AG Unkmeier, inklusive der inzwischen ausgelagerten Mikroarray-Station, für die tolle Zeit im Labor 305.

Ein großer Dank an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Reidl: Zum einen die alten Laborhasen „Stöhn“-Elli und „Bin die Ruhe selbst“-Melisa aus den Röntgenring-Zeiten. Danke Melisa, für so manche Tips und Vorschläge zu meinen Versuchen (auch wenn ich's dann meist doch anders gemacht habe). Zum anderen aber auch den neuen Laborküken „Haha“-Anja, „Schubidu“-Gabi und „Mein Auto!“-Dodo. Ein „special thanks“ geht an Anja für die unglaubliche Toleranz meiner Stimmungsschwankungen, für schallendes Gelächter zu jeder Zeit (aber nicht vor 10 Uhr) und die Korrektur dieser Arbeit. Keine leichte Aufgabe, wenn ich an meine Noten in Deutsch zurückdenke. Dann gibt's noch unsere TA: Karina auch Anna, früher Hilpert jetzt Lamprecht, manchmal mit b, meist aber mit p geschrieben. Erst war sie da, dann dick, dann weg und jetzt ist sie wieder da, aber irgendwie nur halb. Vielen Dank für die Unterstützung bei den Massenansätzen und allen Versuchen, die mir über den Kopf gewachsen sind. Vielen Dank an unsere Kuchen- und Schokoladenmitbringfraktion, wegen Euch habe ich jetzt einen Waschbärbauch.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Joachim Reidl für seine engagierte Betreuung, die großartige Unterstützung, die Chance eigene Ideen zu verwirklichen und die aufbauenden Worte in so mancher Durststrecke.

Herrn Prof. G. Krohne danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und den Vorschlag meiner Person für ein Stipendium bei der Studienstiftung.

Danke an meine Verlobte Kristina dafür, dass sie immer für mich da war.

Abschließend danke ich meinen Freunden, Verwandten und Eltern für die Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>I Summary .....</b>	<b>4</b>
<b>II Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1. Das Bakterium <i>Vibrio cholerae</i> .....	7
1.1. Allgemeine Informationen .....	7
1.2. <i>V. cholerae</i> in der Umwelt .....	9
1.3. Die Krankheit Cholera .....	10
2. Molekularbiologische Grundlagen der Virulenzfaktoren .....	12
3. Die Außenmembran .....	15
4. Das Lipopolysaccharid der Gram <sup>-</sup> Bakterien .....	18
4.1. Aufbau, Biosynthese und Funktion .....	18
4.2. Das LPS von <i>V. cholerae</i> .....	24
5. Osmotischer Stress und Osmoadaptation .....	27
6. Zielsetzung der Arbeit .....	29
<b>III Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
1. Antisera, Bakteriophagen, Bakterien, Oligonukleotide und Plasmide .....	31
2. Geräte und Chemikalien .....	42
3. Lösungen, Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen .....	45
4. Mikrobiologische und genetische Methoden .....	52
4.1. Isolierung spontan streptomycinresistenter <i>V. cholerae</i> .....	52
4.2. Konjugation .....	52
4.3. Transformation .....	53
4.4. Stammkonstruktionen .....	54
4.4.1. Inaktivierung eines Gens durch Insertion .....	54
4.4.2. Inaktivierung eines Gens durch Deletion .....	55
4.4.3. Deletion mehrerer Gene bzw. Gencluster .....	56
4.5. Herstellung von Phagenlysaten .....	57
4.6. Phagenplaque-Studien .....	57
4.7. MHK- und MBK-Bestimmungen .....	58
5. Molekularbiologische Methoden .....	59
5.1. Präparation von Plasmid-DNA .....	59
5.2. Präparation von chromosomaler DNA .....	59
5.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese .....	60
5.4. Southern Blot .....	60
5.5. Restriktionsverdau und Ligation .....	61
5.6. PCR .....	61
5.7. DNA-Sequenzierung .....	62

5.8. Plasmidkonstruktionen .....	62
5.8.1. Plasmide zur Konstruktion von Insertionsmutanten (pGP704-Derivate) .....	62
5.8.2. Plasmide zur Konstruktion von Deletionsmutanten (pKEK229-Derivate).....	63
5.8.3. Plasmide zur Konstruktion von Gencluster-Deletionen.....	64
5.8.4. Expressionsplasmide .....	65
5.8.5. Expressionsplasmide mit His-Tag.....	67
5.8.6. Plasmide für die Transposonmutagenese .....	68
5.9. TnlacZ- und TnphoA-Mutagenese mit pBADwaaL.....	69
5.10. AS-Austausch in WaaL .....	70
6. Biochemische Methoden .....	70
6.1. Präparation von LPS.....	70
6.2. SDS-PAGE.....	71
6.3. Färbung von Proteinen in PAA-Gelen .....	72
6.4. Silberfärbung von LPS in PAA-Gelen .....	72
6.5. Western Blot.....	72
6.6. Präparation von Außenmembranproteinen.....	74
6.7. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	74
6.8. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität .....	75
6.9. Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag.....	76
6.10. In vitro $^{14}\text{C}$ -Glykosyltransferase-Assay .....	76
6.11. Proteinsequenzierung .....	77
7. Phänotypische Tests .....	77
7.1. Serumresistenztest.....	77
7.2. Resistenz gegenüber Gallensäuren.....	77
7.3. Wachstum unter Salzstress.....	78
7.4. Adhäsion an Mukus.....	78
8. Elektronenmikroskopie .....	78
9. Tierversuche .....	79
10. Computeranalysen.....	80
<b>IV Ergebnisse.....</b>	<b>81</b>
1. Versuch eines Kern OS-/ O Antigen-Austausches bei <i>V. cholerae</i> O1 .....	81
2. Die O1/ O139-spezifischen Gene <i>wavD</i> und <i>wavJ</i> .....	83
2.1. Verbreitung und Funktionsanalyse von WavD und WavJ.....	83
2.2. Phänotypische Charakterisierung von <i>wavD</i> - und <i>wavJ</i> -Mutanten .....	86
3. Charakterisierung der O Antigen-Ligase WaaL von <i>V. cholerae</i> .....	89
3.1. Analyse von <i>wa*</i> -Mutanten hinsichtlich der Anheftung des O Antigens.....	89
3.2. Komplementationsstudien von WaaL <sup>P27459</sup> und WaaL <sup>V194</sup> .....	91
3.3. Charakterisierung der Aktivitäten von WavL und WavM.....	92
3.3.1. WavL aus P27459 .....	92

3.3.2. WavM aus V194.....	96
3.4. Molekulare und funktionale Analyse der O Antigen-Ligase WaaL .....	98
3.4.1. Die Topologie von WaaL.....	98
3.4.2. Komplementationsversuche mit Hybriden aus WaaL <sup>P27459</sup> und WaaL <sup>V194</sup> .....	101
3.4.3. Punktmutanten in WaaL <sup>P27459</sup> und WaaL <sup>SARC6</sup> .....	102
4. Charakterisierung von putativen O Antigen-Transportern bei O1 und O139.....	105
4.2. WbfK von O139 .....	106
4.1. Wzm von O1 .....	108
5. Transposonmutagenese mit pStSchcatpirkan.....	109
5.1. Identifizierung der osmosensitiven Mutante P27459 <i>osmR::TncatpirkanR</i> .....	110
5.2. Charakterisierung des Zwei-Komponentensystems OsmRK.....	110
5.2.1. Wachstum unter Salzstress.....	112
5.2.2. Veränderungen in der Außenmembran .....	114
6. Degradation von HutA unter Salzstress .....	117
<b>V Diskussion.....</b>	<b>119</b>
<b>VI Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>VII Anhang .....</b>	<b>150</b>
1. Abkürzungen .....	150
2. Abbildungen .....	154
3. Erklärungen .....	158
4. Publikationsliste .....	159
5. Lebenslauf.....	160

## I Zusammenfassung

Die gastrointestinale Erkrankung Cholera wird durch das fakultativ humanpathogene, Gram<sup>-</sup> Bakterium *Vibrio cholerae* ausgelöst. Obwohl inzwischen über 200 verschiedene Serogruppen von *V. cholerae* bekannt sind, wurden Ausbrüche der Cholera hauptsächlich von Stämmen der unbekapselten Serogruppe O1 und der bekapselten Serogruppe O139 verursacht. Durch genetische Analysen konnte gezeigt werden, dass die wichtigsten Virulenzfaktoren, wie z. B. das Cholera-toxin (CT) und der Toxin-koregulierte Pilus (TCP), auch bei apathogenen Umweltstämmen zu finden sind. Neben diesen Virulenzfaktoren tragen aber auch die Komponenten des Lipopolysaccharids (LPS) von O1 und O139, sowie die Kapsel von O139 zur Kolonisierung im Gastrointestinaltrakt bei.

Um die Funktion des LPS und der Kapsel als Virulenzfaktor näher zu untersuchen, wurden Adhäsionsstudien mit definierten LPS- und/ oder Kapsel-Mutanten beider pathogener Serogruppen durchgeführt. Dazu wurde die Mukus-produzierende humane Darmzelllinie HT-29-Rev MTX verwendet. Im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (Wt) konnte für eine O Antigen-Mutante von O1 eine Reduktion um 85%, für eine O Antigen/ Kapsel-Mutante von O139 eine Reduktion um 70% in der Adhäsionsrate festgestellt werden. Ein Beitrag von ToxR regulierten Genprodukten ist möglich, da die Adhäsionsrate einer *toxR*-Mutante der Serogruppe O1 etwa dreifach geringer war als beim Wt.

Weiterhin wurden mit *WavJ* und *WavD* zwei Genprodukte der Kernoligosaccharid (Kern OS)-Biosynthese charakterisiert, welche bislang nur in dem *wa\**-Genclustertyp 1 der klinischen Isolate nachgewiesen worden sind. Die Konstruktion der *wavJ*- und/ oder *wavD*-Deletionsmutanten in O1 und O139 erlaubte die Durchführung einer Reihe von phänotypischen Assays. Es konnte gezeigt werden, dass beide Genprodukte an der Biosynthese des Kern OS beteiligt sind, wobei *WavJ* mit hoher Wahrscheinlichkeit die Heptosyl-IV-Transferase darstellt. Die *wavDJ*-Doppelmutanten beider Serogruppen wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Novobiocin auf. Dagegen konnte eine Attenuation der Mutanten im Mausmodell nur für die Serogruppe O139 demonstriert werden.

Ein Schlüsselenzym der LPS-Biosynthese stellt die Oberflächenpolymer:Lipid A-Kern OS-Ligase (*WaaL*), kurz O Antigen-Ligase genannt, dar. Sie katalysiert den Transfer des O Antigens auf den Lipid A/ Kern OS-Komplex auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran (CM). In dieser Arbeit wurden die in der Primärstruktur stark unterschiedlichen Ligasen aus einem pathogenen (P27459) und apathogenen (V194) *V. cholerae* Isolat strukturell und funktionell analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität

beider Ligasen von der Anwesenheit eines N-Acetylglucosamins (GlcNAc) im Kernoligosaccharid abhängig ist. Dieser Zucker wird durch das Genprodukt WavL transferiert, welchem in dieser Arbeit die Aktivität einer N-Acetylglucosaminyltransferase zugeordnet werden konnte. Das Gen *wavL* wurde in allen zur Verfügung stehenden *V. cholerae* Isolaten nachgewiesen und stellt wahrscheinlich eine generelle Voraussetzung des Kern OS für eine O Antigen-Anheftung dar. Im Gegensatz dazu, diskriminiert die An- bzw. Abwesenheit einer Galaktose (Gal) im Kern OS die Spezifität der Ligasen von *V. cholerae* P27459 bzw. V194. Dabei ist die Aktivität der Galaktosyltransferase WavM, essentiell für die Aktivität der Gal-abhängigen Ligase von V194. Die Gal-unabhängige Ligase von P27459 wird hingegen durch die Anwesenheit von Gal im Kern OS inhibiert. Hybridfusionen der beiden Ligasen deuten an, dass die Erkennungsdomäne für Gal in der C-terminalen Hälfte lokalisiert ist. Erstmals wurde die Topologie einer Ligase durch PhoA- und LacZ-Fusionen analysiert. Die Ligase von P27459 besitzt 10 Transmembrandomänen mit 5 periplasmatischen und 4 cytoplasmatischen Schleifen. Die Suche nach konservierten Aminosäuren (AS) in verschiedenen Ligasen führte zur Identifizierung der Motive R(X<sub>3</sub>)L und H(X<sub>10</sub>)G in der dritten bzw. vierten periplasmatischen Schleife. Ein Austausch des Arginins oder des Histidins in diesen Motiven durch Punktmutation führte zum Verlust der Ligase-Aktivität von WaaL aus *V. cholerae* und *S. enterica*. Damit geben diese Motive einen ersten Hinweis auf das aktive Zentrum des Enzyms.

Desweiteren wurde nach möglichen O Antigen-Transportern bei *V. cholerae* gesucht, welche bislang noch nicht identifiziert worden waren. Erste Analysen einer *wzm*-Mutante in O1 und einer *wbfK*-Mutante in O139 zeigten auf, dass O1 mit Wzm und Wzz wahrscheinlich einen ABC-Transporter-abhängigen Mechanismus besitzt, während O139 durch *wbfK* eine putative O Antigen-Flippase des Wzy-abhängigen Synthesewegs kodiert.

Erwiesenermaßen kommen pathogene *V. cholerae* Stämme in der Umwelt vor allem in aquatischen Ökosystemen vor. Jedoch ist über die Anpassungen von *V. cholerae* an diesen ökologischen Bereich, insbesondere hinsichtlich der wechselnden Osmolarität, nahezu nichts bekannt. Durch ein in dieser Arbeit konstruiertes und etabliertes Transposonsystem konnten 3600 Mutanten erzeugt und auf Wachstumsdefekte unter hypertonen Bedingungen untersucht werden. Eine dieser osmosensitiven Transposonmutanten wies eine Insertion in dem Locus VCA0565 auf, welcher für eine putative Sensor-Histidinkinase kodiert. Mit dem Regulator, kodiert durch VCA0566, stellt VCA0565 das putative Zwei-Komponentensystem OsmRK dar. Transkriptomanalysen von *osmR/ K*-Mutanten lieferten keine Erklärung des



Wachstumsdefekts unter hypertonen Bedingungen, zeigten aber eine Vernetzung der durch OsmR/ K regulierten Gene mit dem ToxR-Regulon auf. Analysen der Außenmembran (AM) demonstrierten, dass eine Mutation von *osmR/ K* zu einer Repression von OmpU unter hohen Salzkonzentrationen führt. Vergleichende Experimente mit weiteren Mutanten deuteten an, dass es in *osmR/ K*- und *toxS*-Mutanten unter erhöhten Salzkonzentrationen zur Degradation von ToxR kommt. Während die Deregulation von OmpU in *osmR/ K*-Mutanten nur unter Salzstress zu beobachten war, führte in der *toxS*-Mutante auch ein Membranstress durch Zugabe von Protamin zu einer Repression von OmpU. Die zu OsmR/ K nah verwandten putativen Zwei-Komponentensysteme EnvZ/ OmpR und VCA0257/ VCA0256 hatten unter keiner der getesteten Bedingungen einen Einfluss auf die Proteine der AM. Weiterhin wurde eine C-terminale Degradation von HutA unter hypertonen Bedingungen durch die Analysen der AM aufgedeckt.

## I Summary

The causative agent of the gastrointestinal disease cholera is the Gram<sup>-</sup> pathogen *V. cholerae*. Although, more than 200 serogroups were identified, however, only the strains of the non-encapsulated O1 and the encapsulated O139 serogroups were found to be responsible for cholera epidemics. The presence of virulence factors, such as the cholera toxin and the toxin-coregulated pilus in environmental strains was shown for several *V. cholerae* isolates by genetic analysis. Beside these virulence factors, the components of the LPS of O1 and O139 play a crucial role in the colonization of the gastrointestinal tract.

To analyze the contribution of the LPS and the capsule in the adhesion to epithelial cells, mucus layer attachment studies using defined O antigen and/ or capsule mutants of both serogroups and the human intestinal cell line HT29-Rev MTX were performed. In case of the O antigen mutant of O1 a 85% reduction in the adhesion rate and for the O antigen and capsule mutant of O139 a 70% reduction was determined compared to wild type. It is likely that ToxR regulated gene products also contribute to the adhesion, since a *toxR*-mutant of O1 showed a 3-fold reduction in the adhesion rate.

In addition the two gene products of the core oligosaccharide biosynthesis, WavJ and WavD, were characterized. So far the corresponding genes could only be found in the *wa\**-gene cluster type 1 of clinical isolates. Construction of *wavJ*- and/ or *wavD*-mutants in O1 and O139 allowed a variety of assays. It could be demonstrated, that single and double knockout mutants have an effect on core oligosaccharide biosynthesis in both serogroups. Based on bioinformatical data it is likely that WavJ represents the heptosyl-IV-transferase. Double mutants in *wavJ* and *wavD* of both serogroups showed an attenuated growth in the presence of novobiocin, whereas only the mutants in O139 demonstrated reduced colonization in the in vivo mouse model.

The surface polymer:lipid A-core ligase (WaaL), also called the O antigen ligase, is a key enzyme in the LPS biosynthesis of Gram<sup>-</sup> bacteria. The ligase catalyzes the transfer of the O antigen polysaccharide onto the lipid A-core oligosaccharide precursor molecule at the periplasmic site of the inner membrane. Part of this work focused on the structural and functional characteristics associated with the recognition of the core oligosaccharide of two distantly related ligases of a virulent (P27459) and an environmental (V194) *V. cholerae* isolate. It was demonstrated that the activity of both ligases is dependent on the presence of N-acetylglucosamine, which is attached to the core oligosaccharide by the WavL glycosyltransferase. The gene *wavL* could be found in all *V. cholerae* isolates so far. In

contrast, an additional sugar substitution, i.e. galactose, which is transferred by the WavM galactosyltransferase, discriminates the core oligosaccharide specificity of the ligases of P27459 and V194. The activity of WavM is essential for the activity of the galactose-dependent ligase of V194, whereas it hinders the galactose-independent ligase of P27459 to transfer the O antigen onto the core oligosaccharide. WaaL protein hybrids between galactose dependent and non-dependent ligases indicate that the galactose recognition site is located in the C-terminal half. Using PhoA and LacZ fusions the topology of the ligase of P27459 was determined. The ligase harbours 10 transmembrane domains with 5 periplasmic and 4 cytoplasmic loops. Amino acid sequence alignments of WaaL proteins identified the distinct conserved motifs R(X<sub>3</sub>)L and H(X<sub>10</sub>)G in the periplasmic loops 3 and 4 respectively. By site directed mutagenesis of the histidine and arginine residues within these motifs, an abortism of O antigen transfer reaction for WaaLs of *V. cholerae* and *Salmonella enterica* was found. Thus, these motifs offer the first hint towards the active reaction center of the enzyme. Furthermore the putative O antigen-transport systems of *V. cholerae* were investigated. Characterization of a *wzm*-mutant in O1 and a *wbfK*-mutant in O139 revealed, that for O1 Wzm and Wzz encode a putative ABC-transporter mediating the O antigen translocation, and that WbfK of O139 is a putative O antigen-flippase of the Wzy-dependent pathway.

All serogroups of *V. cholerae* exist as natural inhabitants of aquatic ecosystems. Nevertheless there is not much information available about the adaptation mechanisms to this natural habitat, especially to the changes in environmental osmolarity. In this work a new transposon system was constructed and established, resulting in 3600 mutants, which were screened for growth defects under hypertonic conditions. One of these mutants had an insertion in locus VCA0565, which encodes a putative sensor histidine kinase. In combination with the transcriptional regulator, encoded by VCA0566, they represent the putative two-component system OsmRK. Comparing the transcriptom of *osmR/ K*-mutants to the wild type revealed no explanation for the osmosensitive phenotype, but showed some interaction between the regulon of OsmR/ K and ToxR. Analysis of the outer membrane demonstrated, that a mutation in *osmR/ K* results in a repression of OmpU under hypertonic conditions. Comparative experiments, including additional mutants indicated a degradation of ToxR in *osmR/ K*- and *toxS*-mutants in presence of high salt concentrations. In contrast to *osmR/ K*-mutants, in the *toxS*-mutant the repression of OmpU could be also observed by a different membrane stress caused by protamine.

---

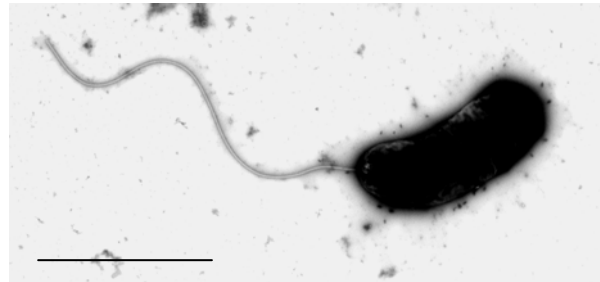
In addition, the analysis of the outer membrane proteins revealed a C-terminal degradation of HutA under hypertonic stress conditions. Therefore, another link to osmodependent proteolysis was exposed.

## II Einleitung

### 1. Das Bakterium *Vibrio cholerae*

#### 1.1. Allgemeine Informationen

*Vibrio cholerae*, ein fakultativ humanpathogenes, polar monotrich begeißeltes Bakterium, wurde erstmals während der 5. Cholera-Pandemie von Robert Koch 1883 in Ägypten isoliert (140). Damals beschrieb er den Erreger der Cholera als ein „kommaförmiges“ Bakterium (Abb. II.1). Heute ist *V. cholerae* sicherlich der bekannteste Vertreter der Familie der



**Abbildung II.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *V. cholerae*.** Kontrastierung durch kurze Inkubation in Uranylacetatlösung (0,5%). Eichstrich entspricht 1  $\mu\text{m}$ ;

*Vibrionaceae*. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe Gram<sup>-</sup>, fakultativ aerober (gekrümmter) Stäbchen, die unter anaeroben Bedingungen zur Gärung befähigt sind. Da die Mitglieder Oxidase-positiv sind, ist dies ein entscheidendes Merkmal für die Abgrenzung zu der nah verwandten Oxidase-negativen Familie der *Enterobacteriaceae*, zu welcher die gut erforschten Gattungen *Escherichia* und *Salmonella* gehören. Einige Bakterien der *Vibrionaceae* wie zum Beispiel *Photobacterium phosphoreum* oder *Vibrio fischeri* zeigen das Phänomen der Biolumineszenz, deren Mechanismus und Regulation inzwischen gut untersucht ist (169). Andere, wie *V. cholerae*, stellen Krankheitserreger dar. Dazu gehören *Vibrio fluvialis* (33) und *Vibrio parahaemolyticus* (122), die Durchfall- und Gastrointestinalerkrankungen auslösen können, aber auch *Vibrio alginolyticus* (32), welcher extraintestinale Wundinfektionen verursachen kann, um nur einige Erreger zu nennen.

Aus der im Jahr 2000 veröffentlichten DNA-Sequenz des Stammes *V. cholerae* O1 El Tor N16961 geht hervor, dass 3885 offene Leseraster (ORFs) auf zwei zirkulären Chromosomen kodieren (106). Die Sequenz ist über die Tigr-Datenbank (<http://www.tigr.org/tdb/>) öffentlich zugänglich, wobei jedem ORF abhängig von seiner Lage auf dem Chromosom ein Locus zugeteilt wurde. Die 2770 VC-Loci sind auf dem Chromosom 1 mit einer Größe von 2,96 Mb zu finden, während die 1115 VCA-Loci dem Chromosom 2 mit 1,07 Mb zugeordnet werden. Über viele hypothetische ORFs ist noch nichts oder sehr wenig bekannt. So ist die Funktion von 42% der Gene von Chromosom 1 und 59% der Gene von Chromosom 2 noch unbekannt.

Für ein gutes Drittel der ORFs sind ähnliche Gene in *E. coli* zu finden, was den nahen Verwandtschaftsgrad bestätigt. 500 ORFs hingegen zeigen signifikante Homologien zu anderen Genen von *V. cholerae*. Dies könnte ein Hinweis für erst kürzlich stattgefundenen Duplikationen sein. Dabei sind u. a. Gene mit einer Funktion in Transport, Regulation, Chemotaxis und Pathogenität zu finden. Die meisten Gene, welche für das Wachstum, Aufrechterhaltung von essentiellen Zellfunktionen, Virulenz, Sekretionsysteme und LPS-Biosynthese benötigt werden, sind auf dem Chromosom 1 lokalisiert. Dagegen kodieren viele zusätzliche metabolische Wege auf dem Chromosom 2. Es wird angenommen, dass das Chromosom 2 ursprünglich als Megaplasmid von einem *Vibrio*-Vorfahren aufgenommen worden ist. Warum anschließend keine Integration ins Chromosom stattgefunden hat, ist unklar. Vielleicht bieten zwei Chromosome unter bestimmten Bedingungen einen Selektionsvorteil, da dieses Phänomen nicht nur in *V. cholerae*, sondern auch in anderen *Vibrio* Spezies zu finden ist (279).

Obwohl inzwischen mehr als 200 Serogruppen bekannt sind, wurden Cholera-Epidemien bisher nur durch die Serogruppen O1 und O139 ausgelöst. Daher werden Stämme dieser Serogruppen auch als klinische Isolate bezeichnet. Vertreter anderer Serogruppen, die als Nicht O1/ O139-Stämme zusammengefasst werden, sind bislang nur als Verursacher einzelner Durchfallerkrankungen und extraintestinalen Infektionen in Erscheinung getreten (82), obwohl einige dieser Umweltisolate durchaus wichtige Virulenzfaktoren besitzen (67, 76, 181, 182). Erwähnenswert ist ein größerer Ausbruch einer Cholera-ähnlichen Durchfallerkrankung 1968 im Sudan, ausgelöst durch die Serogruppe O37 (3, 29), die jedoch seitdem epidemiologisch nicht mehr aufgefallen ist.

Die Stämme der Serogruppe O1 können anhand einer Methylierung im O Antigen in die zwei abundanten Serotypen Ogawa, Inaba und in den seltenen, unstablen Hikojima eingeteilt werden (118). Während Ogawa diese Methylierung besitzt, fehlt sie bei Inaba. Hikojima scheint eine Zwischenstufe mit methylierten und nicht methylierten LPS Molekülen darzustellen (90, 199). Dabei ist ein Wechsel der Serogruppen möglich. Für den Wechsel von Ogawa zu Inaba wurde eine Frequenz von etwa  $10^{-5}$  ermittelt, dagegen tritt der umgekehrte Fall seltener auf (17). Die Methylierung wird von dem Protein WbeT (früher RfbT) vermittelt, welches bei Ogawa aktiv, bei Inaba dagegen inaktiv ist (249). Mittels physiologischer und biochemischer Parameter wird die Serogruppe O1 weiter in die zwei Biotypen O1 klassisch und O1 El Tor unterschieden (267). So besitzen O1 El Tor Stämme eine höhere Toleranz

gegenüber Polymyxin, zeigen hämolytische Aktivität und exprimieren das Mannose-sensitive Hämagglutinin (MSHA) (160, 267).

Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen *V. cholerae* O1 El Tor und *V. cholerae* O139 wird vermutet, dass O139 aus O1 El Tor durch Serogruppenkonversion über horizontalen Gentransfer hervorgegangen ist (25, 100, 111). Dabei wurden die Gene für die Biosynthese des O1 Antigens mit den Genen für die Biosynthese der Kapsel von O139 und des O139 Antigens ausgetauscht (27, 120). Strukturanalysen zeigten, dass die Untereinheit der Kapsel von O139 und das O139 Antigen identisch sind (137, 139) und die Kapsel dem sogenannten Kapseltyp 4 zugeordnet werden kann (277).

### **1.2. *V. cholerae* in der Umwelt**

*V. cholerae* und nah verwandte Arten sind natürliche Bewohner aquatischer Ökosysteme (52, 53, 117). Obwohl auch O1 und O139 durchaus in der Umwelt zu finden sind, werden sie seltener als Nicht O1/ O139-Stämme isoliert. O1 Stämme, welche außerhalb von Endemiegebieten isoliert werden, besitzen häufig kein CT. Daher gibt es Theorien, wonach der Gastrointestinaltrakt von Säugern das natürliche Habitat der toxigenen O1 und O139 Stämme darstellt (82). Da die wichtigen Virulenzdeterminaten auf mobilisierbaren genetischen Elementen kodieren (106), konnte *V. cholerae* diese durch horizontalen Gentransfer erwerben. Da diese Elemente noch heute mobilisierbar sind (128, 142, 206, 268), könnten sich Umweltisolate durch den Erwerb von Virulenzfaktoren über horizontalen Gentransfer zu virulenten Keimen entwickeln (82).

In der Umwelt konnte eine Assoziation von *V. cholerae* mit Phytoplankton (v. a. Cyanobakterien und Grünalgen), Zooplankton (v. a. Copepoden), sowie Crustaceen und Insekten nachgewiesen werden (52, 115). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass sich O1 El Tor und O139 über den Typ IV Pilus MSHA an Chitin anheften können und dadurch eine erhöhte Säuretoleranz erhalten (50). Diese Anlagerung wird wahrscheinlich durch chitinbindende Proteine verstärkt (254). Die Expression des „Chitin regulierten Pilus“ (ChiRP, früher Pil) wird durch Anwesenheit von Chitin induziert und trägt zur Kolonisierung auf Chitinoberflächen bei (88, 167). Dabei könnte Chitin als C- und N-Quelle dienen, da bei *V. cholerae* sowohl Chitinasen (55, 187), als auch entsprechende Transportsysteme gefunden wurden (167). Der seit langem beobachtete Zusammenhang zwischen der Zunahme an Phyto- und Zooplankton nach den Regenzeiten und dem Auftreten von Cholera-Epidemien könnte

durch diese Assoziation erklärt werden (52, 78, 117). Ferner sind *V. cholerae* O1 El Tor und O139 Stämme in der Lage, durch Expression des Exopolysaccharids „VPS“ einen dreidimensionalen Biofilm an abiotischen Oberflächen zu bilden (273, 274, 283). Voraussichtlich spielt in der Umwelt sowohl die Assoziation an Chitin als auch die Produktion eines Biofilms bei der erhöhten Überlebensfähigkeit dieser Stämme eine Rolle. Für Fische und Muscheln stellt Phyto- und Zooplankton eine wichtige Nahrungsgrundlage dar. Deshalb kann bereits der Verzehr von rohem Fisch und Muscheln aus den Endemiegebieten Cholera oder choleraähnliche Durchfallserkrankungen auslösen. Durch längere Transporte in tiefgekühlten Lebensmitteln, die *V. cholerae* überlebt (56), kann der Erreger leicht in entfernt gelegene Gebiete verbreitet werden.

### 1.3. Die Krankheit Cholera

Erste Berichte über Cholera gibt es bereits von Hippokrates (460-377 v. Chr.) und zu Zeiten Buddhas (16), aber erst mit den epidemiologischen Aufzeichnungen zu Beginn des 19. Jahrhunderts konnten Cholera-Epidemien verfolgt und analysiert werden. Dabei ordnet man den ersten 6 Pandemien folgende Zeiträumen zu: 1. 1817-1823, 2. 1829-1851, 3. 1852-1859, 4. 1863-1879, 5. 1881-1893, 6. 1899-1923 (211). Alle sechs Pandemien breiteten sich damals von Indien über die restliche Welt bis nach Amerika aus. Ob die Cholera vor 1817 außerhalb Asiens existierte, ist ebenso ungewiss, wie die Frage nach dem Erregerstamm bzw. Stämmen der 1.-4. Pandemie. Bekannt ist nur, dass die 5. und 6. Pandemie durch *V. cholerae* O1 klassisch verursacht wurde (16). Nicht zuletzt durch die Verbesserung der hygienischen Verhältnisse und der medizinischen Behandlung konnte die Cholera schrittweise zurückgedrängt werden, bis sie 1950 nur noch in Asien zu finden war. Dennoch konnte der Ausbruch der 7. Pandemie 1961 nicht verhindert werden. Die bisher längste und am weitesten verbreitete Ausbruchswelle wurde aber diesmal nicht von *V. cholerae* O1 klassisch, sondern durch einen *V. cholerae* O1 El Tor Stamm verursacht. Von Indonesien breitete sich der Erreger über den mittleren Osten nach Afrika und weiter nach Südamerika aus (255) (16). 1992 wurde eine Epidemie mit dem Ursprung in Bangladesh und Indien von *V. cholerae* O139 ausgelöst (2, 217), welche zurückblickend als der Beginn der 8. Pandemie gesehen werden kann (253). Gleichzeitig wurde die alte These widerlegt, wonach nur Stämme der Serogruppe *V. cholerae* O1 in der Lage wären Cholera auszulösen. Schnell breitete sich der Erreger über Pakistan, China, Thailand Afghanistan und Malaysia aus (51, 232). Auch im Vereinigten Königreich und den USA wurden Infektionen gemeldet (57). *V. cholerae* O1 klassisch, O1 El Tor und O139 sind seitdem endemisch in diesen Gebieten zu finden. Dabei



bewirken gerade O1 El Tor und O139 Stämme immer wieder saisonale Cholera-Ausbrüche (82). So zum Beispiel im Jahr 2002 in Dhaka, wo innerhalb weniger Wochen 30000 Menschen verstarben (81). Die durchschnittliche Todesrate pro Jahr wird von der WHO auf ca. 120000 geschätzt, wobei vor allem Kinder betroffen sind (203).

Eine Infektion wird in der Regel durch die orale Aufnahme von *V. cholerae* über kontaminierte Lebensmittel oder Wasser verursacht. Abhängig von der Infektionsdosis beträgt die Inkubationszeit 12-72 h (44). Durch Studien an Freiwilligen mit *V. cholerae* O1 konnte gezeigt werden, dass eine Aufnahme von mindestens  $10^8$  Bakterien notwendig ist, um Cholera auszulösen (23). Aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Magen überleben wahrscheinlich nur wenige Bakterien die Magenpassage und erreichen den Dünndarm. Gestützt wird diese Vermutung durch weitere Experimente, bei denen *V. cholerae* O1 zusammen mit einer Natriumcarbonatlösung in der Funktion eines pH-Puffers verabreicht wurden. Hier konnte bereits durch eine Dosis von  $10^4$  Bakterien eine starke Erkrankung verursacht werden (23). Nach 1-2 h erreicht *V. cholerae* den oberen Dünndarmtrakt, der den eigentlichen Infektionsort darstellt. *V. cholerae* penetriert unter Verwendung der Flagelle und Sekretion hydrolytischer Enzyme die Mukosa und adhärirt an die Epithelzellen (85, 126). Bis zu diesem Zeitpunkt ist *V. cholerae* wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt: Der pH-Wert ändert sich bei dem Übertritt vom Magen (pH ~2) in den Dünndarm (pH ~5,6). Von der Gallenblase werden Gallensäuren und über die Bauchspeicheldrüse Verdauungsenzyme sezerniert. Zudem sind im Dünndarm Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie Defensine und Faktoren des Komplementsystems aktiv (9, 157). *V. cholerae* muss daher Virulenzfaktoren besitzen, die eine Besiedlung dieses lebensfeindlichen Gebiets ermöglichen. Die Expression und Sekretion des CT erfolgt wahrscheinlich erst nach der Bildung von Mikrokolonien an den Epithelzellen (149), wodurch die typischen Symptome der Cholera auftreten. Das CT führt zur erhöhten Freisetzung von Chlorid aus den Darmepithelzellen in das Darmlumen. Gleichzeitig wird die Aufnahme von Chlorid und Natrium gehemmt. Beides trägt dazu bei, einen osmotischen Gradienten aufzubauen, der einen massiven Ausstrom von Wasser aus den Epithelzellen zur Folge hat. Nach Ausbruch der Krankheit kann das Stuhlvolumen bei Erwachsenen bis zu 20 l pro Tag betragen (14), wogegen der Urinfluß fast vollständig zum Erliegen kommt (23). Die Patienten erfahren dabei heftige Durchfälle, Erbrechen und Magenkrämpfe. Durch den Stuhl gelangen eine Vielzahl von Krankheitserregern wieder in die Umwelt und können neue Infektionen initiieren. Infektionsversuche mit Bakterien, welche aus dem Stuhl von Patienten isoliert worden waren, demonstrierten, dass diese ein signifikant höheres Virulenzpotential

besitzen, als Bakterien, welche aus in vitro-Kulturen stammen (171). Dies erklärt die rasante Ausbreitung eines zunächst lokalen Ausbruchs der Cholera. Der Wasserverlust führt zur Dehydrierung von Organen. Ein Austrocknen der Haut, versunkene Augen und das Eindicken des Blutes sind die Folgen. Weitere Symptome sind Hypotonie, Tachykardie, eine erhöhte Atemfrequenz und Bewußtseinsstörungen bis hin zum Koma. Ohne medizinische Behandlung führt die Krankheit bei über 20% der Patienten zum Tod (23).

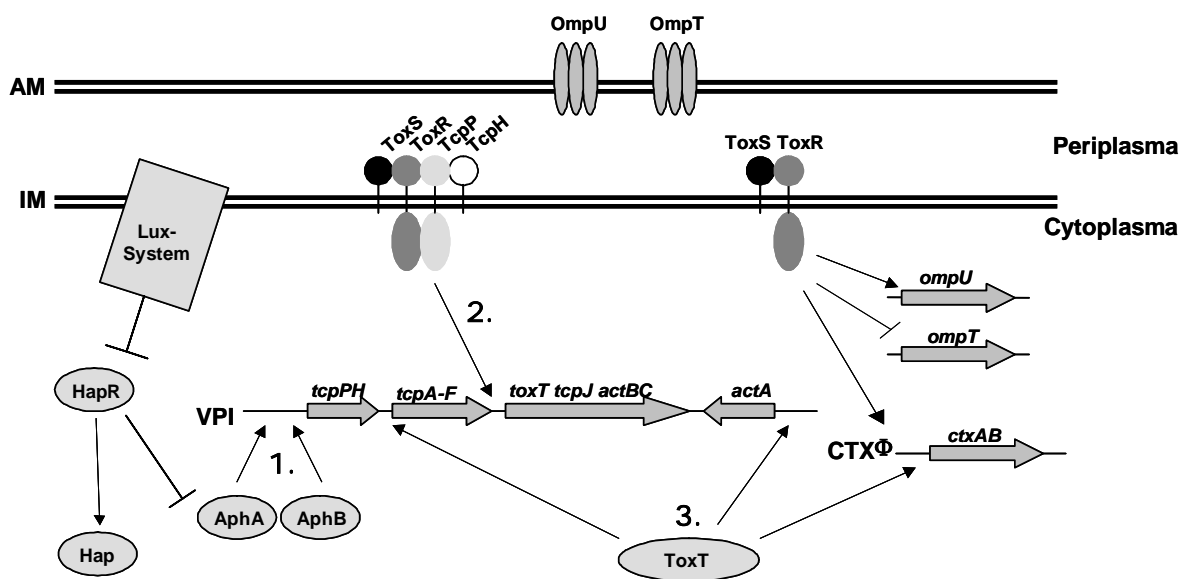
## 2. Molekularbiologische Grundlagen der Virulenzfaktoren

Zu den wichtigsten und am besten charakterisierten Virulenzfaktoren zählen das CT und der TCP. Daneben spielt auch das unten ausführlich beschriebene Regulationssystem mit seinen Komponenten ToxR/S, TcpP/H und ToxT eine entscheidende Rolle (43, 46, 256). Zusätzliche Kolonisierungsfaktoren (ACF) (208) dienen als mögliche Adhäsionsfaktoren für die Anlagerung an das Darmepithel. Das Porin OmpU vermittelt Resistenz gegenüber Gallensäure und antimikrobiellen Peptiden (164, 212, 213). Dem Mannose/ Fucose resistenten Hämagglutinin (MFRHA) wird eine Funktion bei der Kolonisierung zugesprochen, jedoch fehlen hierfür noch die Beweise (87). Das eisenregulierte Protein IrgA scheint für die Eisenaufnahme in vivo wichtig zu sein. Mutanten in *irgA* sind im Tiermodell ebenso attenuiert (92), wie Stämme mit defekter oder fehlender Flagelle (220, 274). Weiterhin ist das LPS zu nennen, welches in Kapitel II 4. noch im Detail vorgestellt wird (49, 192).

Das auf dem Phagen CTX $\Phi$  kodierte CT ist ein typisches AB-Toxin, welches aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten aufgebaut ist. Obwohl für die Kolonisierung nicht essentiell, ist das CT für die typischen Symptome der Cholera verantwortlich (256). Jeweils eine A-Untereinheit interagiert über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit 5 B-Untereinheiten, welche eine ringförmige Struktur bilden. Dabei besitzt die A-Untereinheit eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, während die B-Untereinheit für deren Transport ins Cytoplasma der Epithelzelle verantwortlich ist. Dazu interagiert die B-Untereinheit mit den GM<sub>1</sub>-Gangliosiden der eukaryotischen Zellmembran. Im Cytoplasma angelangt kommt es zur ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen, welche einen Vermittler in der cAMP-Signalkaskade zwischen den Sieben-Helix-Rezeptoren und der Adenylatzyklase darstellen. Durch die stabilisierende Wirkung der ADP-Ribosylierung bleibt die Adenylatzyklase dauerhaft aktiv, sodass der cAMP-Spiegel in der Zelle auf konstant hohem Niveau gehalten wird. Hohe cAMP-Konzentration aktivieren die Proteinkinase A. Diese Kinase phosphoryliert diverse Targetproteine, wodurch u. a. Chloridionenkanäle geöffnet und

gleichzeitig die Aufnahme von Natrium- und Chloridionen gehemmt wird. Da Wasser passiv den Ionen ins Darmlumen folgt, kommt es zum massiven Ausstrom von Wasser aus den Darmepithelzellen (125). Ein Einfluss des CT auf die Prostaglandinsynthese und die Sekretion verschiedener Hormone (z. B.: Serotonin, VIP), was den Verlust von Elektrolyten und Wasser zusätzlich verstärkt, ist ebenfalls beschrieben (126, 207).

Im Gegensatz zu MSHA und ChiRP ist der dritte Typ IV-Pili TCP für die Kolonisierung von *V. cholerae* von entscheidender Bedeutung (12, 88, 110, 167). Die bündelförmigen Pili bestehen aus polymerisierten Untereinheiten des von *tcpA* kodierten Genprodukts. Gleichzeitig bildet der TCP auch den Rezeptor für den Phagen CTX $\Phi$  (268). Zunächst als Adhäsionsfaktor für die Wechselwirkung zu den Wirtszellen beschrieben, vermutet man heute eine Beteiligung von TcpA bei der Ausbildung von Mikrokolonien (135). Für *V. cholerae* sind weder die bakteriellen Adhäsionsfaktoren, noch die beteiligten Wirtsrezeptoren bezüglich der Anheftung der Bakterien an die Darmepithelzellen bekannt.



**Abbildung II.2:** Das Regulationssystem der Virulenzfaktoren von *V. cholerae*. Punkte 1., 2. und 3. werden im Text erklärt. Hemmung durch —|, Aktivierung durch → symbolisiert.

Viele der oben genannten Virulenzfaktoren werden durch ein komplexes Regulationssystem kontrolliert (Abb. II.2). Ursprünglich wurde das ToxR-Regulon als eine Gruppe von Genen definiert, welche vorzugsweise in der Pathogenitätsinsel von *V. cholerae* (VPI) oder auf dem Cholera-toxinphagen CTX $\Phi$  kodieren (208). Ausnahmen stellten dabei die Porine OmpU und OmpT dar. Neuere Transkriptomanalysen zeigen, dass ToxR an der Regulation von 150 Genen beteiligt ist (30). Obgleich die genauen Signale, welche das ToxR-Regulon

beeinflussen, unbekannt sind, kann man *in vitro* durch Umwelteinflüsse wie pH, Temperatur, Osmolarität und Anwesenheit von Gallensäure oder AS die Kaskade induzieren (237). Im Labor wird eine Expression der Virulenzgene durch Kultivierung der Bakterien in dem tryptonreichen, alkalischen AKI-Medium erreicht (119, 166).

Eine wichtige Stellung im Regulationssystem besitzt der in der VPI kodierte AraC-ähnliche Transkriptionsaktivator ToxT, welcher u. a. die Expression des TCP und des CT reguliert (Abb. II.2/ 3.). Der Verlust von *toxT* führt in *V. cholerae* zu avirulenten Stämmen (46). Die Transkription von *toxT* wiederum, wird synergistisch durch die Membranproteine ToxR und TcpP reguliert (Abb. II.2/ 2.) (104, 112). Die Transmembranproteine liegen an der inneren Membran als ToxR/ ToxS- und TcpP/ TcpH-Proteinpaare vor. Nach dem vorhergesagten Topologiemodell haben alle vier Proteine eine Transmembrandomäne. Die N-terminalen Bereiche befinden sich im Cytoplasma, die C-terminalen Bereiche im Periplasma. DNA-Bindedomänen findet man bei ToxR und TcpP in den N-terminalen Abschnitten, die cytoplasmatischen Anteile bei ToxS und TcpH sind dagegen sehr kurz. Mutationen in *tcpH* führen zu einer massiven Degradation von TcpP, ohne dessen Expression zu beeinflussen (20). Daher schützt TcpH den Transkriptionsaktivator TcpP vor proteolytischer Degradation im Periplasma und ist somit für die Stabilität von TcpP verantwortlich. Ein ähnliches Bild wird ebenfalls für ToxS hinsichtlich der Stabilität von ToxR skizziert (209). So vermutet man eine Funktion von ToxS bei der Faltung und Dimerisierung von ToxR (71, 75). Während *tcpP* neben *tcpH* in der VPI kodiert (106, 128), befindet sich *toxR* in einem Operon mit *toxS* in einer anderen Region des Chromosoms (71, 142).

Durch die oben erwähnten Umweltsignale kann die Expression von ToxT induziert werden. Zudem wird dessen Aktivität durch Temperatur und Gallensäuren beeinflusst (231). In den ersten Phasen der Infektion findet die Synthese von ToxT statt, ohne die nachgeschalteten Virulenzfaktoren zu exprimieren. Erst mit sinkender Gallensäurekonzentration, während der Penetration des Bakteriums durch die Schleimschicht im Dünndarm, wird ToxT aktiv und führt zur Transkription der entsprechenden Gene. Wahrscheinlich geht die Transkriptionsaktivierung von ToxT von TcpP aus, da erstens die Menge an ToxR auch bei variierenden Umweltbedingungen konstant gehalten wird (72) und zweitens die gleichen Signale, welche die Expression von ToxT steuern auch die Synthese von TcpP induzieren (185). Für die Aktivierung von *tcpP* scheinen AphA und AphB, die außerhalb der VPI auf dem Chromosom kodieren verantwortlich zu sein (Abb. II.2 / 1.) (145, 185, 238). Mutationen in diesen Genen erlauben keine Expression von ToxT und TcpP mehr, wodurch eine Bildung des TCP und des CT sowie eine Kolonisierung des Dünndarms verhindert wird (143). Parallel

dazu reguliert das Proteinpaar ToxR/ S die Expression der Porine OmpU und OmpT, die in der äußeren Membran lokalisiert sind. Die Transkription von *ompU* wird durch ToxR aktiviert, die von *ompT* gehemmt (64, 152, 241). *ToxR*-Mutanten sind nicht mehr zur Expression von OmpU fähig (177). Die Tatsache, dass *ompU*- im Vergleich zu *ompT*-Mutanten gegenüber anionischen Detergenzien sensitiver sind, steht im Einklang mit der ToxR-abhängigen differenzierten Regulation (212, 213).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Expression der Virulenzgene von dem „Quorum-sensing“-System LuxOPQU kontrolliert wird (144, 285). Dabei erlaubt das System bei niedriger Zellzahl zu Beginn der Infektion die Expression der Virulenzgene durch Hemmung des Transkriptionsregulators HapR. Nach effektiver Kolonisierung wird bei hoher Zellzahl durch die zunehmende Konzentration des Autoinduktors AI-2 die Expression von HapR aktiviert. HapR wirkt als Repressor von *aphA*, wobei die Abnahme der AphA-Konzentration die Expression der Virulenzgene reduziert. Durch gleichzeitige Aktivierung der Protease Hap wird die Ablösung vom Mukus und Freisetzung von *V. cholerae* aus dem Darm erleichtert.

### 3. Die Außenmembran

Die AM ist ein wichtiger Bestandteil der Zellwand Gram<sup>-</sup> Bakterien. Analog zur CM ist die AM in der Form einer Lipid-Doppelschicht aufgebaut. Die innere Schicht der AM besteht wie die CM hauptsächlich aus Phospholipiden, während in der äußeren Schicht der AM die Hauptkomponente das Lipopolysaccharid (LPS) darstellt. Dabei ist LPS strikt auf die Außenseite der AM begrenzt (123), während Phospholipide durchaus auch in der äußeren Schicht der AM nachgewiesen werden können (205, 233). Dieser asymmetrische Aufbau der AM erklärt u. a. die ungewöhnlich langsame Diffusion bzw. Impermeabilität hydrophober Substanzen. Allgemein stellt die AM einen faszinierenden Bestandteil der Zellhülle bei Gram<sup>-</sup> Bakterien dar, mit dem einige Virulenzfaktoren assoziiert sind. Auf Struktur, Biosynthese und Funktion des LPS wird ausführlich in Kapitel II 4. eingegangen.

In *E. coli* sind neben dem Lipoprotein mit einer Abundanz von bis zu 10<sup>6</sup> Kopien pro Zelle (196) noch über 20 verschiedene Proteine an und in der AM lokalisiert (116). Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Transportproteine, die am Aufbau und der Funktion von Porinen, Kanälen und anderen Import/ Export-Systemen beteiligt sind. Dazu gehören auch Proteinkomponenten der Eisenaufnahme und der Proteinsekretion, welche u. a. am Transport von Toxinen, Invasinen, sowie am Zusammenbau von Flagellen, Pili und Fimbrien beteiligt sind.

Porine, welche unspezifische Diffusionskanäle in der AM ausbilden und somit die Permeabilität für hydrophile Moleküle bis zu 600 Da erklären (24), wurden erstmals 1976 beschrieben (186). Klassische Porine, wie z. B. für OmpF und PhoE von *E. coli* gezeigt (60), ordnen sich über transmembrane  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu charakteristischen Trimeren zusammen. Die wichtigsten und gleichzeitig häufigsten Porine von *V. cholerae* sind OmpU (38 kDa) und OmpT (40 kDa). Funktionell sind sie dabei noch am ehesten mit OmpF und OmpC von *E. coli* zu vergleichen (45). Dennoch zeichnen sich OmpU und OmpT durch diverse eigene Charakteristika aus. OmpU ist mit einem Durchmesser von 1,6 nm etwas größer als OmpT, zeigt eine zwei- bis dreifach höhere spezifische Aktivität als OmpF und ist im Vergleich zu OmpT selektiver für Kationen (45, 236). Während OmpC und OmpF bei *E. coli* von dem Zwei-Komponenten-System EnvZ/ OmpR reziprok reguliert werden (165, 200), aktiviert der Transkriptionsregulator ToxR in *V. cholerae* die Expression von OmpU und reprimiert OmpT (64, 152, 177) (siehe Kapitel I 2.). So wird beispielsweise durch Gallensäure ToxR aktiviert und die Expression von OmpU induziert (214). Im Einklang dazu konnte gezeigt werden, dass Bakterien, die nur OmpU exprimieren im Vergleich zu ausschließlich OmpT exprimierenden Zellen eine höhere Resistenz gegenüber Gallensäure besitzen und besser im Dünndarm kolonisieren können (212). Weiterhin scheint OmpU auch bei der Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden eine wichtige Rolle zu spielen (164).

Eisen ist ein wichtiges Spurenelement, das in verschiedenen Stoffwechselprozessen (z. B.: Energiemetabolismus, Elektronentransport, Nukleinsäuresynthese) eine Rolle spielt. Nachdem Eisenionen im Wirt meist limitiert vorliegen, können die Eisenaufnahmesysteme der Bakterien zu den Virulenzfaktoren gerechnet werden, da sie dem Mikroorganismus dieses Spurenelement in ausreichender Menge zur Verfügung stellen und somit das Überleben und die Vermehrung ermöglichen (95). Unter aeroben Bedingungen werden Eisen(II)-Ionen sehr schnell zu Eisen(III)-Ionen oxidiert, die bei neutralem pH fast unlösliche Verbindungen eingehen. Ein verbreitetes System ist daher die Sekretion von eisenbindenden Molekülen, den Siderophoren, welche Eisen(III)-Ionen binden. Über spezielle Transportsysteme gelangen die mit Eisen beladenen Siderophore über die AM und geben die Eisenionen an der CM an Proteine weiter, welche den Transport über die CM katalysieren. Die Aufnahme der Siderophore über die AM wird dabei über ATP-Hydrolyse im Cytoplasma angetrieben, wobei die Energie über den TonB-Komplex bis an die AM weitergeleitet wird. *V. cholerae* besitzt viele verschiedene Eisenaufnahmesysteme. Unter Eisenmangel produziert und sezerniert *V. cholerae* beispielsweise das Siderophor Vibrobactin (93), während gleichzeitig der AM-

Transporter ViuA induziert wird (244). Daneben gibt es u. a. drei TonB-abhängige Häm-Transporter in der AM: HutR, HasR und HutA, wobei Letzteres am effizientesten arbeitet (172).

Da sezernierte Proteine der Gram<sup>-</sup> Bakterien neben der CM auch noch die AM überwinden müssen, sind spezielle Transportsysteme nötig. So werden das  $\alpha$ -Hämolysin von *E. coli* über ein Typ I-, die Bausteine der Typ IV-Fimbrie von *Pseudomonas aeruginosa* über eine Typ II- und Invasine von *Shigella flexneri* und *Salmonella typhimurium* über ein Typ III-Proteinsekretionssystem transportiert (86, 201). Inzwischen gibt es Hinweise, dass die negative Ladung des LPS für den Transport und die Faltung von Proteinen der AM wichtig ist (70, 173, 270).

Die AM stellt für Flagellen, Pili und Fimbrien einen Verankerungspunkt dar. Motilität von pathogenen Bakterien durch Flagellen kann entscheidenden Einfluss auf die Virulenz haben. So ist die Penetration von *V. cholerae* durch die Mukosa des Dünndarms auf die Geißelbewegung zurückzuführen. Eingelagert in diese Schleimschicht ist das Bakterium gegen Verdauungsenzyme, Detergenzien und Komponenten des Immunsystems weitgehend geschützt. Fimbrien und Pili helfen den Bakterien an bestimmte Oberflächen zu adhären. Eine einfache Entfernung der Mikroorganismen etwa durch den Urinfluss, Husten oder Niesen ist danach nicht mehr möglich. So besitzen beispielsweise uropathogenen *E. coli* Stämme P-Fimbrien, während bei *V. cholerae*, *P. aeruginosa* und *Neisseria gonorrhoeae* Typ IV-Fimbrien zu finden sind (86).

Die AM ist über das „Braunsche“ Lipoprotein mit der einschichtigen Mureinschicht der Gram<sup>-</sup> Bakterien fixiert (36). Das N-terminale Cystein ist an seiner Aminogruppe mit einer Fettsäure und an seiner Sulfhydrylgruppe mit einem Diacylglycerin substituiert (105). Über die hydrophoben Wechselwirkungen der drei Fettsäuren ist das Lipoprotein in die innere Schicht der AM eingelagert. Dagegen ist die  $\epsilon$ -Aminogruppe des C-terminalen Lysins kovalent mit dem Peptidoglykan verknüpft (105). Da Lipoprotein-Mutanten zwar AM-Vesikel und periplasmatische Proteine freisetzen (113), aber ihre AM keine erhöhte Permeabilität für hydrophobe Substanzen zeigt (197), ist die Verankerung der AM nicht für ihre Funktion als Diffusionsbarriere essentiell. Zusammenfassend bleibt daher festzuhalten, dass Bestandteile der AM pathogener Gram<sup>-</sup> Bakterien einen entscheidenden Beitrag zur Virulenz liefern.

(Übersichtsartikel zu 3.: 195, 196)

## 4. Das Lipopolysaccharid der Gram<sup>-</sup> Bakterien

### 4.1. Aufbau, Biosynthese und Funktion

Das LPS von Gram<sup>-</sup> Bakterien ist in der Regel aus dem Lipid A, dem Kern OS und dem O Antigen aufgebaut. Nur bei wenigen Gram<sup>-</sup> Bakterien wie *Neisseria*, *Bacteroides*, *Bordetella*, *Haemophilus* und *Chlamydia* wurde bisher ein LPS ohne O Antigen gefunden (222). Stattdessen besitzen sie einen erweiterten Kern OS-Bereich in ihrem LPS, welches auch als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet wird. Die Synthese der einzelnen Komponenten, am besten bei *E. coli* und *Salmonella* untersucht, wird im Folgenden kurz beschrieben. Gleichzeitig wird auf die Funktion der einzelnen Strukturen eingegangen.

Das Lipid A stellt den hydrophoben Anker in der AM dar. Weiterhin ist Lipid A auch als Endotoxin bekannt. Durch die Aktivierung von TLR4, kommt es u. a. zur Synthese von IL-1 und TNF $\alpha$ , welche eine heftige Entzündungsreaktion auslösen. Dies kann bei einer entsprechend hohen Dosis von Lipid A zum septischen Schock führen.

Lipid A besteht aus zwei  $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidisch verknüpften Glucosamin-Einheiten (GlcN), die an freien Hydroxylgruppen mit sechs oder sieben meist gesättigten Fettsäuren verestert sind. Da ein LPS-Molekül somit bis zu sieben Fettsäuren, statt zwei bei gewöhnlichen Lipiden, besitzt, sind starke intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen und v. d. Waals-Kräfte zwischen den Kohlenwasserstoffketten möglich, worin die niedrige Permeabilität der AM bezüglich hydrophober Substanzen begründet ist. Die laterale Beweglichkeit der Moleküle ist viel geringer als in einer einfachen Lipiddoppelschicht. Die Verwendung von gesättigten Fettsäuren erlaubt zudem eine besonders dichte Packung der LPS-Moleküle in der AM. Die meisten Enzyme für die Biosynthese sind in dem *lpx/ dnaE*-Gencluster kodiert. Ausgangspunkt für die Lipid A-Synthese ist der aktivierte Zucker UDP-GlcNAc, welcher aus exogenem GlcNAc oder endogenem Fructose-6-phosphat aus der Glykolyse hergestellt wird. Dieser Zucker wird weiterhin bei der Biosynthese des Mureins und als Startzucker für das „Enterobacterial Common O Antigen“ verwendet. Nach einer Acylierung durch LpxA, einer Deacetylierung durch LpxC und einer weiteren Acylierung durch LpxD entstehen UDP-2,3-Diacylglucosamineinheiten, von denen jeweils zwei durch LpxB über eine  $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidische Bindung zu dem Vorläufer Lipid X zusammengefügt werden. Eine spezifische membrangebundene Kinase phosphoryliert anschließend die beiden Zuckermoleküle an den 4'-Positionen. Danach beginnt der sukzessive Transfer von einer (bei *V. cholerae* O1 und O139) oder mehrere (zwei bei *E. coli*) 3-Deoxy-D-Manno-Oktulosensäuren (KDO) durch



WaaA an das Intermediat. In den letzten Schritten der Lipid A-Biosynthese werden weitere Fettsäuren distal der GlcN-Einheiten angehängt. Diese Acylierungen sind abhängig von der Anwesenheit der KDOs und der Phosphatreste. Obwohl die KDO-Einheiten bereits zu dem Kern OS gerechnet werden, müssen diese daher dennoch vor der eigentlichen Fertigstellung des Lipid A angeheftet werden. Gleichzeitig stellt das Lipid A, welches mit zwei KDO-Einheiten glykosyliert ist, den sogenannten „Re-Chemotyp“ dar. Diese Struktur gilt als die minimale Anforderung in *E. coli* für das Wachstum der Zelle. Damit sind die Biosynthesegene bis zu diesem Molekül als essentiell einzustufen (156, 230).

Einige Gram<sup>-</sup> Bakterien besitzen zusätzliche Enzyme für die Modifikation des Lipid A durch Aminoarabinose, Phosphoethanolamin (PEtn) oder Palmitatgruppen. Diese Modifikationen werden durch Stress, wie beispielsweise Kälte, antimikrobielle Peptide oder Säuren induziert. So führt die Anwesenheit von antimikrobiellen Peptiden in *Salmonella enterica* Serovar (sv.) Typhimurium zur Aktivierung der Zwei-Komponenten-Systeme PhoPQ und PmrAB, was letztlich eine Anheftung von 4-Aminoarabinose an die Phosphatgruppen des Lipid A zur Folge hat und die Resistenz der Bakterien gegenüber antimikrobielle Peptide erhöht (97).

Wie bereits erwähnt ist das Lipid A über die KDO mit dem Kern OS verbunden. Dieses besteht aus ca. 10 sich nicht wiederholenden, verzweigten Zuckereinheiten, welche z. B. durch Acetyl- oder Phosphatgruppen modifiziert sein können. Das Kern OS stellt die Verbindung zwischen Lipid A und O Antigen her. Wie bei *E. coli* wird manchmal zwischen dem inneren (am Lipid A) und dem äußeren Kern OS (am O Antigen) unterschieden, wobei das innere Kern OS innerhalb eines Genus oder Familie relativ konserviert ist, der äußere Bereich jedoch mehr Diversität zeigt. Diese Dualität spiegelt die Funktion des Kern OS wieder. Zum einen trägt das Kern OS besonders im inneren Bereich mit seinen negativen Ladungen, die von Carboxylgruppen und Phosphatresten (P) stammen, durch Komplexierung zweiwertiger Kationen zwischen den Molekülen zur Integrität der AM bei. Zum anderen deuten die verschiedenen Strukturen im äußeren Kern OS bereits einen Selektionsdruck durch Umwelteinflüsse, Bakteriophagen oder Immunantworten des Wirts an. Dennoch ist die Variabilität begrenzt. *E. coli* besitzt beispielsweise fünf verschiedene Kern OS-Typen. Dabei gibt es eine interessante Korrelation zwischen bestimmten Kern OS-Typen und pathogenen Isolaten: Pathogene extraintestinale Vertreter besitzen in der Regel das Kernoligosaccharid vom Typ R1, während bei nah verwandten kommensalen Isolaten alle fünf bekannten Typen des Kernoligosaccharids zu finden sind (7). Weiterhin wurde der R3-Kernoligosaccharidtyp bei vielen VTEC (verotoxische *E. coli*) Stämmen nachgewiesen (7). Ähnliches gilt auch für *V.*

*cholerae* (siehe Kapitel II 4.2.). Durch die phänotypische Charakterisierung von diversen LPS-Mutanten bei *V. cholerae* O1 und O139 konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen im Kern OS zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Detergenzien und Defensinen führen (188, 194).

Die Gene, welche die Enzyme für die Biosynthese des Kern OS kodieren, sind im *wa\**-Gencluster der Gram<sup>-</sup> Bakterien organisiert. Das Kern OS wird durch sequentiellen Transfer aktivierter Zuckereinheiten an dem Lipid A/ KDO-Vorläufer synthetisiert. Anhand der Proteinsequenzen kann vermutet werden, dass es sich bei den Enzymen der Kern OS-Biosynthese um periphere Membranproteine handelt. Möglicherweise liegen sie auf der cytoplasmatischen Seite der CM als koordinierte(r) Komplex(e) vor. Dies wird durch Experimente bestätigt, bei welchen *in vitro* Glykosyltransferase-Aktivitäten in gereinigten Membranfraktionen gezeigt werden konnten. Neben der KDO ist insbesondere die L-Glycero-D-Manno-Heptose (Hep) am Aufbau des Hauptstranges des Kern OS beteiligt. Die Seitenketten an den Heptosen und die Bereiche im äußeren Kern OS sind bei den verschiedenen Gram<sup>-</sup> Bakterien häufig mit diversen, „ungewöhnlichen“ Zuckern substituiert, was allgemeine Aussagen schwierig macht. Der Transport des Lipid A/ Kern OS-Komplexes erfolgt über den essentiellen ABC-Transporter MsbA, welcher als eine Art Flippase agiert. Der genaue Mechanismus des Transfers ist nicht bekannt und der weitere Transport zur AM bleibt unklar. Ein Modell, wonach MsbA möglicherweise mit einem bislang nicht identifizierten Protein des Periplasmas bzw. der AM interagiert, wird derzeit favorisiert. Als ein potentieller Kandidat wurde das AM-Protein Omp85 aus *Neisseria meningitidis* beschrieben (91). Die vorwiegende Aufgabe von Omp85 ist aber der Transport von Proteinen zur AM. So zeichnen sich *omp85*-Mutanten durch schwerwiegende Defekte in der Zusammensetzung der AM aus. Als zweiter Kandidat wird das AM-Protein Imp gehandelt (34). Mutationen in Imp führen neben einer signifikanten Reduktion des LPS-Anteils in der AM, auch zu einer erhöhten Membranpermeabilität und einer Sensitivitätszunahme gegenüber Detergenzien. Dagegen scheinen die restlichen Bestandteile der AM in einer *imp*-Mutante kaum beeinflusst zu werden. Neben solchen Thesen, welche sich auf einen aktiven Transport stützen, gibt es aber auch Modellvorstellungen, wonach die CM und AM an gewissen Punkten der Zelloberfläche, den „Bayer patches“ (19), in Kontakt treten und so ein Materialtransfer stattfinden kann. Dieses Modell wird durch Experimente gestützt, in denen ein Transport des LPS zur AM auch noch in Spheroplasten gezeigt wurde (257).

An das Kernoligosaccharid schließt sich das hochvariable O Antigen an. Dieses besteht aus polymerisierten Ketten einer definierten Wiederholungseinheit. Dabei ist sowohl die Zahl der Wiederholungseinheiten pro LPS Molekül, als auch die Quantität und Qualität der Zucker einer Untereinheit bei den verschiedenen Bakterien sehr variabel. Die hohe Variabilität des O Antigens kommt durch die Verwendung diverser Zucker mit zahlreichen Modifikationen, deren unterschiedliche Verknüpfung und der endgültigen Kettenlänge zustande. Aufgrund unterschiedlicher O Antigene kann eine Spezies weiter in verschiedene Serogruppen (Serovars) eingeteilt werden. Ähnlich wie in *E. coli* findet man auch bei *V. cholerae* bis zu 200 verschiedene Serogruppen.

Während das O-Antigen für die Integrität der AM kaum eine Rolle spielt, verleiht es dem Bakterium Serumresistenz, Schutz vor Phagozytose und interagiert auf vielfältige Weise mit der Umgebung (99, 196). Bei *V. cholerae* O1 verleiht in der Tat das O Antigen dem Bakterium Serumresistenz, dagegen ist bei O139 die Kapsel von entscheidender Bedeutung (194). Neben diversen anderen Oberflächenstrukturen können auch LPS und Kapsel wichtige Adhäsionsfaktoren sein. Dies wird auch für das O Antigen von *V. cholerae* Stämmen vermutet (22, 49). Natürlich sind gerade die nach außen exponierten hydrophilen Strukturen wie die Kapsel und das O Antigen gute Immunogene. Daher erscheint es nicht verwunderlich, dass Gram<sup>-</sup> Bakterien im Gegensatz zu den stärker konservierten Lipid A- und Kernoligosaccharid-Anteilen im O Antigen eine hohe Variabilität zeigen.

Das O Antigen wird zunächst getrennt vom Lipid A/ Kern OS-Komplex synthetisiert und separat ins Periplasma transportiert. Die Gene für die O Antigen-Biosynthese sind meist an einer bestimmten Region im Chromosom, dem *wb*\*-Gencluster, lokalisiert. Nach bisherigen Erkenntnissen beginnt die Synthese mit einer Startreaktion am membranständigen, hydrophoben Lipidcarrier Undecaprenolphosphat, welches auch unter dem Namen Baktoprenolphosphat bekannt ist. Dabei handelt es sich um ein C<sub>55</sub>-Isoprenoid-Derivat, das auch beim Transport der Peptidoglykan-Untereinheiten und bei manchen Kapselpolysacchariden eine Rolle spielt. Durch Anheftung eines aktivierten Zuckers bildet sich eine hochenergetische Pyrophosphatverknüpfung (PP) zwischen dem Zucker und dem Undecaprenol (Und). Zu den für diese Startreaktion der O Antigen-Biosynthese am besten charakterisierten Enzymen gehören die Galaktosyl-1-Phosphat-Transferase WbaP von *S. enterica* und die GlcNAc-1-Phosphat-Transferase WecA von *E. coli* (168, 221, 271). Im weiteren Verlauf der O Antigen-Biosynthese können drei Systeme unterschieden werden (215):

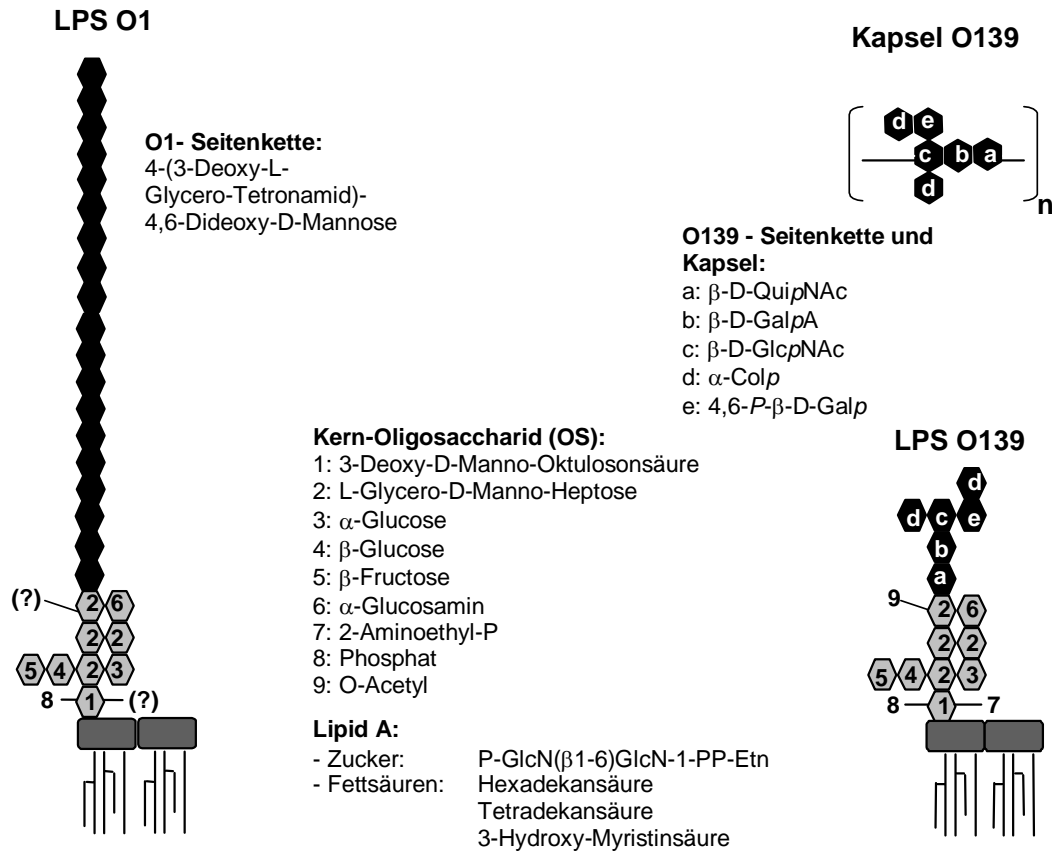
Den Wzy-abhängigen Weg findet man vor allem bei O Antigenen die aus heterologen, oft verzweigten Zuckerketten aufgebaut sind, beispielsweise bei *S. enterica* Serogruppe B und E1. Dieses System benötigt die drei Transmembranproteine Wzx, Wzy und Wzz. Die „Flippase“ Wzx ist der Transporter der O Antigen-Wiederholungseinheiten, welche zuvor im Cytoplasma am Und-P synthetisiert wurden. Anschließend hängt die O Antigen-Polymerase Wzy die vorläufige Kette aus Wiederholungseinheiten, welche am Und-PP gebunden ist, auf eine neue Wiederholungseinheit um, was zu einer Verlängerung der Kette am reduzierenden Ende führt. Dabei dient die freiwerdende Energie der Zucker-PP-Bindung zur Knüpfung der neuen glykosidischen Bindung. Wzx- und Wzy-Proteine verschiedener Bakterien sind stark hydrophob und besitzen in der Regel 10 bis 12 Transmembrandomänen, zeigen aber nur geringe Homologie in ihrer AS-Sequenz (68, 180, 215). Dagegen ist das dritte Protein Wzz relativ gut in den verschiedenen Bakterien in seiner Primär- und Sekundärstruktur konserviert (276). Das ehemals Rol genannte Wzz stellt den Längenregulator dar. Durch Wzz werden LPS-Moleküle mit einer bestimmten durchschnittlichen Anzahl an O Antigen-Wiederholungseinheiten gebildet. Die Abwesenheit von Wzz führt zu einer abnormalen Verteilung der Kettenlänge des O Antigens im LPS.

Lineare unverzweigte O Antigene werden häufig über den ABC-Transporter-abhängigen Weg transportiert. Zu den Vertretern dieses Systems gehören *E. coli* O8 und O9, sowie *Klebsiella pneumoniae* O3 und O5. Dabei wird das O Antigen durch den sukzessiven Zuckertransfer an das nicht-reduzierende Ende des Startzuckers synthetisiert, welcher über die Startreaktion am Und-PP gekoppelt ist. Da es hier zu keinem Transfer von ganzen Wiederholungseinheiten kommt, wird eine O Antigen-Polymerase Wzy nicht benötigt. Der Export des im Cytoplasma synthetisierten O Antigens erfolgt durch einen ABC-Transporter-Komplex, wobei der membrandurchspannende Kanal Wzm und die ATPase Wzt unterschieden werden können. Während die diversen Wzm-Homologe im Hydrophobizitätsdiagramm einheitlich erscheinen, aber nur geringe Ähnlichkeiten in der AS-Sequenz zueinander zeigen, ist die Primärstruktur bei Wzt aus verschiedenen Bakterien durchaus konserviert (215). Obwohl dieses System scheinbar keinen Längenregulator Wzz besitzt, ist die Kettenlänge des O Antigens bei vielen Vertretern dieses Systems streng kontrolliert. Da eine Veränderung der Expressionsstärke von Wzm/ Wzt die Kettenlänge beeinflusst, ist ein Wettlauf zwischen O Antigen-Synthese und dem Export denkbar. Weiterhin wurden an den terminalen Enden des O Antigens bei einigen Vertretern dieses Systems spezielle Modifikationen gefunden, welche möglicherweise die Synthese beenden (202, 251).

Die dritte Möglichkeit der O Antigen-Biosynthese ist das Synthase-abhängige System, welches allerdings bisher nur bei dem O:54 Antigen von *S. enterica* sv. Borreze gefunden wurde (132). Wahrscheinlich spielt dieses System eher beim Transport von Kapselpolysacchariden, wie bei *Streptococcus pneumoniae* bzw. *Streptococcus pyogenes* eine Rolle (215). Synthasen sind integrale Membranproteine, die einerseits die Polymerisation des O Antigens katalysieren, andererseits aber die wachsenden Kette simultan über die CM transportieren.

Erst auf der periplasmatischen Seite der CM erfolgt die Verknüpfung des Lipid A/ Kern OS-Komplexes mit dem O Antigen durch die Oberflächenpolymer:Lipid A-Kern OS-Ligase, kurz O Antigen-Ligase genannt, über einen noch unbekanntem Mechanismus (183). Die Ligase wird im *waa*\*-Gencluster durch das Gen *waaL* kodiert. Bisher konnte kein weiteres Enzym identifiziert werden, dass für diesen Prozess zusätzlich notwendig ist. Obwohl die verschiedenen O Antigen-Ligasen selbst innerhalb einer Spezies eine hohe Diversität in ihrer Proteinsequenz aufweisen, zeigen sie ein ähnliches Bild in Hydrophobizitätsdiagrammen. Dies deutet auf eine ähnliche Topologie hin (107, 215, 230). Die membranassoziierten O Antigen-Ligasen scheinen spezifisch das jeweilige Lipid A/ Kern OS-Substrat zu erkennen, aber hinsichtlich des O Antigens relativ variabel zu sein. So können in *E. coli* durch die Expression fremder O Antigen-Biosynthesegencluster diese fremden O Antigene an den Lipid A/ Kern OS-Komplex angeheftet werden. Es wird angenommen, dass die hohe Diversität von *WaaL* die verschiedenen Kern OS-Typen reflektiert. Die Anheftungsstelle des O Antigens am Kern OS ist bei den unterschiedlichen Serogruppen weder durch eine definierte Position noch durch einen bestimmten Zucker festgelegt.

(Übersichtsartikel zu 4.1.: 195, 215, 276, 216, 230)

4.2. Das LPS von *V. cholerae*

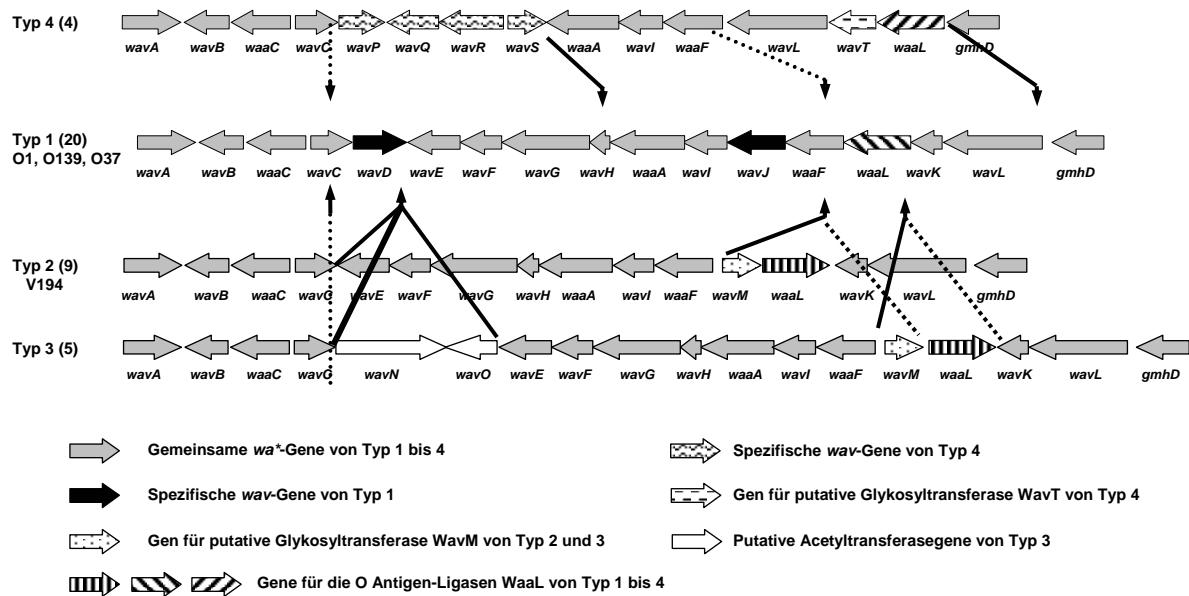
**Abbildung II.3: Struktur des LPS von *V. cholerae* Serogruppe O1 (links) und O139 (rechts).** Für O139 ist zusätzlich die Zusammensetzung der Kapsel gezeigt. Modifikationen im Kernoligosaccharid, welche bisher nur bei O139 nachgewiesen werden konnten, sind bei O1 mit (?) gekennzeichnet. Der Aufbau wurde von den bisher publizierten Daten abgeleitet (37, 62, 134, 137, 139, 247, 264).

Durch molekulare Strukturanalysen von mehreren Isolaten der Serogruppe O1 und O139 konnte die Zusammensetzung und der Aufbau des LPS charakterisiert werden. Die Struktur des LPS der Serogruppe O1 und O139 von *V. cholerae* ist in Abbildung II.3 dargestellt. Für O139 ist zudem die Kapsel-Untereinheit angegeben, welche aus dem gleichen Material wie das O139 Antigen aufgebaut ist. Das Lipid A besteht in beiden Fällen aus dem klassischen  $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidisch verknüpften GlcN-Disaccharids, welches mit verschiedenen Fettsäuren verestert ist. Dabei treten Hexadekan und Tetradekansäuren am häufigsten auf. Die freie 1'-Position des GlcN-Disaccharid ist mit Phosphoethanolamin substituiert.

Im Gegensatz zum Lipid A unterscheiden sich die beiden O Antigene von O1 und O139 sehr stark. Das O1 Antigen besteht aus einem einfach aufgebauten, linearen Homopolymer von 16-18 Perosamin-Einheiten, die über eine Amidbindung mit 3-Deoxy-L-Glycerotetronat substituiert sind. Die entsprechenden Biosynthesegene sind im *wbe*-Gencluster lokalisiert. Die



O1/ O139-Stämmen bekannt (61, 138, 265). Danach ist der Hauptstrang bestehend aus einer KDO und den Hep I bis III bei allen bisher untersuchten *V. cholerae* vorhanden. Während das Kern OS von einem Nicht O1/ O139-Stamm sehr ähnlich zu dem von O1 und O139 ist, zeigt der Stamm H11 deutliche Unterschiede in den Seitenketten des Kern OS.



**Abbildung II.5: Die verschiedenen *wa*\*-Gencluster von *V. cholerae* (nach 191).** Gezeigt sind die *wa*\*-Genclustertypen 1 bis 4, wobei mögliche Rekombinationsstellen zur Insertion oder Deletion bestimmter Gene durch Pfeile zwischen den Genclustern angedeutet sind. Dazu wurde Typ 1 als Standard festgelegt. Gene, die in allen Typen vorkommen sind grau markiert, spezifische Gene durch veränderte Farbgebung oder Muster hervorgehoben. Die unterschiedliche Schattierung von *waaL* bei den einzelnen Typen deutet die geringe Ähnlichkeit zueinander an. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der untersuchten Stämme der jeweiligen Typen an.

Die Gene für die Kern OS-Biosynthese sind im *wa*\*-Gencluster kodiert. Vergleichende Analysen dieser Region bei 38 verschiedenen *V. cholerae* Isolaten in unserer Arbeitsgruppe deckten mindestens vier verschiedene Genclustertypen auf (191). Diese sind in Abbildung II.5 schematisch dargestellt. Über weite Teile sind die Gencluster durchaus ähnlich, unterscheiden sich aber an speziellen Stellen durch die Anordnung und Zusammensetzung der Gene. Es ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Typen durch horizontalen Gentransfer entstanden sind. Mögliche Orte für Rekombinationsereignisse sind in Abb. II.5 eingezeichnet. Einen dieser Orte stellt die Region um das Gen *waaL* dar, welches für die O Antigen-Ligase kodiert. Während die O Antigen-Ligasen von Typ 2 und 3 mit 80% relativ ähnlich sind, weisen die O Antigen-Ligasen von Typ 1, Typ 2 bzw. 3 und Typ 4 zueinander nur eine Ähnlichkeit von unter 30% auf. Neben *waaL* kodiert in den *wa*\*-Genclustertypen 2 bis 4 jeweils eine putative Glykosyltransferase WavM oder WavT, deren Auftreten mit jeweils einer bestimmten O Antigen-Ligase korreliert. Beim *wa*\*-Genclustertyp 1 fehlt eine solche spezifische putative



Glykosyltransferase. Alle pathogenen Stämme (Serogruppen O1, O139 und O37) besitzen den Genclustertyp 1, während man bei den apathogenen Umweltstämmen (Nicht O1/ O139-Isolate) die Typen 2 bis 4 findet. Die Typ 1 spezifischen Gene *wavJ* und *wavD* konnten demnach bisher nur bei pathogenen Stämmen gefunden werden. Diese Information lässt eine Korrelation zwischen einem bestimmten Kern OS-Typ und den pathogenen Vertretern von *V. cholerae* vermuten. Aus diesen Befunden kann insgesamt gefolgert werden, dass die gleich ausgebildeten Kern OS-Bereiche bei pathogenen Stämmen scheinbar eine wichtige Grundvoraussetzung darstellen, welche gerade diese Stämme zur Ausbildung der Cholera prädestinieren. Durch die phänotypische Charakterisierung von diversen LPS-Mutanten bei *V. cholerae* O1 und O139 konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen im Kern OS zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber membranangreifenden Substanzen wie beispielsweise Detergenzien oder Defensine führen (188, 194, 229). Möglicherweise bietet der Kern OS-Typ 1 durch eine verbesserte Membranintegrität einen Selektionsvorteil im Wirt und erhöht damit die Virulenz des Bakteriums. Dagegen wirkt sich ein Verlust des O1 Antigens bzw. der Kapsel bei O139 negativ auf die Resistenz gegenüber Humanserum aus (188, 194). In vivo Experimente am Mausmodell ergaben, dass Kern OS und O Antigen (sowie die Kapsel bei O139) bei der Kolonisierung von *V. cholerae* eine wichtige Rolle spielen (188, 194). Eine Funktion der O Antigene bzw. der Kapsel bei der Adhäsion an die Darmepithelzellen wird derzeit diskutiert. Somit leistet das LPS von O1 und O139 einen wichtigen Beitrag zur Virulenz von *V. cholerae*.

(Übersichtsartikel zu 3.3: 37, 47, 48, 134, 137, 139, 160, 247, 264)

## 5. Osmotischer Stress und Osmoadaptation

*V. cholerae* ist, wie auch viele andere Mikroorganismen, einer sich ständig verändernden Umwelt ausgesetzt. Häufig sind Schwankungen im pH-Wert, der Temperatur, der Feuchtigkeit, dem Nahrungsangebot und der Osmolarität zu beobachten. Fakultativ pathogene Bakterien müssen sich neben den wechselnden Bedingungen in der Umwelt, zusätzlich an die Verhältnisse im Wirt anpassen können. Für den aquatischen Organismus *V. cholerae*, welcher insbesondere in Mündungsgebieten von Flüssen zu finden ist, stellt die Adaptation an die Osmolarität der Umgebung eine wichtige Voraussetzung zum Überleben dar.

Bakterien müssen grundsätzlich einen höheren osmotischen Druck als ihre Umgebung aufbauen, um einen gewissen Zellturgor zu erhalten. Dieser gilt als die treibende Kraft für das Wachstum und die Teilung der Zelle (65).

Hypotonische Bedingungen würden durch einen passiven Wassereinstrom zum Platzen der Zelle führen. Dem wird durch unspezifischem Transport von Soluten durch spannungssensitive Kanäle oder Aquaporine und spezifischem Export von Substanzen entgegengewirkt (40, 151, 250).

Unter hypertonen Bedingungen hingegen kommt es zum Ausstrom von Wasser aus der Zelle und somit zur Dehydratation. Die steigende Ionenkonzentration im Cytoplasma stört zelluläre Prozesse, wie DNA-Replikation, Proteininteraktionen und damit den gesamten Metabolismus. Grundsätzlich erfolgt eine Anpassung an hypertone Bedingungen durch zwei Mechanismen: Einerseits durch die Aufnahme von anorganischen Ionen, insbesondere  $K^+$  und  $Cl^-$ . Diese Strategie ist vor allem bei extrem halophilen Prokaryoten zu finden (89, 263). Andererseits ist bei der Mehrzahl der Prokaryoten eine Aufnahme von  $K^+$  nur die erste, schnelle Antwort auf eine steigende Osmolarität im Medium (79), welche langsam in die Aufnahme bzw. Synthese von osmoprotektiven Soluten übergeht. Dabei werden die importierten anorganischen Ionen durch diese organischen kompatiblen Solute ersetzt (39). Kompatible Solute, zu welchen beispielsweise Trehalose, Prolin, Carnitin, Glycin-Betain und Prolin-Betain zählen, sind hochlösliche Stoffe, die bei physiologischem pH keine Netto-Ladung aufweisen und trotz hoher Konzentration nicht in essentielle zelluläre Mechanismen eingreifen (133, 223, 239). Vor allem Betain und Ectoin sind für *V. cholerae* relevant, da Betain aus der Umgebung über ein Transportsystem aufgenommen und Ectoin ausgehend von Aspartat durch die Genprodukte des *ect*-Operons EctA, B und C synthetisiert werden kann. Mutanten im *ect*-Operon zeigen im Vergleich zum Wt mit zunehmender Salzkonzentration einen Wachstumsdefekt, der durch Zugabe von Betain aufgehoben werden kann (210).

Neben dem Einfluss auf kompatible Solute und Transporter werden durch die Veränderung der Osmolarität noch weitere Systeme der Zelle beeinflusst. So werden beispielsweise unter anhaltenden hypertonen Bedingungen vermehrt zwitterionische Phospholipide in die AM eingelagert, um die Hydrathülle zu stabilisieren (239). Weiterhin wird die Anzahl der negativ geladenen „Membrane-derived oligosaccharides“, welche zum Aufbau des Donnan-Potentials über die AM beitragen, verringert (176). Über das Zwei-Komponenten-System EnvZ/ OmpR wird in *E. coli* die Expression von OmpC gesteigert, während OmpF reprimiert wird (65). Dadurch wird die Abundanz der Porine OmpC und OmpF in der AM geändert.

Während die meisten biologischen Antworten auf der Erkennung bestimmter Signalmoleküle durch spezifische Rezeptoren beruhen, unterscheidet sich die Osmoregulation dadurch, dass

kein bestimmtes Molekül, sondern ein physiologischer Parameter gemessen werden muss. Über die eigentliche Erfassung ist wenig bekannt, wahrscheinlich spielen aber der interne hydrostatische Druck, sowie die interne und externe Osmolarität eine wichtige Rolle. Dabei werden die einzelnen Systeme auf verschiedenen Ebenen, in der Regel durch Veränderung der enzymatischen Aktivität und/ oder der Transkription, reguliert (239).

Innerhalb dieser regulatorischen Prozesse nimmt das Zwei-Komponenten-System EnvZ/ OmpR eine besondere Stellung ein. Neben der Transkriptionskontrolle von *ompC* und *ompF* (siehe Kapitel II 3.), reguliert dieses System in *Shigella* und *Salmonella* auch noch Virulenzgene. Mutationen in *ompR* führen in *Shigella dysenteriae* und *Salmonella thyphimurium* zu einer dramatischen Reduktion ihrer Virulenz (26, 74). Dies ist aber nicht nur durch den Einfluss auf die Porine zu begründen. Ferner wurde gezeigt, dass EnvZ/ OmpR in *Salmonella* das Zwei-Komponenten-System SsrA/ B reguliert, welches seinerseits wichtige Virulenzgene kontrolliert (148). Dabei scheint EnvZ nicht nur auf Veränderungen der Osmolalität, sondern auch auf Schwankungen im pH zu reagieren (239).

## 6. Zielsetzung der Arbeit

Der Beitrag des O Antigens und des Kern OS der pathogenen Serogruppen O1 und O139 zur Virulenz von *V. cholerae* ist nicht ausreichend verstanden, obwohl LPS-Mutanten erste Hinweise hierzu geliefert haben. Ein Teil der Dissertation hatte daher das Ziel die Eigenschaften von O Antigen und Kern OS hinsichtlich der Virulenz, sowie den Transport und die Biosynthese von LPS zu charakterisieren. Dabei standen folgende Zielsetzungen im Vordergrund:

In einem Projektteil sollte das ganze O Antigen- bzw. Kern OS-Biosynthesegencluster von einem pathogenen *V. cholerae* O1 Stamm gegen entsprechende Gencluster aus apathogenen Bakterien ausgetauscht und somit eine Art Hybridstamm etabliert werden. Der Einfluss beider LPS-Komponenten (O Antigen und Kern OS) auf die Virulenzfähigkeit des Cholera-Erregers sollte anschließend mittels der Kolonisierungsfähigkeit dieser Hybridstämme untersucht werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung spezifischer LPS-Unterschiede zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen. Aus diesem Grund wurden die Aktivitäten der Kern OS-Biosynthesegenprodukte WavD und WavJ, welche bisher nur im *wa\**-Genclustertyp 1 der virulenten *V. cholerae* Isolate nachgewiesen werden konnten, charakterisiert.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Charakterisierung der O Antigen-Ligase WaaL von *V. cholerae*. Neben der Topologie von WaaL sollten die strukturellen Voraussetzungen des Kern OS für die Ligase-Reaktion ergründet werden. Durch systematische Erzeugung von *wa\**-Mutanten in *V. cholerae* wurden Genprodukte identifiziert, welche für die Anheftung des O Antigens essentiell sind. Weiterhin wurden vergleichende Analysen zwischen verschiedenen O Antigen-Ligasen unterschiedlicher Gram<sup>-</sup> Bakterien durchgeführt.

Ein weiterer Abschnitt der Arbeit hatte das Ziel, die O Antigen-Transportsysteme von *V. cholerae* O1 und O139 zu charakterisieren.

Eine zusätzliche Zielvorstellung war die Betrachtung der Stressantwort auf Schwankungen in der Osmolarität, denen *V. cholerae* in der Umwelt häufig ausgesetzt ist. Jedoch ist über die physiologischen Anpassungen, mögliche Adaptationsmechanismen und Regulationssysteme von *V. cholerae* wenig bekannt. Durch eine Mutagenese mit einem eigens konstruierten Transposonsystem sollte zunächst eine Mutantenbank von *V. cholerae* erstellt werden. Durch ein promotorloses Reporter-gen im Transposon sollten dabei Insertionen in Genen etabliert werden, welche bereits unter *in vitro* Bedingungen exprimiert werden und nicht essentiell sind. Durch phänotypische Analyse der Transposonmutanten auf gehemmtes oder ausbleibendes Wachstum unter hypertonischen Bedingungen konnte das Zwei-Komponenten-System OsmRK identifiziert werden, dass im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht wurde.

## III Material und Methoden

### 1. Antiseren, Bakteriophagen, Bakterien, Oligonukleotide und Plasmide

In dieser Arbeit wurde ein O139-Antiserum aus Kaninchen gegen *V. cholerae* der Serogruppe O139 (polyvalent) (194), ein O1 Inaba-Antiserum (Difco) aus Kaninchen gegen *V. cholerae* der Serogruppe O1 Inaba, sowie monoklonale Anti-Penta-His-Antikörper (Qiagen) aus der Maus verwendet. Zur Detektion im Western Blot wurden Meerrettichperoxidase gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-Antikörper (Dianova) aus der Ziege als Sekundäntikörper und der ebenfalls Meerrettichperoxidase gekoppelte Anti-PhoA-Antikörper (BioTrend) verwendet. Für den Nachweis im Elektronenmikroskop standen mit Gold (6 nm) markierte Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova) aus dem Esel zur Verfügung.

Der lytische *V. cholerae*-Bakteriophage K139.cm9 (189) wurde zur Charakterisierung von Mutanten benutzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide sind in den Tabellen III.1 bis III.3 aufgeführt.

**Tabelle III.1: Bakterienstämme.** Die Bakterienstämme wurden als Glycerin-Kulturen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt; zu 1 ml einer über Nacht (ÜN) gewachsenen Kultur (ÜNK) wurden 500  $\mu\text{l}$  Glycerin (70%) gegeben und eingefroren. (c: klinisches Isolat; e: Umweltilolat, h: menschliches Isolat)

Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> (DE3), pLysS (Cm <sup>r</sup> )	Invitrogen
CC118	<i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74phoAA20 galE galK thi rsE rpoB argE<sub>am</sub> recA1</i>	(162)
CC313	CC118 pOxygen, Km <sup>r</sup>	(162)
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>argF lac</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ) <i>supE44 thi-1 gyrA69 relA1 <math>\lambda</math></i>	(101)
GM2163	F <sup>-</sup> <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 supF58 lacY1</i> / $\Delta$ ( <i>lacIZY</i> )6 <i>galK2 galT22 metB1 trpR55</i>	New England Biolabs
IS212	KS272 $\lambda$ 11.10, <i>bor::TnphoA</i>	(15)
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>rpsL 150</i> (Sm <sup>r</sup> ) <i>relA1flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	New England Biolabs
MM294	Helferplasmid pRK2013 für Dreifach-Konjugation	J. J. Mekalanos
SM10 $\lambda$ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu <math>\lambda</math>pirRK6</i> , Km <sup>r</sup>	(177)

Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
TOP10F <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> [ <i>laq<sup>d</sup></i> , Tn10(Tc <sup>R</sup> )] <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm <sup>r</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
XL1-Blue	F <sup>+</sup> ::Tn10 <i>proA+B+</i> <i>lac<sup>d</sup></i> Δ( <i>lacZ</i> )M15/ <i>recA1 endA1 gyrA46</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1 lac</i>	New England Biolabs
<b><i>S. enterica</i></b>		
SARC1	<i>S. enterica</i> sv. Thyphimurium (serotype 1,4,[5],12:i:1,2)	C. Whitfield
SARC6	<i>S. enterica</i> sv. Arizonae IIIA (serotype 62:z4,z23:-)	C. Whitfield
SL3749	<i>S. enterica</i> sv. Thyphimurium LT2 <i>walL446</i> , O Antigen <sup>-</sup>	C. Whitfield
<b><i>V. cholerae</i></b>		
AI1837	O139, c, 1993 Bangladesh, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(111)
AI1838	O139, c, 1993 Bangladesh, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i> , Sm <sup>r</sup>	(111)
AI1841	O139	J. J. Mekalanos
AI1852	O139	J. J. Mekalanos
AI4450	O139, c, 1993 Bangladesh, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(111)
C6709	O1 El Tor, c, 1991 Peru, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(266)
CO966	O1 El Tor, Ogawa, 1994 Indien, O Antigen-Defekt, Hämolyse <sup>+</sup> , Biofilm <sup>+</sup> , Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	J. J. Mekalanos
CO968	O1 El Tor, Ogawa, 1994 Indien, O Antigen-Defekt, Hämolyse <sup>-</sup> , Biofilm <sup>-</sup> , RNase <sup>-</sup> , Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	J. J. Mekalanos
CO970	O1 El Tor, c, 1994 Indien, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i> , Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	(193)
F1873	O1 El Tor, c, 1993 Zaire, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i> , Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	J.J. Mekalanos
F1875	O1 El Tor, Inaba, Zaire 1993, Hämolyse <sup>+</sup> , Biofilm <sup>+</sup> , RNase <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	J. J. Mekalanos
M654	O1 El Tor, Indien 1991, Hämolyse <sup>-</sup> , Biofilm <sup>-</sup>	(130)
M799	O1 El Tor, c, 1989 Hong Kong, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(130)
M804	O1 El Tor, c, 1962 Indien, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(129)
M807	O1 El Tor, c, 1966 Vietnam, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(130)
M817	O1 El Tor, c, 1974 Tschad, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(130)
MAK757	O1 El Tor, c, 1937 Celebes, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup></i>	(170)
O395	O1 klassisch, c, 1964 Indien, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i> , Sm <sup>r</sup>	(170)
O83	O6, e, Wasser, 1993 Argentina, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose/ M.Waldor
O103		K. E. Klose
A2-2	nicht O1, nicht O139, e, 2000 Rio Grande Texas, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup></i> <i>ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose
B2-3(5)	nicht O1, nicht O139, e, 2000 Rio Grande Texas, <i>toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose

Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
B2-2 (6)	O41, e, 2000 Rio Grande Texas, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose
Ch83	NAG1, Sakazaki Japan vor 1970	J. Bockemühl
Ch84	nicht O1, nicht O139, 1970 Japan, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch154	NAG LK256, h, Stuhlprobe, 1972 Togo	J. Bockemühl
Ch187	NAG A 1146, h, Stuhlprobe, 1972 Togo	J. Bockemühl
Ch309	NAG18/72, h, Stuhlprobe, 1972 Togo	J. Bockemühl
Ch359	nicht O1, nicht O139, h, Stuhlprobe, 1972 Togo, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch430	nicht O1 nicht O139, e, Wasser, 1972 Togo, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch433	nicht O1 nicht O139, e, Fisch, 1972 Togo, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch457	nicht O1 nicht O139, e, Wasser, 1972 Togo, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch757	S31/77, h, Gallenblase, 1997 Würzburg	J. Bockemühl
ATCC25872	nicht O1 nicht O139, c, 1965 Tschechei, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	(128)
Ch762	nicht O1 nicht O139, h, Blut, 1983 Malta, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup></i>	J. Bockemühl
E8498	O141, e, 1978 Louisiana, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	(280)
Ch780	nicht O1 nicht O139, h, Blut, 1985 Deutschland, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch821	nicht O1 nicht O139, h, 1998 Kenia, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch18022	nicht O1 nicht O139, e, 1981 Elbe Deutschland, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	J. Bockemühl
Ch18117/1	nicht O1 nicht O139, e, 1982 Elbe Deutschland	J. Bockemühl
Ch18133	nicht O1 nicht O139, e, 1986 Elbe Deutschland	J. Bockemühl
2559-78	O1, e, Krabbe, Louisiana, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	(226)
3223-74	O1, e, 1974 Guam storm drain, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> ompW<sup>+</sup></i>	(226)
V52	O37, c, 1968 Sudan, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	(29)
170/99B	O38, Spanien	K. E. Klose
OA2-3 (1)	O5, e, 2000 Rio Grande Texas <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose
CLP-1	O36, e, Fisch, 2000 Spanien, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose
MO10	O139, c, Indien 1992, K139 lysogen, Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup>	(269)
MO10 <i>lacZ</i>	MO10 <i>lacZ</i> ::pMD13, Apr, Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup>	K. E. Klose
MO10 <i>wbfF</i>	MO10 <i>wbfF</i> ::pGP704, Kapsel <sup>-</sup> , Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup> , Ap <sup>f</sup>	K. E. Klose
MO10 <i>wavL</i>	MO10 <i>wavL</i> ::pGP, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup> , Ap <sup>f</sup>	diese Arbeit
MO10 <i>wbfK</i>	MO10 <i>wbfK</i> ::pGP, Kapsel <sup>-</sup> , O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup> , Ap <sup>f</sup>	diese Arbeit
MO10Δ <i>galEK</i>	MO10 Δ <i>galK</i> Δ <i>galE</i> :: <i>cm</i> , Kapsel <sup>-</sup> , O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup>	(194)
MO10Δ <i>waaL</i>	MO10 Δ <i>waaL</i> ; O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup>	(194)
MO10Δ <i>wavD</i>	MO10 Δ <i>wavD</i> , LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup> , Ap <sup>f</sup>	diese Arbeit
MO10Δ <i>wavJ</i>	MO10 Δ <i>wavJ</i> , LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup> , Ap <sup>f</sup>	diese Arbeit
MO10Δ <i>wavDJ</i>	MO10 Δ <i>wavD</i> Δ <i>wavJ</i> , LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>f</sup> , Cm <sup>f</sup> , Ap <sup>f</sup>	diese Arbeit

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft/ Referenz</b>
P27459	O1 Inaba, El Tor, c, Bangladesh 1976	(206)
P27459-S	O1 Inaba, El Tor, c, Bangladesh 1976, spontan Sm <sup>r</sup>	(188)
P27459 <i>envZ</i>	P27459 <i>envZ</i> ::pGP, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>hutA</i> ::pGPpHoA	P27459-S <i>hutA</i> ::pGPpHoA, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>lacZ</i>	P27459-S <i>lacZ</i> ::pMD13, Ap <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	(188)
P27459 <i>manC</i> ::KanI	P27459-S <i>manC</i> ::KanI, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>manC</i> ::KanI <i>wbeT</i> ::pGPKanII	P27459-S <i>manC</i> ::KanI <i>wbeT</i> ::pGPKanII, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>osmK</i> :: <i>TncatpirkanR</i>	P27459 VCA0565::TncatpirkanR, Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>osmK</i> :: <i>TncatpirkanR</i> <i>ompU</i> ::pGPpHoA	P27459 VCA0565::TncatpirkanR <i>ompU</i> ::pGPpHoA, Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>osmR</i>	P27459 VCA0566::pGP, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>osmK</i>	P27459 VCA0565::pGP, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459VCA0257	P27459 VCA0257::pGP, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>waaL</i>	P27459-S <i>waaL</i> ::pGP704, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	(191)
P27459 <i>waaF</i>	P27459-S <i>waaF</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante; O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	(191)
P27459 <i>wavA</i>	P27459-S <i>wavA</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>wavB</i>	P27459-S <i>wavA</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, quantitativer O Antigen-Verlust, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	(191)
P27459 <i>wavE</i>	P27459-S <i>wavE</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>wavF</i>	P27459-S <i>wavF</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>wavG</i>	P27459-S <i>wavG</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>wavI</i>	P27459-S <i>wavI</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>wavK</i>	P27459-S <i>wavK</i> ::pGP704, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>wzm</i>	P27459-S <i>wzm</i> ::pGP704, O Antigen <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>ectC</i>	P27459-S Δ <i>ectC</i> , Sm <sup>r</sup>	J. Nesper
P27459Δ <i>hutA</i>	P27459-S Δ <i>hutA</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>ompU</i>	P27459-S Δ <i>ompU</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>toxR</i>	P27459-S Δ <i>toxR</i> , Sm <sup>r</sup>	(188)
P27459Δ <i>toxR</i> <i>ompU</i> ::pGPpHoA	P27459-S Δ <i>toxR</i> <i>ompU</i> ::pGPpHoA, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>toxS</i>	P27459-S Δ <i>toxS</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>wav</i>	P27459-S Δ <i>wavD-wavH</i> :: <i>kanR</i> Δ <i>wavI-wavL</i> , LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>wavI-L</i>	P27459-S Δ <i>wavI-wavL</i> , LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit



Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
P27459 $\Delta$ wavI-L::kanR	P27459-S $\Delta$ wavI-wavL::kanR, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavI-L wavD::KanI	P27459-S $\Delta$ wavI-wavL wavD::KanI, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavI-L wavD::KanI wavH::pGPKanII	P27459-S $\Delta$ wavI-wavL wavD::KanI wavH::pGPKanII, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavD	P27459-S $\Delta$ wavD, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavJ	P27459-S $\Delta$ wavJ, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavDJ	P27459-S $\Delta$ wavD $\Delta$ wavJ, LPS-Kern-Mutante, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavL	P27459-S $\Delta$ wavL (Deletion AA 177-289), LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ 1wavL	P27459-S $\Delta$ wavL (Deletion AA 177-483), LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459wavL::KanI	P27459-S wavL::KanI, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459wavL::KanI wavI::pGPKanII	P27459-S wavL::KanI wavI::KanII, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wavLwavA	P27459-S P27459-S $\Delta$ wavL (Deletion AA 177-289) wavA::pGP, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 $\Delta$ wbe	P27459-S $\Delta$ manC-wbeT, O Antigen <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
V194	A2-2, spontan Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
V194waaL	V194 waaL::pGP, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
V194wavL	V194 wavL::pGP, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
V194wavM	V194 wavM::pGP, LPS-Kern-Mutante, O Antigen <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit

**Tabelle III.2: Oligonukleotide.** Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen MWG Biotech und Sigma-Genosys. Unterstrichene Nukleotide geben eingefügte Restriktionsschnittstellen an.

Oligonukleotid	Sequenz
Konstruktion von pGP704-Derivaten zur Erzeugung von Insertionsmutanten:	
envZ-SacI-intern	5'-TTT <u>GAGCTCT</u> GCCCGGCCAGTTGCTGCGT-3'
envZ-XbaI-intern	5'-TTTT <u>CTAGAC</u> GGGTTTGAGGTAATCCATA-3'
hutA-SacI	5'-TTA <u>GAGCTC</u> AGCATTAACAGCGAGACTAGGT-3'
hutA-KpnI	5'-TTA <u>GGTACC</u> AGTGACAGCATTCCAAGGACT-3'
ompU-SacI	5'-TAT <u>GAGCTCT</u> GCGCCAAAGTGTTTCTT-3'
ompU-KpnI	5'-TTA <u>GGTACC</u> AGCGTAGGTATAACGGTTGT-3'
osmR-SacI-intern	5'-AAT <u>GAGCTC</u> GTTATCCTTGATCGCCAACT-3'

Oligonukleotid	Sequenz
osmR-XbaI-intern	5'-TTATCTAGAGCAGTAAATCAAACCTCGGT-3'
osmK-SacI-intern	5'-TTTGAGCTCTTTGATTATAATTCTGCGACGA-3'
osmK-XbaI-intern	5'-TTTTCTAGATATCCCCTTTTCTTAACCATAA-3'
VCA0257-SacI-intern	5'-AAAGAGCTCAATATACCTGGCAAGACATCGCA-3'
VCA0257-XbaI-intern	5'-AAATCTAGAGGTTGCTGTAACGCTCATCGCA-3'
waaL-V194-SacI-intern	5'-TAGAGCTCCTCGCACATCAGTCATAATAAT-3'
waaL-V194-XbaI-intern	5'-TATTTTATCTAGATTGATTCTTATTGT-3'
wavA-SacI-intern	5'-AATGAGCTCAACCTGTTTTCGACTATGTAT-3'
wavA-XbaI-intern	5'-TATTCTAGAGATTATTCGCTGAACCACCACT-3'
wavE-SacI-intern	5'-TTAGAGCTCAGAATTATCAATTTTTGACT-3'
wavE-XbaI-intern	5'-TTTTCTAGAAGCGCTCAGTGACATCCAAT-3'
wavF-SacI-intern	5'-AAAGAGCTCAACTTGGCATTAAACAGTT-3'
wavF-XbaI-intern	5'-TTTTCTAGATTAAAGTGATAAAGCCCGGT-3'
wavG-SacI-intern	5'-TTTGAGCTCAACTTGGCATTAAACAGTT-3'
wavG-XbaI-intern	5'-TTTTCTAGATATTCTAAGCGATAGGAAAT-3'
wavI-SacI-intern	5'-TTAGAGCTCACTACCGGTTTACCTTAACTAT-3'
wavI-XbaI-intern	5'-AATTCTAGATCTCGGTATTATTTTTAATGCGA-3'
wavL-SacI-intern	5'-ATGAGCTCACTCGCAGTGG-3'
wavL-XbaI-intern	5'-TTTTCTAGAGATAACTGGCTTAGGATTATT-3'
wavM-V194-SacI-intern	5'-TTGAGCTCCCCATCCACTCTTTGCCA-3'
wavM-V194-XbaI-intern	5'-TATCTAGAAAACAACTACATTTACCAACTT-3'
wavK-SacI-intern	5'-TCTATCGAGCTCAATGGCAACAA-3'
wavK-XbaI-intern	5'-AAATCTAGAACCTATATAAATACTTTTAGCCGGA-3'
wbfK-SacI-intern	5'-TATGAGCTCTATAGGTAAAGTGCTTCAGGTATTT-3'
wbfK-XbaI-intern	5'-TTATCTAGAGCTGAAAAAATTGCACCGCTCAA-3'
wzm-SacI-intern	5'-AATGAGCTCGGTCTAAATTTGGACAAACTT-3'
wzm-XbaI-intern	5'-TTATCTAGACTTAAACTCAACGAAATGACA-3'
Konstruktion von pKEK-Derivaten zur Erzeugung von Deletionsmutanten:	
hutA1-SacI	5'-TTTGAGCTCTCCTATTGATAGTTCACACCGCCA-3'
hutA2-NcoI	5'-TTTCCATGGTTTTCTTCGATACCTCGGATATT-3'
hutA3-NcoI	5'-TTTCCATGGGATAGATTTATGCCTATTGTA-3'
hutA4-XbaI	5'-TTATCTAGAACAAATAATTCATTTTCATCACCTTTT-3'
toxS1-SacI	5'-AAAGAGCTCAATATGCCGAATAACCACCCTGAT-3'
toxS2-KpnI	5'-TTTGGTACCATTTTGGACTGCCATTCTCGA-3'
toxS3-KpnI	5'-TTTGGTACCGTACTGTTTCAGTAATTCTTAACCT-3'
toxS4-XbaI	5'-AATTCTAGATACAATGAAGGTGATATCGGTT-3'
wavD1-SmaI	5'-TCCCCCGGGCCGCTCGCGTACAAAAACAT-3'
wavD2-SalI	5'-TTTTGTCGACCTCCTTCCCAAGTAGATACG-3'

Oligonukleotid	Sequenz
wavD3-Sall	5'-TCGGGTCGACGTTGACGGAGATGAACTTGG-3'
wavD4-ApaI	5'-GTAAGGGCCCAGATCTCCGCACTACTCGATG-3'
wavJ1-SacI	5'-AAAGAGCTCTGGTTTGAAAAAGG-3'
wavJ2-BglII	5'-TATAGATCTTAATGTCTTGTGCT-3'
wavJ3-BglII	5'-TATAGATCTGCAGTGATTGAGCAAACCAT-3'
wavJ4-XbaI	5'-TATCTAGACGGCTTTTCACCATT-3'
wavL1-SacI	5'-ATGAGCTCACTCGCAGTGG-3'
wavL2-BamHI	5'-AAGGATCCACTGAGTCGGCCAATGATA-3'
wavL3a-BamHI	5'-TAGGATCCAGCAAATCCCCGCTTTGA-3'
wavL3b-BamHI	5'-TTAGGATCCCTTTTTGAGTAAGCTCAGTGAAT-3'
wavL4-XbaI	5'-AATCTAGAGTCATGTAACGCTTTAACTT-3'
kanI-BamHI	5'-ATGGATCCCTCAACTCAGCAAAAAGT-3'
kanI-EcoRI	5'-TAGAATTCCGACTCGTCCAACATCAATA-3'
kanII-SacI	5'-TAGAGCTCATGGATGCTGATTTATATGGGT-3'
kanII-NcoI	5'-TCCCATGGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGT-3'
manC1-SacI	5'-TTGAGCTCGATGTTTATACCTGTAATTATGGCT-3'
manC2-BamHI	5'-TAGGATCCACTGGCTAAATACTGCTCAGCAA-3'
manC3-EcoRI	5'-TTGAATTCTCACGATTACGATTTTATT-3'
manC4-XbaI	5'-TTTCTAGATCTGGTTTTCCGTGATTACTT-3'
wbeT-NcoI	5'-TACCATGGCTGTGCAATAGGTGAGAATGA-3'
wbeT-XbaI	5'-TTTCTAGATGTTTCAGCGGATGATAATGGAT-3'
wavD1-SacI	5'-ATGAGCTCTAGCTATAAACATGAAGAGTAAA-3'
wavD2-BamHI	5'-ATGGATCCGCGAAATAATTAGAACAACAAGCCT-3'
wavD3-EcoRI	5'-TTGAATTCTTCTTCTCTGATTTTTTCCAATTT-3'
wavD4-XbaI	5'-TTTCTAGAAGTTTAATGGAGTGTTTTTAGTTTT-3'
wavH-NcoI	5'-AACCATGGATCTCTTCTAAATTCATCGAGGCA-3'
wavH-XbaI	5'-TTTCTAGATATCACCCACGCACTCATCA-3'
wavI3-HindIII	5'-TTAAGCTTCCATGGGGGTGTATCACT-3'
wavI-NcoI	5'-TTCCATGGGGGTGTATCACT-3'
wavI-XbaI	5'-AATCTAGAGGTTTCGCCATACTGTAA-3'
wavL2-HindIII	5'-TTAAGCTTACTGAGTCGGCCAATGATA-3'
wavL3-EcoRI	5'-TAGAATTCCAGCAAATCCCCGCTTT-3'
Konstruktion von Expressionsplasmiden:	
wavJ-5'-SacI	5'-CTGAGCTCAACTAAAACCTGCACAA-3'
wavJ-3'-XbaI	5'-AATCTAGAGGAAACACCCAATGAAATG-3'
wavD-5'-NcoI	5'-TTCCATGGTATTCGATCAGATTACA-3'
wavD-3'-HindIII	5'-AAAAGCTTGTTACTATAGAAATCAAATAGG-3'
wbfK-5'-SacI	5'-TTAGAGCTCATTCTTAGTGATATTAATCGAGAGA-3'

Oligonukleotid	Sequenz
wbfK-3'-XbaI	5'-TTATCTAGACTTTATTACAAGGCATATAGTCAT-3'
wbeH-5'-SacI	5'-AATGAGCTCTGAGGAATATATGAGACAAAA-3'
wbeH-3'-XbaI	5'-AATTCTAGATAGCTCTATCATACTACACCCA-3'
wavL-5'-EcoRI	5'-AAGAATTCCAAAAGAGAATATGTAAGAAA-3'
wavL-3'-BamHI	5'-AAGGATCCGGTGTAATTAAGTAGTGAGA-3'
wavL-N-term-up	5'-AGGAGATCTTTGAAGGTCAGAGT-3'
waaL-V194-5'-SacI	5'-TAGAGCTCCGAGTGCCACTTTATAGAA-3'
waaL-V194-3'-KpnI	5'-TAGGTACCGATAACTCAGCAGCAGCAGGCAA-3'
wavM-V194-5'-SacI	5'-TTGAGCTCTAATCTGACCCAGTTTGATAAT-3'
wavM-V194-5'-KpnI	5'-AAAGGTACCTAATCTGACCCAGTTTGATAAT-3'
wavM-V194-3'-KpnI	5'-TTAGGTACCAACTTAGAGATGAATTTATTT-3'
waaL-O1-5'-NheI	5'-CTAGCAGCTAGCATTAGTTGGAACACGACCCT-3'
waaL-O1-3'-KpnI	5'-AAGGTACCATATCGCCAACCCAAGAAGAAGG-3'
waaL-O1-up-NcoI	5'-TTCCATGGTTTGCTTAAATTTTATTTTTCTTACATTGACGA-3'
waaL-O1-down-NcoI	5'-TTCCATGGTTTTTACTCTAATCAGTTTTTTATTA-3'
waaL-V194-5'-NheI	5'-TATGCTAGCCGAGTGCCACTTTATAGAAAACCGA-3'
waaL-V194-upNcoI	5'-TTCCATGGCATAATATTTCCATCTCAGTTTAATTGT-3'
waaL-V194-downNcoI	5'-TTCCATGGTGACACTATCCGTTACTGTGCTCTCT-3'
osmK-5'-SacI	5'-TTTGAGCTCGAATATCTCTTTACCGGATAA-3'
osmK-3'-XbaI	5'-TTTTCTAGACCGTCAGCGAGGTTTTTATCAT-3'
ompU-5'-SacI	5'-ATAGAGCTCAAATCTTTATGCTTTATGGTTGAA-3'
ompU-3'-SphI	5'-ATAGCATGCAGTATAACGAGATAGAAAACGCCT-3'
core1-KpnI	5'-AAGGTACCTTTCGCCGATAAACGCAGGATA-3'
core2-BamHI	5'-TAGGATCCGAATTAGGTTTTACTAAGGAAT-3'
core3-BamHI	5'-TAGGATCCATACAGTAAAAACGGTGCAGCTAAA-3'
core4-XbaI	5'-ATTCTAGAGCTATGTTGAAAAGCTGATAAA-3'
Konstruktion von Expressionsplasmiden mit His-Tag:	
waaL-start-KpnI	5'-AAAGGTACCATGAATAATAAAATAACTAAAACCTCA-3'
waaL-stop-KpnI	5'-TATGGTACCTCAATTTTTTGGCTCTTTGGCTGCGAT-3'
wavL-topo-up	5'-ATGAATATTTTGATGGCCCTATCCCAA-3'
wavL-topo-down	5'-TTTTTTGTTCATTTTTCTAAATAGATAATTCCCT-3'
wavM-topo-up	5'-ATGAAAATCTACGTAATTAGCCTTAA-3'
wavM-topo-down	5'-TTTTTTATATTCATTAGCAAACATCATTAT-3'
Konstruktion von Punktmutanten:	
waaL-H309A	5'-CACGGTGCCAGAGGTGCCGCACATAGCCAGTATTTT-3'
waaL-H309A-antisense	5'-AAAATACTGGCTATGTGCGGCACCTCTGGGCACCGTG-3'
waaL-H311A	5'-GTGCCAGAGGTCATGCAGCCAGCCAGTATTTGAAGCTAT-3'
waaL-H311A-antisense	5'-ATAGCTTCAAATACTGGCTGGCTGCATGACCTCTGGGCAC-3'

Oligonukleotid	Sequenz
waaL-H309/311A	5'-CACGGTGCCAGAGGTGCCGCAGCCAGCCAGTATTTTGAAGCTAT-3'
waaL-H309/311A-antisense	5'-ATAGCTTCAAATACTGGCTGGCTGCGGCACCTCTGGGCACCGTG-3'
waaL-R186M	5'-GCGACAATCTTAACCTTAACAATGGGAGCCATTTTAACGCTAC-3'
waaL-R186M-antisense	5'-GTAGCGTTAAAATGGCTCCCATTTGTTAAGGTTAAGATTGTCGC-3'
waaLSal-H321A	5'-CCTTTAAAGAATCTATCGGTCCGGCAAATACCATTCTGTACATCTGGT T-3'
waaLSal-H321A-antisense	5'-AACCAGATGTACAGAATGGTATTTGCCGGACGATAGATTCTTTAAAG G-3'
waaLSal-R208M	5'-CCTGGGAACCCTATCGATGGGGGCATGGTTGGC-3'
waaLSal-R208M-antisense	5'-GCCAACCATGCCCCATCGATAGGGTTCCAGG-3'
Konstruktion des Transposonsystems:	
cat-BamHI	5'-ATGGATCCCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAA-3'
cat-KpnI	5'-TTGGTACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAA-3'
kan-BamHI	5'-TTGGATCCTCAGCGTAATGCTCTGCCAGT-3'
kan-NcoI	5'-TACCATGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCA-3'
pir-KpnI	5'-ATGGTACCGATGAGGTTTTTTTTATGAGACTCAAGGTC-3'
pir-NcoI	5'-TTCCATGGTTAATCATCTTTATCGCCAGAAAA-3'
Sonstige:	
lacZ-seq	5'-CCTCTTCGCTATTACGCCAG-3'
phoA-seq	5'-GCTCACCAACTGATAACCAC-3'

Tabelle III.3: Plasmide.

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pACYC177	Klonierungsvektor, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	(224)
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	(225)
pCR <sup>®</sup> T7/ CT-TOPO <sup>®</sup>	Expressionsvektor mit T7 Promotor und C-terminalem His-Tag, IPTG induzierbar, Ap <sup>r</sup>	Invitrogen
pBAD18	Expressionsvektor, Arabinose induzierbar, Ap <sup>r</sup>	(98)
pBAD18-Kan	Expressionsvektor, Arabinose induzierbar, Km <sup>r</sup>	(98)
pBAD24	Expressionsvektor, Arabinose induzierbar, Ap <sup>r</sup>	(98)
pBR322	Klonierungsvektor, Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	(275)
pGEM <sup>®</sup> -T easy	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, Ap <sup>r</sup>	Promega
pGP704	oriR6K <i>mobRP4</i> , Ap <sup>r</sup>	(177)
pKEK229	oriR6K <i>mobRP4 sacB</i> , Ap <sup>r</sup>	(58)
pQE30	Expressionsvektor mit N-terminalem His-Tag, IPTG induzierbar, Ap <sup>r</sup>	Qiagen

<b>Plasmide</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pTrc99A	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, Ap <sup>r</sup>	(6)
pTrc99AKan	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, Km <sup>r</sup>	(189)
pWSK129	Expressionsvektor, IPTG indzierbar, Km <sup>r</sup>	(272)
pKD46	Red Rekombinase Expressionsplasmid, Arabinose induzierbar, oriR101 mit temperatursensitivem <i>repA101ts</i> , Ap <sup>r</sup>	(69)
pOxygen	TnlacZ, Km <sup>r</sup>	(162)
pZT344	Tn10d mit <i>cat</i> von pACYC184, Transposase IPTG induzierbar, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(77)
pWQ322	<i>waaL</i> von SARC6 mit C-terminalem His-tag in pBAD24, Ap <sup>r</sup>	C. Whitfield
pRMB2	<i>manC-T</i> von <i>V. cholerae</i> O1 Ogawa in pBR322-Derivat, Tc <sup>r</sup>	(179)
pSSV1223K	mobilisierbarer Suizidvektor (temperatursensitive Replikation) mit <i>wbf</i> <sub>O139</sub> -Region, O-Antigen <sup>+</sup> , Kapsel <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(83)
pBAD18-KanompU	<i>ompU</i> von P27459 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaL	<i>waaL</i> von P27459 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	(191)
pBAD18-KanwaaL_hybridP27459/P27459	N-terminaler Teil und C-terminaler Teil von <i>waaL</i> von P27459 mit Insertion der AS Methionin nach T <sup>211</sup> und Austausch von V <sup>212</sup> zu L, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaL_hybridP27459/V194	N-terminaler Teil von <i>waaL</i> von P27459 und C-terminaler Teil von <i>waaL</i> von V194, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaL_hybridV194/P27459	N-terminaler Teil von <i>waaL</i> von V194 und C-terminaler Teil von <i>waaL</i> von P27459, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaL_hybridV194/P27459wavM	pBAD18-KanwaaL_hybridV194/ P27459 mit <i>wavM</i> von V194	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaL_hybridV194/V194	N-terminaler Teil und C-terminaler Teil von <i>waaL</i> von V194 mit Austausch der AS AMV <sup>221-223</sup> zu VAL, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaLV194	<i>waaL</i> von V194 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwaaLwavMV194	<i>waaL</i> und <i>wavM</i> von V194 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwavMV194	<i>wavM</i> von V194 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-KanwbfK	<i>wbfK</i> von P27459 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-Kanwzm	<i>wzm</i> von P27459 in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18waaL	<i>waaL</i> von P27459 in pBAD18, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18waaL::TnlacZ's	TnlacZ Hybridfusionen mit <i>waaL</i> von P27459, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18waaL::TnphoA's	TnphoA Hybridfusionen mit <i>waaL</i> von P27459, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBRO1core	<i>wavD-wavH</i> und <i>wavI-wavL</i> in pBR322, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pGEMosmK	VCA0565 von P27459 in pGEM <sup>®</sup> -T easy, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGEMwavL	wavL von P27459 in pGEM <sup>®</sup> -T easy, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGEMwavL(N-term)	N-terminaler Teil von wavL (AS 1- 361) von P27459 in pGEM <sup>®</sup> -T easy, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPenvZ	‘envZ’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPhutAphoA	‘hutA’ von P27459 in pGPphoA, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPphoA	promotorloses phoA aus XL1-Blue in pGP704, Ap <sup>r</sup>	A. Halscheidt
pGPPompUphoA	‘ompU’ von P27459 in pGPphoA, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPosmR	‘VCA0566’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPosmK	‘VCA0565’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwbeTKanII	‘wbeT’ von P27459 und KanII in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPVCA0257	‘VCA0257’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwaaLV194	‘waaL’ von V194 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavA	‘wavA’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavE	‘wavE’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavF	‘wavF’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavG	‘wavG’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavHkanII	‘wavH’ von P27459 und KanII in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavI	‘wavI’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavIkanII	‘wavI’ von P27459 und KanII in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavK	‘wavK’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavL	‘wavL’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavMV194	‘wavM’ von V194 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwavLV194	‘wavL’ von V194 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwbfK	‘wbfK’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGPwzm	‘wzm’ von P27459 in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKDClal	pKD46 verdaut mit Clal und religiert, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK276	$\Delta ompU$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	K. E. Klose
pKEK $\Delta$ kanR	‘wavI’ und ‘wavL’ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK $\Delta$ hutA	$\Delta hutA$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK $\Delta$ toxS	$\Delta toxS$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK $\Delta$ wavD	$\Delta wavD$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK $\Delta$ wavJ	$\Delta wavJ$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK $\Delta$ wavL	$\Delta wavL$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEK $\Delta$ 1wavL	$\Delta 1wavL$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEKmanC::KanI	$\Delta manC::KanI$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEKwavL::KanI	$\Delta wavL::KanI$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pKEKwavD::KanI	$\Delta wavD::KanI$ von P27459 in pKEK229, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pTrc99AwavD	<i>wavD</i> von P27459 in pTrc99A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTrc99AwavJ	<i>wavJ</i> von P27459 in pTrc99A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTrc99AwavL	<i>wavL</i> von P27459 in pTrc99A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTOPOwavL	<i>wavL</i> von P27459 in pCR <sup>®</sup> T7/ CT-TOPO <sup>®</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTOPOwavM	<i>wavM</i> von P27459 in pCR <sup>®</sup> T7/ CT-TOPO <sup>®</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30waaL <sup>P27459</sup>	<i>waaL</i> von P27459 in pQE30, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30waaL <sup>P27459</sup> -R186M	Mutation in <i>waaL</i> von P27459: R <sup>186</sup> zu R, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30waaL <sup>P27459</sup> -H309A	Mutation in <i>waaL</i> von P27459: H <sup>309</sup> zu A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30waaL <sup>P27459</sup> -H311A	Mutation in <i>waaL</i> von P27459: H <sup>311</sup> zu A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30waaL <sup>P27459</sup> - H309/311A	Mutation in <i>waaL</i> von P27459: H <sup>309</sup> zu A und H <sup>311</sup> zu A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWQ322-H321A	Mutation in <i>waaL</i> von SARC6: H <sup>321</sup> zu A, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWQ322-R208M	Mutation in <i>waaL</i> von SARC6: R <sup>208</sup> zu M, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pStSch	pKDClal mit Tn10-System aus pZT344, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pStSchcat	pKDClal mit Tn10d-Cam-System aus pZT344, Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	diese Arbeit
pStSchcatpirkan	pStSch mit <i>cat</i> aus pACYC184, promotorlosem <i>pir</i> aus SM10λpir und promotorlosem <i>kanR</i> aus pACYC177	diese Arbeit

## 2. Geräte und Chemikalien

Die Antibiotika wurden von der Firma Sigma, die Enzyme von den Firmen Invitrogen, Gibco und NEB bezogen.

Für die Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

- Nucleobond AX (Macherey-Nagel) zur Präparation von Plasmid-DNA;
- QIAquick Gelextraction Kit und QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarose-Gelen;
- pGEM<sup>®</sup>-T easy System (Promega) zur direkten Klonierung von Polymerasekettenreaktions (PCR)-Produkten;
- pCR<sup>®</sup>T7 TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit (Invitrogen) zur Konstruktion von His-Tag-Fusionen;
- QuikChange<sup>®</sup> site-directed mutagenesis Kit (Stratagene) zur Erzeugung von gezielten Punktmutanten;
- Protino<sup>®</sup> Ni 1000 prepacked column Kit (Macherey-Nagel) zur Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag;
- Big dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) zur DNA-Sequenzierung;



- ECL direct nucleic acid labelling Kit (Amersham) zur Detektion im Southern und Western Blot;

Amersham Pharmacia Biotech lieferte weiterhin die ECL-Hyperfilme, die Nitrocellulosemembran (Hybond C) und die Nylonmembranen (Nybond N<sup>+</sup>).

In Tabelle III.4 sind die benutzten Geräte aufgelistet.

**Tabelle III.4: Geräte.**

Gerät	Hersteller/ Vertrieb
Analysenwaage	Ohaus Navigator, Sartorius
Autoklaven	Fedegari, MM Selectomat S2000
Automatikpipetten	Gilson, Eppendorf
Elektrophoresekammern für Agarose-Gele	BioRad; MWG Biotech
Elektrophoresekammern für PAA-Gele:	
Mini Protean III	BioRad
Protean II Xi Cell	BioRad
Elektroporationsgerät	EQUIBIO (Easyject prima), BioRad (Gene Pulser und Pulse Controller)
ELISA-Reader	BioRad (Microtiterplate Reader Model 450)
Entwickler	AGFA (Curix 60 und Curomix 60)
Feinwaage	Chyo, Sartorius (Kern 770)
Geldokumentationsanlage	BioRad (GelDoc 2000), Herolab
Geltrockner	BioRad
Hybridisierungsöfen	Hybaid MWG Biotech, Biometra OV5
Inkubator	Heraeus
Kühlzentrifugen	Beckman, Sorvall RC5B und RC5B Plus
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, GLW, Heidolph
Mikrowelle	Privileg, Bauknecht (MW5 1820 Duo)
pH-Meter	WTW pH526 und pH530
Photometer	UNICAM, Pharmacia Biotech (Ultrospec 3000), Hitachi (U-2000)
Schüttler	Kika Labortechnik, Heidolph (Doumax 1030), Biotec-Fischer (Phero-Shaker)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (innova 4300), Braun Biotech International (Certomat R/ H)
Semidry-Blotgerät	BioRad (Trans Blot SD)
Sequenzierer (DNA)	Applied Biosystems ABI377
Spannungsgeräte	BioRad (Power Pac 300 und 2000; Power Supply Model 3000Xi und 500/1000), Consort

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/ Vertrieb</b>
Tankblotgerät (Transfer LPS)	BioRad (Trans Blot Cell)
Thermoblock	Liebisch, FALC
Thermocycler	Eppendorf (Mastercycler Gradient), Hybaid (OMN-E), Biometra (T3)
Tischzentrifugen	Heraeus (Biofuge pico, fresco und R15; Megafuge 1,0 und 1,0R)
Transelektronenmikroskop	Zeiss (EM10)
Ultratischzentrifuge	Beckmann (TL-100)
Ultrazentrifuge	Beckmann (L7-65)
Ultramikrotom	HM500 OM (Zeiss)
UV-Lampe	Herolab UVT 20 LP
UV-Stratalinker	Stratagene (Stratalinker 1800)
Vakuumblotgerät (Transfer DNA)	Pharmacia Biotech (VacuGene XL)
Vakuumverdampfer	Savant (SpeedVac Plus SC110A)
Vortexer	Scientific Industries (Vortex Genie 2), Hartenstein Mixer
Wasserbad	Memmert
Wasserbadinkubatoren	GFL GmbH
Wasserkühlung	Pharmacia Biotech (Multi Temp III)
Zellaufschluss	ThermoSavant (Fast Prep 120), SLM Instrumens/ Thermo Spectronic

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, Materialien und Geräte wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Applichem, BioRad, Eppendorf, Gibco, Greiner, Invitrogen, MWG, New England Biolabs, Roth und Sigma bezogen oder die Hersteller sind an entsprechender Stelle erwähnt.

### 3. Lösungen, Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen

Für die Herstellung aller Lösungen und Medien wurde entweder Ampuwa (Fresenius Kabi) oder Wasser, welches über eine Filteranlage (Milli-Q-Plus, Millipore) entsalzt und filtriert wurde, verwendet.

Die Zusammensetzung der Medien, Medienzusätze und Lösungen ist im Folgenden kurz beschrieben:

#### Medien:

AKI (119, 166)	1,5% Bacto-Pepton 0,4% Hefeextrakt 0,5% NaCl 0,3% NaHCO <sub>3</sub> , pH 7,4
LB (Luria-Bertani) von Difco (158, 175)	25 g ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren
LB-Agar von Difco (158, 175)	32 g ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren
MHB (Müller-Hinton-Bouillon) von Oxoid	21 g ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren (enthält: 2 g/l Rindfleisch/ getrocknete Infusion aus 300 g, 17,5 g/l Caseinhydrolysat, 1,5 g/l Stärke)
M9-Minimalmedium (158)	200 ml 5 x M9-Salze ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren; Zugabe von 2 ml 1M MgSO <sub>4</sub> 20 ml 20% C-Quelle (Glc) 0,1 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>
M9-Minimalagar (158)	200 ml 5 x M9-Salze 16 g Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren; Zugabe von 2 ml 1M MgSO <sub>4</sub> 20 ml 20% C-Quelle (Glc) 0,1 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>

Suc-Agar	5 g Yeast Extract 10 g Trypton 16 g Agar ad 700 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren; nach Erkalten auf ca. 50°C Zugabe von 300 ml sterilfiltrierter Saccharoselösung (33,3%)
TB-Topagar (Trypton-broth) (158, 175)	2 g Trypton 1,6 g NaCl 1,6 g Agar ad 200 ml H <sub>2</sub> O; autoklavieren
TCBS-Agar von Difco (131)	89 g ad 1 l H <sub>2</sub> O; für 30 min erhitzen (enthält: 0,5% Yeast Extract, 1% Bacto peptone, 1,6% Agar, 1% NaCl, 1% NaCitrat, 1% NaThiosulfat, 0,8% Bile, 2% Saccharose, 0,1% FeCitrat, 0,004% Bromthymolblau, 0,004% Thymolblau)
TCS-Agar	5 g Yeast Extract 10 g Bacto peptone 10 g NaCl 16 g Agar ad 900 ml H <sub>2</sub> O; autoklavieren; Zugabe von 100 ml TCS-Lösung

**Medienzusätze:**

(alle Lösungen wurden sterilfiltriert und den abgekühlten Medien <50°C zugeführt)

## Antibiotika:

Ampicillin (Ap)	50 (in Kombination mit einem anderen Antibiotikum) oder 100 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Cm)	30 µg/ml ( <i>E. coli</i> ) oder 2 µg/ml ( <i>V. cholerae</i> ) Endkonzentration Stammlösung 30 bzw. 2 mg/ml in 100% Ethanol
Kanamycin (Km)	50 µg/ml oder 300 µg/ml (Mutagenese mit <i>TnphoA</i> oder <i>TnlacZ</i> ) Endkonzentration, Stammlösung 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O

Streptomycin (Sm)	100 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Tetracyclin (Tc)	12 µg/ml ( <i>E. coli</i> ) oder 1 µg/ml ( <i>V. cholerae</i> ) Endkonzentration Stammlösung 12 bzw. 1 mg/ml in 50% Ethanol
Arabinose	0,02% Endkonzentration Stammlösung 20% in H <sub>2</sub> O
Glucose (Glc)	0,2% Endkonzentration Stammlösung 20% in H <sub>2</sub> O
Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 mM Endkonzentration Stammlösung 1 M in H <sub>2</sub> O
5 x M9-Salze	64 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 g NaCl 5 g NH <sub>4</sub> Cl ad 1 l H <sub>2</sub> O
TCS-Lösung	10 g NaCitrat 10 g NaThiosulfat 1 g FeCitrat 0,04 g Bromthymolblau ad 100 ml H <sub>2</sub> O; einstellen auf pH 8,6
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranosid (X-Gal)	40 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 40 mg/ml in DMSO
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz (X-Phos)	40 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 40 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>Lösungen:</b>	
Lysepuffer/ LPS-Präparation	4,5 ml H <sub>2</sub> O 500 µl 1 M Tris/HCl pH 6,8 800 µl Glycerin 1,6 ml 10% SDS 400 µl β-Mercaptoethanol 3-4 Körner Bromphenolblau

---

P1-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 150 mM NaCl
P2-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>
10 x PBS	8% NaCl 0,2% KCl 1,8% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O 0,24% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> einstellen auf pH 7,4; autoklavieren
PBS/Pepton	1 x PBS mit 0,1% Pepton (BactoPepton, Difco); sterilfiltrieren
Plasmidpräparation:	
Puffer 1	50 mM Tris/HCl pH 8 10 mM EDTA pH 8; autoklavieren Zugabe von 100 µg RNase A/ml
Puffer 2	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer 3	2,8 M KAc; einstellen auf pH 5,1
10 x Proben-Puffer (DNA)	0,5% Sarcosyl 50 mM EDTA pH 8 20% Glycerin 0,05% Bromphenolblau
Proteinaufreinigung:	
LEW	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM NaCl einstellen auf pH 8; autoklavieren
Elutionspuffer	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM NaCl 250 mM Imidazol einstellen auf pH 8; autoklavieren



---

10 x SDS-Laufpuffer	30,2 g Tris 188 g Glycin ad 900 ml H <sub>2</sub> O; lösen 100 ml 10% SDS zugeben pH 8,3 überprüfen, nicht einstellen
Silberfärbung von LPS: Färbelösung	70 ml H <sub>2</sub> O 1,4 ml 1M NaOH 1 ml NH <sub>3</sub> (konz.) 1,25 ml 20% AgNO <sub>3</sub>
2 x Fixierer	250 ml Isopropanol 70 ml Eisessig 180 ml H <sub>2</sub> O
Southern Blot: Lösung I	250 mM HCl
Lösung II	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Lösung III	1,5 M NaCl 0,5 M Tris einstellen auf pH 7,5; autoklavieren
20 x SSC (Transferlösung)	0,3 M NaCitrat 3 M NaCl einstellen auf pH 7
Waschpuffer 1	6 M Harnstoff 0,4% SDS 0,5 x SSC
Waschpuffer 2	2 x SSC
50 x TAE	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8 ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren



---

TEM1	1% BSA 0,1% Tween 20 in 1 x PBS
TEM2	0,1% BSA 0,1% Tween 20 in 1 x PBS
TBS	20 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween-Triton	20 mM Tris/HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,05% Tween 20 0,2% Triton X-100
1 x TE	10mM Tris/HCl pH 7,5 1mM EDTA pH 8 autoklavieren
TMD	50 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1mM DTT
TNE	10 mM Tris/HCl pH 8 10 mM NaCl 10 mM EDTA pH 8 autoklavieren
TNEX	TNE/ 1% Triton sterilfiltrieren
Western-Blot: Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20% Methanol
Blocklösung	TBS mit 5% Magermilchpulver (für LPS) TBS mit 3% BSA oder 10% Magermilchpulver (für Proteine)

Z-Puffer (Reaktionspuffer für $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität)	16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,75 g KCl 0,246 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$ , einstellen auf pH 7; autoklavieren
---	--

Sofern es nicht an betreffender Stelle anders vermerkt ist, erfolgte das Wachstum der Bakterien bei 37°C. Eine ausreichende  $\text{O}_2$ -Versorgung in Flüssigkulturen wurde durch Schütteln gewährleistet. Bakterien wurden auf TCBS- und TCS-Agarplatten bei Raumtemperatur (RT) angezogen, wodurch eine bessere Wirkung der zugesetzten Gallensalze erzielt werden konnte. Wenn möglich wurden den Medien geeignete Antibiotika zugesetzt bzw. Agarplatten mit geeigneten Antibiotika verwendet.

## 4. Mikrobiologische und genetische Methoden

### 4.1. Isolierung spontan streptomycinresistenter *V. cholerae*

Die zur Generierung von Mutanten verwendete Konjugation verlangt eine selektive Anreicherung der Rezipienten, in diesem Fall *V. cholerae*. J. Nesper konnte bereits erfolgreich streptomycinresistente Klone von P27459 etablieren. Da im Zuge dieser Arbeit gezielte genetische Manipulationen an einem Umweltstamm notwendig waren, wurden spontan streptomycinresistente Klone des Stammes A2-2 isoliert. Dazu wurden 5 ml einer A2-2 ÜNK auf 600  $\mu\text{l}$  ankonzentriert und jeweils 200  $\mu\text{l}$  auf eine LB/Sm-Agarplatte ausplattiert.  $\text{Sm}^r$  Kolonien wurden mehrmals gereinigt. Das Antibiotikum Sm inhibiert die Proteinbiosynthese über eine Interaktion mit der 30S Untereinheit des Ribosoms. Resistente Stämme besitzen in der Regel eine Mutation im *rpsL*, dies wurde aber nicht überprüft. Eine Analyse des LPS durch Silberfärbung nach SDS-PAGE zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen  $\text{Sm}^r$  und  $\text{Sm}^s$  Isolaten von A2-2.

### 4.2. Konjugation

Die Konjugation von *pir*-abhängigen Suizidplasmiden (pGP704- und pKEK229-Derivate,  $\text{Ap}^r$ ) wurde zur Konstruktion chromosomaler Insertions- und Deletionsmutanten verwendet. Dabei überträgt der Donor SM10 $\lambda$ *pir* das Suizidplasmid, welches zuvor über Transformation eingebracht worden war, auf den Rezipienten *V. cholerae* (P27459-S, MO10, V194). Für die Konjugation wurden ÜN gewachsene Kolonien des Donors und Rezipienten von einer LB-

Agarplatte abgenommen und flächig auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Um einen engen Kontakt der Bakterien zu erreichen, wurden Donor und Rezipient in einem Winkel von 90° zueinander ausgestrichen. Nach der Inkubation von ca. 6 h bei 37°C wurde von verschiedenen Punkten der LB-Agarplatte Proben entnommen und auf einer LB/Sm/Ap-Agarplatte ausgestrichen. Diese Selektion bewirkt gezielt die Vermehrung der Sm<sup>r</sup> *V. cholerae*, welche das Suizidplasmid aufgenommen und ins Chromosom integriert hatten.

Da die Transformationseffizienz von großen Plasmiden (ab ca. 10 kb) in *V. cholerae*, insbesondere bei LPS-Mutanten, stark abnimmt, wurde z. B. für pRMB2 und pBRO1core eine Dreifach-Konjugation unter Gebrauch des Helferstamms MM294 etabliert. Dazu wurden der Rezipient (*V. cholerae*), der eigentliche Donor (DH5 $\alpha$  mit dem zu transferierendem Plasmid) und der Helferstamm MM294 in einer Flüssigkultur bis zu einer Optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von ca. 1 angezogen, je 200  $\mu$ l jeder Kultur miteinander vermischt und das gesamte Volumen nach und nach mittig auf eine LB-Agarplatte getropft, um ein möglichst dichtes Gemisch zu erzielen. Dabei liefert der Helferstamm die zur Konjugation essentiellen *tra*-Gene auf einem Helferplasmid, welches zunächst in den DH5 $\alpha$  konjugiert wird. Durch die Expression der neu erworbenen *tra*-Gene kann nun dieser ebenfalls als Donor wirken und das gewünschte Plasmid in den Rezipienten transferieren. Die Agarplatte wurde kurz mit offenem Deckel bei RT getrocknet und anschließend ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit LB abgewaschen, in LB verdünnt und auf LB/Sm-Agarplatten, welche ein geeignetes Antibiotikum zur Selektion auf das transferierte Plasmid enthielt, ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mehrmals gereinigt und anschließend analysiert.

### 4.3. Transformation

Für die Transformation von Ligationsansätzen oder Plasmiden in *E. coli* K12-Stämme wurde die Elektrotransformation (Elektroporation) nach Calvin und Hanawalt (41) durchgeführt. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz von bis zu 10<sup>9</sup> Transformanten/ $\mu$ g intakter Plasmid-DNA aus. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 5 ml ÜNK des jeweiligen Stammes beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von ca. 0,8-1 angezogen. Nun erfolgten zwei Waschschriffe (Zentrifugation: 5 min, 5000 rpm, 4°C) mit zunächst 200 ml, dann 100 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O. Nachdem die Zellen in 50 ml eiskaltem 15% Glycerin gewaschen wurden, wird nach erneuter Zentrifugation der Überstand verworfen und das Zellpellet in dem restlichen Volumen (ca. 1 ml) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden anschließend zu je 60-100  $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert. Für die eigentlichen

Transformation wurden die Aliquots auf Eis langsam aufgetaut, mit 1-3  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA bzw. 4  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes versetzt, in eine Elektroporationsküvette (2 mm, EQUIBIO) überführt und kurz auf Eis inkubiert. Im Elektroporationsgerät wurde eine Spannung von 2,5 kV zur eigentlichen Transformation angelegt. Die Zellen wurden dann sofort in 1 ml LB überführt und für 1 h im Schüttler inkubiert. 100  $\mu\text{l}$  und 900  $\mu\text{l}$  der Kultur wurden jeweils auf eine Selektionsplatte (LB mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

Eine vereinfachte Elektroporationsmethode wurde für die Transformation von Plasmiden in *V. cholerae* angewandt (pers. Mitteilung von K. E. Klose). Dazu wurde ein am Vorabend gereinigter Stamm auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und 4-5 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend mit einem Zahnstocher von der Platte abgenommen und in 1 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (2 mM, auf 4°C vorgekühlt) resuspendiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 7500 rpm wurde das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  kalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (2 mM) resuspendiert. Die Transformation erfolgte grundsätzlich wie für *E. coli* beschrieben, allerdings wurden 7  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA zugegeben und am Elektroporationsgerät nur eine Spannung von 1,8 kV angelegt.

Um größere Mengen an kompetenten *V. cholerae* zu erzeugen wurde das Protokoll für *E. coli* angewandt, wobei jede Lösung mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  versetzt wurde. Durch die Aufnahme der Zellen in 15% Glycerin mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  konnten die Aliquots bei -80°C gelagert werden.

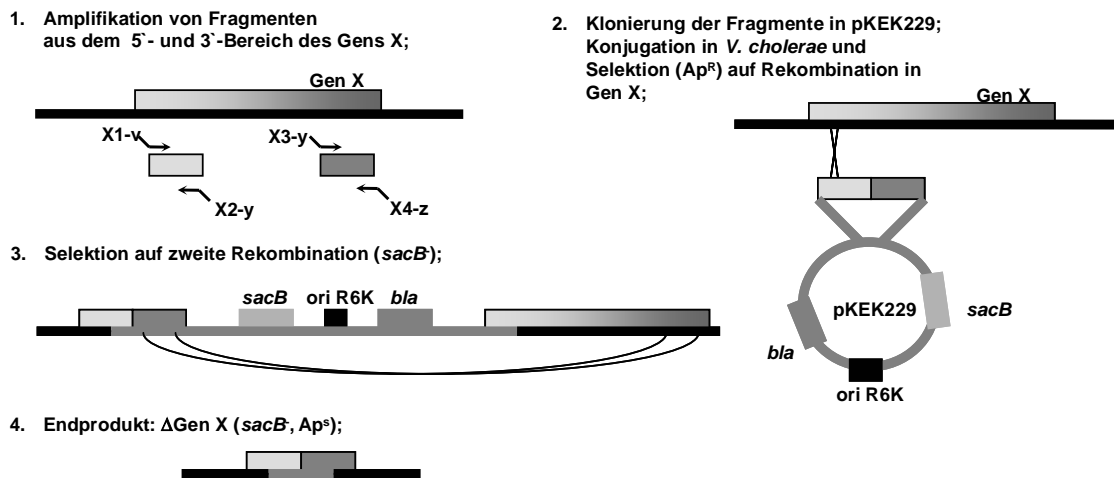
#### 4.4. Stammkonstruktionen

Zur gezielten Inaktivierung von Genen in *V. cholerae* wurden Insertions- und Deletionsmutanten unter Verwendung von Derivaten der konjugierbaren, *pir*-abhängigen Suizidplasmide pGP704 und pKEK229 ( $\text{Ap}^r$ ) generiert (vgl. III 4.1.). Aufgrund ihres oriR6K (141) sind diese *pir*-abhängigen Plasmide in *V. cholerae* nicht replikationsfähig.

##### 4.4.1. Inaktivierung eines Gens durch Insertion

Für Insertionsmutationen wurde zunächst ein pGP704-Derivat mit einem internen Fragment des zu inaktivierenden Gens konstruiert (vgl. III 5.8.1.). Nach der Konjugation des Plasmids erfolgte die Vermehrung der Konjuganten durch Selektion auf LB/Sm/ $\text{Ap}$ -Agarplatten. Dabei handelte es sich um  $\text{Ap}^r$  und  $\text{Sm}^r$  *V. cholerae*, welche das Suizidplasmid aufgenommen hatten. Aufgrund der *pir*-Abhängigkeit des Suizidplasmides kann bei  $\text{Ap}^r$  *V. cholerae* von einer homologen Rekombination des Plasmids über das interne Fragment ins Chromosom ausgegangen werden. Die korrekte Integration wurde durch Southern Blot und/ oder PCR überprüft.

#### 4.4.2. Inaktivierung eines Gens durch Deletion



**Abbildung III.1: Schematische Darstellung einer Deletionsmutagenese von Gen X mit pKEK229.** Gezeigt ist ein linearer Ausschnitt des Chromosoms mit Gen X. Die relevanten Merkmale von pKEK229 wurden eingezeichnet. Beispielhaft sind die Oligonukleotide X1-v, X2-y, X3-y und X4-z angegeben, die für die Amplifikation der Genfragmente benötigt werden (vgl. III 5.8.2.).

Die Technik zur Erzeugung von Deletionsmutanten; welche auf der Methode von Donnenberg und Kaper beruht (73), ist in Abbildung III.1 dargestellt und wird im Folgenden kurz erläutert. Für die Mutagenese wurde das Suizidplasmid pKEK229 verwendet, auf welchem die Selektionsmarker *bla* ( $Ap^r$ ) und *sacB* liegen. *SacB* kodiert für die Levansucrase, die Saccharose in toxisches Levan umwandelt. Die hierfür benötigten pKEK229-Derivate, welche stromauf- und stromabwärtsliegende DNA-Fragmente des betreffenden Gens enthielten (vgl. III 5.8.2.), wurden wiederum über Konjugation (vgl. III 4.1.) in *V. cholerae* eingebracht. Die Konjuganten wurden über Austrich auf LB/Sm/ $Ap$ -Agarplatten selektiert, anschließend in LB/Sm angezogen und 1 x überimpft (Wachstum bei  $37^\circ\text{C}$  ÜN). Diese ÜNK wurden in LB verdünnt und  $100\ \mu\text{l}$  der Verdünnungen  $10^0$ - $10^{-4}$  auf Suc/Sm-Agarplatten ausplattiert. Da die Saccharose in Anwesenheit der Levansucrase zur Produktion toxischen Levans führt, findet eine positive Selektion auf Bakterien statt, welche das zuvor integrierte Plasmid wieder verloren haben. Dabei konnte entweder der ursprüngliche wildtypische Zustand entstehen oder die Deletion zurückbleiben. Nach Inkubation der Platten bei RT für 2-3 Tage wurden die  $Ap^S$  Klone dahingehend durch PCR und/ oder Southern Blot untersucht.

## 4.4.3. Deletion mehrerer Gene bzw. Gencluster

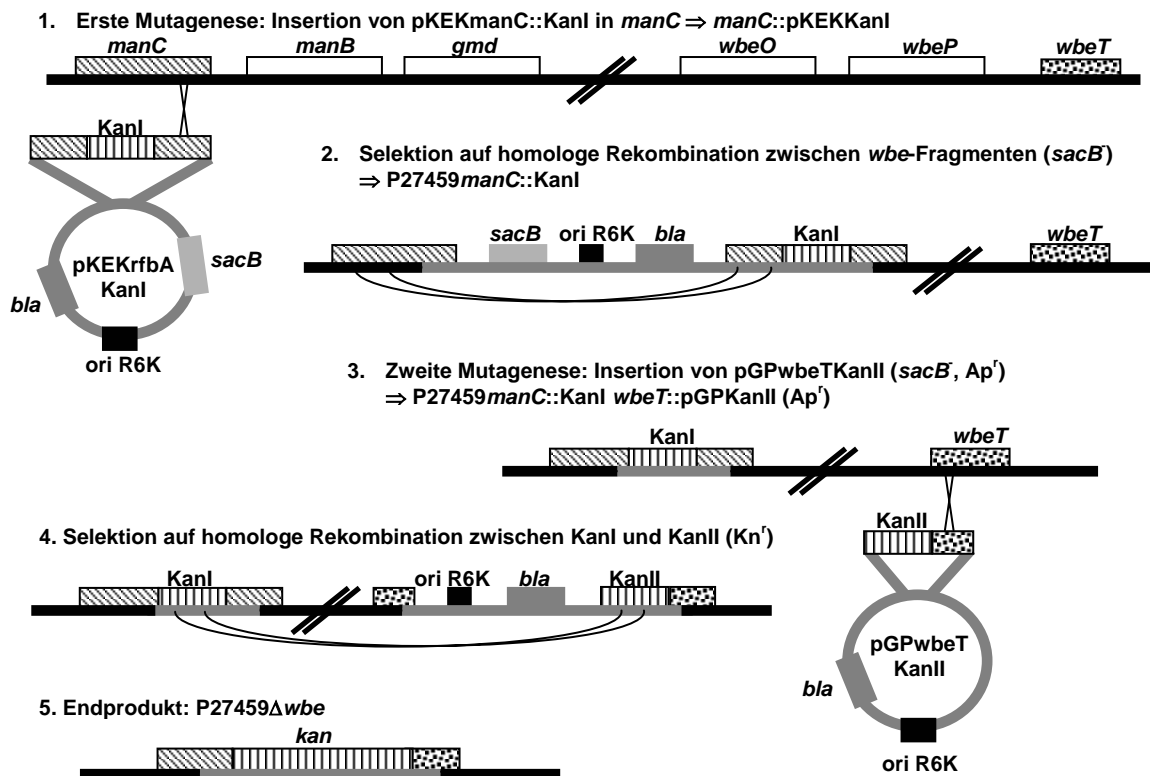


Abbildung III.2: Schematische Darstellung einer Deletionsmutagenese mehrerer Gene am Beispiel der Deletion *manC* bis *wbeT*. Gezeigt ist ein linearer Ausschnitt des *wbe*-Genclusters auf dem Chromosom. Die relevanten Merkmale von pKEK229 und pGP704 wurden eingezeichnet.

Da die Rekombinationsfrequenz zwischen homologen Bereichen mit zunehmendem Abstand auf dem Chromosom sehr schnell zurückgeht, ist die Deletionsmutagenese mit pKEK229-Derivaten für größere Bereiche ungeeignet. Um dennoch gezielt großräumige Deletionen im *wav*- und *wbe*-Gencluster durchführen zu können, wurde eine Variante dieser Deletionstechnik unter Verwendung von pKEK229 und pGP704 etabliert. Diese ist in Abb. III.2 für die Deletion der Bereiche *manC* bis *wbeT* dargestellt und wird im weiteren Verlauf nun kurz erläutert. Nach der Konjugation von pKEKmanC:KanI in P27459-S, Selektion auf Suc/Sm-Agarplatten und Analyse der Ap<sup>s</sup> Kolonien durch PCR und Southern Blot konnte zunächst die Mutante P27459Δ*manC*::KanI isoliert werden, die nun 2/3 (N-terminal) von *kanR* aus pACYC177 in *manC* integriert hatte. Anschließend wurde das Suizidplasmid pGPwbeTKanII, welches sowohl Bereiche von *wbeT* als auch 2/3 (C-terminal) von *kanR* aus pACYC177 enthielt, durch Konjugation in P27459Δ*manC*::KanI eingebracht und Ap<sup>r</sup> Kolonien etabliert. Nach Selektion auf LB/Km-Agarplatten wurden einzelne Km<sup>r</sup>/Ap<sup>s</sup> Klone isoliert. Durch PCR und Southern Blot wurde die korrekte Deletion der Bereiche *manC* bis *wbeT* in P27459Δ*wbe* kontrolliert.

Die Deletionsmutante P27459 $\Delta$ *wav* wurde auf ähnliche Weise erzeugt. Allerdings musste hier das essentielle Gen *waaA*, welches für die KDO-Transferase kodiert, erhalten bleiben. Daher wurden über zwei sukzessiv durchgeführte Mutagenesen große Deletionen stromaufwärts und stromabwärts von *wavA* vorgenommen. Zuerst wurde unter Verwendung der Plasmide pKEK*wavL*::KanI und pGP*wavI*KanII die Deletionsmutante P27459 $\Delta$ *wavL-I::kanR* etabliert. Um die gleiche Technik für den zweiten Bereich anzuwenden wurde anschließend durch eine einfache Deletionsmutagenese mit pKEK $\Delta$ Kan die Km<sup>r</sup>-Kassette in P27459 $\Delta$ *wavL-I::kanR* entfernt. Der nun Km<sup>s</sup> Stamm P27459 $\Delta$ *wavL-I* stand zur Konstruktion von P27459 $\Delta$ *wav* zur Verfügung, die unter Verwendung der Plasmide pKEK*wavD*::KanI und pGP*wavH*KanII durchgeführt wurde.

#### 4.5. Herstellung von Phagenlysaten

Die Lyse des Phagen K139 ist nicht durch DNA-schädigende Agenzien (Mitomycin C oder UV) zu induzieren. Um hochtitrige K139 oder K139.cm9 Phagenlysate zu erhalten (189, 218), wurde deshalb eine ÜNK des Stammes MAK757 1:100 in 100 ml LB/10 mM CaCl<sub>2</sub> überimpft und bei 37°C für ungefähr 30 min inkubiert. Dann wurden 10  $\mu$ l sterilfiltrierter Überstand einer ÜNK des Stammes MAK757K139.cm9 (enthält spontan freigesetzte K139.cm9-Phagenpartikel) oder MO10 (enthält spontan freigesetzte K139 Phagen) zugegeben. Der Kolben wurde bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert, bis die Kultur deutlich lysiert war. Die Kultur wurde abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Phagenlysate wurden bei 4°C im Glasgefäß aufbewahrt.

#### 4.6. Phagenplaque-Studien

Phagenplaque-Studien wurden in Anlehnung an die Plaqueinhibitionsanalysen von Guidolin und Manning (96) durchgeführt. Von einer sich in der späten log-Phase befindlichen Bakterienkultur wurden 100  $\mu$ l zu 8 ml TB-Topagar/10 mM CaCl<sub>2</sub> (vorgewärmt in einem Reagenzglas bei 42°C im Wasserbad) pipettiert. Das Gemisch wurde nach kurzem Vortexen auf einer LB-Agarplatte gleichmäßig verteilt. Nach Erhärtung des TB-Topagars wurden vorsichtig an 2 bis 3 Stellen je 20  $\mu$ l K139.cm9-Phagenlysate aufgetropft. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen auf Plaquebildung untersucht.

#### 4.7. MHK- und MBK-Bestimmungen

Die Bestimmung der MBK (minimale bakteriozide Konzentration) von Protamin (kationisches antimikrobielles Peptid von Sigma) erfolgte nach der Methode von Steinberg et al. (243). Durch Einhaltung dieser Methode mit den angegebenen Materialien, konnte die unspezifische Bindung von kationischen Peptiden an Oberflächenmaterialien vermieden und damit reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden. Die Stämme wurden ÜN bei 37°C in MHB-Medium im Schüttelinkubator angezogen, dann in MHB 1:10000 (entspricht ca.  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml) verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnung eines Stammes in eine Reihe einer Platte mit 96 U-förmigen Vertiefungen (Polypropylen, COSTAR) pipettiert. Für Protamin wurde eine Stammlösung (6 mg/ml) in 0,01% Essigsäure mit 0,2% BSA hergestellt (in 1,5 ml bzw. 2 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen, Sarstedt bzw. Eppendorf). Diese 10 x Stammlösungen wurden seriell 1:2 mit 0,01% Essigsäure mit 0,2% BSA in 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäßen (Polypropylen) verdünnt und jeweils 11,1 µl einer Verdünnungsstufe zu einem Stamm in die Mikrotiterplatte gegeben. Pro Stamm wurde ein Kontrollansatz ohne Zugabe von kationischen Peptiden mitgeführt, um Wachstumsdefekte auszuschließen, die nicht auf die Peptide zurückzuführen waren. Die Mikrotiterplatten wurden in einem Kontainer mit feuchten Tüchern für 18 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Trübung durch Messung der OD<sub>600</sub> ermittelt.

Die MBK (minimale bakteriozide Konzentration) ist definiert als die Konzentration einer Substanz, bei der keine überlebenden Zellen mehr vorhanden sind. Die Bestimmung der MBK erfolgte durch das Ausstreichen jeweils einer Probe aus mindestens drei unabhängigen nacheinander folgenden Ansätzen, beginnend mit der Verdünnung, in der optisch noch Wachstum zu erkennen war, gefolgt von drei Verdünnungen ohne sichtbares Wachstum.

Die MHK (minimale Hemmkonzentration) ist die Konzentration an Detergenz, bei der optisch kein Wachstum mehr zu erkennen ist. Die Bestimmung der MHK von Novobiocin (anionisches Detergenz von Sigma) wurde prinzipiell auf die gleiche Art und Weise bestimmt. Allerdings wurden die Stämme ÜN in LB-Medium angezogen und verdünnt. Es wurden Polystyren Mikrotiterplatten für 96 Proben (Greiner) verwendet und die 1,5 mg/ml Stammlösung ebenso wie die Verdünnungen in H<sub>2</sub>O angesetzt. Die getesteten Konzentrationsbereiche lagen zwischen 1,5 µg/ml bis 23 ng/ml. Um objektive Daten zu erhalten, wurde das Wachstum einerseits durch die entstandene Trübung in den Vertiefungen mit dem Auge, andererseits durch Messung der OD<sub>600</sub> mit dem ELISA-Reader analysiert.



## 5. Molekularbiologische Methoden

### 5.1. Präparation von Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Birnboim und Doly (31) beschriebenen Methode, die leicht modifiziert wurde. Dazu wurden 2 ml ÜNK abzentrifugiert (5 min, RT, 5000 rpm) und das Pellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml, pH 8) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 300 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, die Mischung durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer 3 (2,8 M KAc, pH 5,1) zugegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, 4°C, 13000 rpm) wurde der plasmidhaltige Überstand in ein frisches Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 x Volumen Isopropanol und Zentrifugation (25 min, RT, 13000 rpm) gefällt. Das Pellet wurde mit 70% kaltem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O oder TE aufgenommen. Für die Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurde der Plasmidpräparationskit Nucleobond AX von Macherey-Nagel verwendet.

### 5.2. Präparation von chromosomaler DNA

Um chromosomale DNA zu erhalten wurde die Methode von Grimberg et al. (94) angewendet. 2 ml einer ÜNK wurden abzentrifugiert (5 min, RT, 5000 rpm), 1 x in 1 ml TNE (10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA) gewaschen und das Pellet schließlich in 270 µl TNEX (TNE mit 1% Triton) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Lysozymlösung (5 mg/ml in H<sub>2</sub>O) wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 15 µl Proteinase K (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugegeben, das Lysat durch Invertieren gemischt und für mindestens 2 h bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 2 ml „Phase lock gel“-Gefäß (Eppendorf) überführt mit 400 µl Phenol (gesättigt in TE pH 8, Roth) versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach Zentrifugation (10 min, RT, 13000 rpm) wurden aus 300 µl der wässrigen Phase die chromosomale DNA durch Ethanolfällung gewonnen. Dazu wurden 30 µl 5 M NaCl und 750 µl 100% eiskaltem Ethanol zugegeben und der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt (Ausfällung der DNA). Nach Zentrifugation (30 min, 4°C, 13000 rpm) wurde das Pellet mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 75 µl H<sub>2</sub>O oder TE aufgenommen.

### 5.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Größe wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (158). Die Agarosekonzentration lag zwischen 0,6% und 1%. Zur Herstellung des Gels wurde die zuvor abgewogene Agarose (Gibco) mit dem entsprechenden Volumen 1 x TAE versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurde die Lösung in eine abgedichtete Gießvorrichtung mit eingesetztem Kamm gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, konnte der Kamm entfernt, das Gel in der Gelkammer korrekt zur Laufrichtung positioniert und die Proben, welche zuvor mit einer entsprechenden Menge 10 x Proben-Puffer versetzt worden waren, aufgetragen werden. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Zur Größenbestimmung diente die 1 kb DNA Leiter (New England Biolabs bzw. Gibco) oder die SmartLadder<sup>TM</sup> (Eurogentec). Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 V. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt und unter UV-Licht analysiert.

### 5.4. Southern Blot

Das Southern Blot Verfahren (240) wurde angewandt, um DNA-Fragmente durch Hybridisierung zu identifizieren. Die chromosomale DNA (~15 µg) wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, wodurch unter UV-Licht die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden konnten. Zudem wurde das Gel zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, um später den Größenmarker bzw. den Größenstandard auf die Membran übertragen zu können. Dies ermöglichte die Bestimmung der ungefähren Größen der hybridisierten Fragmente.

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels einer Vakuum-Blot-Apparatur aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>) transferiert. Um eine hohe Transfereffizienz zu erreichen, erfolgte zunächst eine Depurinierung der DNA für 15 min mit einer 250 mM HCl-Lösung (Lösung I), anschließend wurde die DNA für 20 min in Lösung II (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) denaturiert. Nach Neutralisierung für 30 min in Lösung III (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5) erfolgte der eigentliche Transfer für 60 min mit 20 x SSC (0,3 M NaCitrat, 3 M NaCl, pH 7). Die DNA wurde durch Crosslinking mit UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden, welche anschließend in einer Hybridisierungslösung (enthalten im ECL-Kit, angesetzt mit 0,5 M NaCl) für 1 h bei 42°C vorhybridisiert wurde. Danach wurde die markierte Sonde, 200 ng eines gereinigten PCR-Produkts, zugegeben und ÜN bei 42°C

hybridisiert. Die Markierung der Sonde mit Peroxidase erfolgte nach Herstellerangaben (ECL-Kit, Amersham Pharmacia Biotech). Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x für 20 min und 1 x für 10 min mit Waschlösung 1 (6 M Harnstoff, 0,4% SDS, 0,5 x SSC, vorgewärmt auf 42°C) bei 42°C und 2 x für 5 min bei RT in Waschlösung 2 (2 x SSC) gewaschen. Die Detektion der hybridisierten DNA-Fragmente erfolgte nach Inkubation der Membran für 1 min in Detektionslösung (enthalten im ECL-Kit) und anschließender Visualisierung der Peroxidaseaktivität über einen, für zunächst 2 min, aufgelegten Röntgenfilm. Je nach Signalstärke wurde anschließend nochmals ein Film für kürzere oder längere Zeit aufgelegt. Zur erneuten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde wurde die Membran mit kochender 0,5%ige SDS-Lösung übergossen und auf einem Schüttler bis zur Abkühlung auf RT inkubiert. Nach kurzem Waschen in 2 x SSC konnte die Prozedur, beginnend mit der Vorhybridisierung, erneut erfolgen.

### **5.5. Restriktionsverdau und Ligation**

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen (Invitrogen, New England Biolabs), das Auffüllen überstehender Enden durch das Klenow-Enzym (Invitrogen), die Dephosphorylierung mit der alkalischen Phosphatase (CIP von New England Biolabs), sowie die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel (TAE) und die Ligation der DNA-Fragmente mit der T4 DNA Ligase (Invitrogen) erfolgte nach Standardvorschriften (158, 235). Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Lösungen und Agarosegelen (TAE) erfolgte mit dem QIAquick-System(Qiagen).

### **5.6. PCR**

Der PCR-Ansatz (184) wurde für Standardanwendungen entweder mit der Taq DNA-Polymerase (New England Biolabs) oder mit dem Mastermix (Eppendorf) nach Herstellerangaben angesetzt. Für die Erzeugung von PCR-Produkten, die in Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurde das Triple Master PCR System (Eppendorf) mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verwendet. Die Denaturierungstemperatur für die DNA betrug 95°C, die Polymerisationstemperatur für den Mastermix 68°C, für die Taq DNA-Polymerase bzw. das Triple Master PCR System jedoch 72°C. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer/ DNA-Komplexe, wobei für jedes hybridisierende AT-Paar 2°C und für jedes hybridisierende GC-Paar 4°C angenommen wurden (bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Primer wurde die niedrigere Temperatur als Hybridisierungstemperatur benutzt). Die Zykluszahl betrug 30, die Polymerisationsdauer

richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stückes, wobei pro 1000 Nukleotide eine Minute gerechnet wurde.

Zur schnellen Überprüfung korrekter Klone wurde eine Aufkoch-PCR durchgeführt. Dazu wurden geringe Mengen eines ÜN-Austriches des betreffenden Klons in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst und für 10 min bei 100°C aufgekocht. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurden störende Partikel aus dem Überstand beseitigt. Für die PCR wurden 2-5 µl des Überstands eingesetzt.

### **5.7. DNA-Sequenzierung**

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Methode von Sanger et al. (228). Für die Sequenzierung dienten generell 2-4 µl eines Plasmid aus einer Schnellpräparation (vgl. III 5.1.) als Ausgangsmaterial. Dazu wurde 1 µl des jeweiligen Sequenzierprimers (100µM) gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Diese Proben wurden im zentralen DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie weiterbearbeitet. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem Big dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers und die Analyse der Proben mit dem automatischen Sequenzierer ABI377. Die endgültigen Sequenzen wurden als Computerdateien zur Verfügung gestellt.

### **5.8. Plasmidkonstruktionen**

#### **5.8.1. Plasmide zur Konstruktion von Insertionsmutanten (pGP704-Derivate)**

Alle Plasmide für die Erzeugung von Insertionsmutanten wurden auf ähnliche Art und Weise hergestellt. Dazu wurde ein internes Fragment des jeweiligen Zielgens durch PCR amplifiziert, wobei grundsätzlich chromosomale DNA von P27459 als Template verwendet wurde. Dagegen wurde bei der Konstruktion von pGPwaaLV194, pGPwavMV194 und pGPwavLV194 chromosomale DNA von V194, bei pGPwbfK chromosomale DNA von MO10 als Template benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle III.2) wurden durchgängig mit X-SacI-intern und X-XbaI-intern bezeichnet, wobei X für das jeweilige Zielgen steht. Um Verwechslungen zu vermeiden, wurde bei Oligonukleotiden zur Konstruktion von Suizidplasmiden für Insertionsmutanten in V194 noch die Stammbezeichnung zugefügt. Eine Ausnahme stellen die Oligonukleotide wavL-SacI-intern und wavL-XbaI-intern da. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von *wavL* aus P27459 und V194

konnten diese Oligonukleotide sowohl zur Konstruktion von pGPwavL, als auch von pGPwavLV194 verwendet werden. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit *XbaI* und *SacI* verdaut und in das Plasmid pGP704, welches zuvor ebenfalls *XbaI* und *SacI* behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente SM10 $\lambda$ pir Zellen transformiert. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden durch PCR und Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft. Dadurch entstanden die Plasmide pGPX, wobei X für das jeweilige Gen steht.

Zur Erzeugung der Plasmide pGPompUphoA und pGPhutAphoA wurde zunächst ein Fragment, welches den eigenen Promotor und interne Bereiche des betreffenden Gens enthielt, durch PCR amplifiziert. Dafür wurden die Oligonukleotide ompU-*SacI* und ompU-*KpnI* bzw. hutA-*SacI* und hutA-*KpnI* verwendet. Die PCR-Fragmente wurden aufgereinigt, mit *SacI* und *KpnI* verdaut und in das Plasmid pGPphoA, welches zuvor ebenfalls *SacI* und *KpnI* behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente SM10 $\lambda$ pir Zellen transformiert. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden wie oben beschrieben überprüft. Nach Integration dieser Plasmide ins Chromosom von *V. cholerae* stand die Expression von PhoA nun unter der Kontrolle des Promotors des jeweiligen Zielgens.

### 5.8.2. Plasmide zur Konstruktion von Deletionsmutanten (pKEK229-Derivate)

Für die Erzeugung von Suizidplasmiden zur Deletionsmutagenese einzelner Gene (vgl. Kapitel III 4.4.2.) wurde ebenfalls eine einheitliche Strategie angewendet. Dazu wurden Fragmente aus dem 5'- und 3'-Bereich des jeweiligen Zielgens, die teilweise noch Bereiche beachbarter Gene enthielten, über PCR mit chromosomaler DNA von P27459 als Template amplifiziert (siehe Abbildung III.1). Die verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle III.2) wurden generell mit X1-v und X2-y für die 5'-Bereiche und X3-y und X4-z für die 3'-Bereiche bezeichnet, wobei X für das jeweilige Zielgen und v, y und z für die zur weiteren Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme stehen. Die dafür notwendigen Schnittstellen wurden durch die Oligonukleotide eingeführt. Die aufgereinigten PCR-Produkte der 5'- und 3'-Bereiche wurden mit dem Restriktionsenzym y verdaut und ligiert. Das Ligationsprodukt wurde unter Verwendung der Oligonukleotide X1-v und X4-z aus dem Ligationsansatz durch PCR amplifiziert, aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen v und z verdaut und in das Plasmid pKEK229, welches ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde nun in kompetente SM10 $\lambda$ pir Zellen transformiert. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden durch PCR und Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft. Dadurch entstanden die Plasmide pKEKAX, wobei X

für das jeweilige Gen steht. Bei der Konstruktion von pKEK $\Delta$ wavL zur Erzeugung einer 336 bp Deletion wurde als X3-y Oligonukleotid wavL3a-BamHI, bei pKEK $\Delta$ 1wavL zur Erzeugung einer 918 bp Deletion wurde als X3-y Oligonukleotid wavL3b-BamHI eingesetzt.

### 5.8.3. Plasmide zur Konstruktion von Gencluster-Deletionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden über eine neue Variante der Deletionstechnik mit pKEK229 die zwei Mutanten P27459 $\Delta$ wbe, mit einer Deletion von 16 kb, und P27459 $\Delta$ wav, mit zwei Deletionen von 5 bzw. 8 kb, konstruiert (vgl. III 4.4.3. und Abbildung III.2). Für P27459 $\Delta$ wbe wurden die Plasmide pKEKmanC::KanI und pGPwbeTKanII benötigt. Die Fragmente mit den 5'- und 3'-Bereichen von *manC* wurden durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide manC1-SacI und manC2-BamHI bzw. manC3-EcoRI und manC4-XbaI, sowie chromosomaler DNA von P27459 als Template amplifiziert, aufgereinigt und mit *Bam*HI bzw. *Eco*RI verdaut. Desweiteren wurde ein 800 bp Fragment des *kanR* von pACYC177 mit den Oligonukleotiden kanI-BamHI und kanI-EcoRI amplifiziert, aufgereinigt und mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Dieses Fragment enthielt den Promotor, die Shine-Dalgarno-Sequenz und ca. 2/3 (N-terminal) des gesamten Gens. Alle drei verdauten Fragmente wurden in eine Ligation eingesetzt, das Ligationsprodukt mit den Oligonukleotiden manC1-SacI und manC4-XbaI aus dem Ligationsansatz durch PCR amplifiziert, aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Xba*I verdaut und in das Plasmid pKEK229, welches ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde nun in kompetente SM10 $\lambda$ pir Zellen transformiert. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden durch PCR und Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft.

Die für P27459 $\Delta$ wav notwendigen Plasmide pKEKwavL::KanI und pKEKwavD::KanI wurden unter Verwendung der Oligonukleotidpaare wavL1-SacI/ wavL2-BamHI, wavL3-EcoRI/ wavL4-XbaI, wavD1-SacI/ wavD2-BamHI und wavD3-EcoRI/ wavD4-XbaI auf entsprechende Weise hergestellt.

Weiterhin wurde für P27459 $\Delta$ wbe das Plasmid pGPwbeTKanII benötigt. Dazu wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden wbeT-NcoI und wbeT-XbaI, sowie chromosomaler DNA von P27459 als Template ein internes Fragment von *wbeT* amplifiziert, aufgereinigt und mit *Nco*I und *Xba*I verdaut. Daneben wurde ein C-terminales Fragment (800 bp) des *kanR* von pACYC177 mit den Oligonukleotiden kanII-SacI und kanII-NcoI amplifiziert, aufgereinigt und mit *Sac*I und *Nco*I verdaut. Die beiden verdauten PCR-Produkte wurden in das mit *Sac*I und *Xba*I behandelte und dephosphorylierte Plasmid pGP704 ligiert. Dieses Ligationsprodukt

wurde in kompetente SM10 $\lambda$ pir Zellen transformiert und Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden wie oben beschrieben überprüft.

Die für P27459 $\Delta$ *wav* notwendigen Plasmide pGPwavIKanII und pGPwavHKanII wurden unter Verwendung der Oligonukleotidpaare wavI-NcoI/ wavI-XbaI und wavH-NcoI/ wavH-XbaI auf entsprechende Weise hergestellt.

Für die Deletion von *kanR* in P27459 $\Delta$ *wavL-I::kanR* wurde das Plasmid pKEK $\Delta$ kanR wie in III 5.8.2. beschrieben konstruiert. Dazu wurden die Oligonukleotidpaare wavL1-SacI/ wavL2-HindIII und wavI3-HindIII/ wavI4-XbaI verwendet.

#### 5.8.4. Expressionsplasmide

Expressionsplasmide dienen zur Komplementation von inaktivierten Genen in trans. Dabei wurden unterschiedliche Expressionsplasmide verwendet. Falls nicht anders vermerkt, wurde für die jeweilige PCR chromosomale DNA von P27459 als Template verwendet. Alle Ligationsprodukte wurden in kompetente XL1-Blue Zellen transformiert. Kolonien, welche die jeweilige Resistenz des transformierten Plasmids erworben hatten, wurden durch PCR und Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft.

Im Fall von pGEMwavL und pTrc99AwavL wurde *wavL* durch PCR mit den Oligonukleotiden wavL-5'-EcoRI und wavL-3'-BamHI amplifiziert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde entweder direkt in pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega) ligiert oder mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in das Plasmid pTrc99A, welches ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert.

Für pGEMwavL(N-term) bzw. pGEMosmK wurde das PCR-Produkt mit den Oligonukleotiden wavL-5'-EcoRI und wavL-N-term-up bzw. osmK-5'-SacI und osmK-3'-XbaI amplifiziert, aufgereinigt und direkt in pGEM<sup>®</sup>-T easy ligiert.

Die Konstruktion der Plasmide pTrc99AwavD und pTrc99AwavJ erfolgte durch Amplifikation der Gene über PCR mit den Oligonukleotiden wavJ-5'-SacI und wavJ-3'-XbaI bzw. wavD-5'-NcoI und wavD-3'-HindIII, Aufreinigung der PCR-Produkte sowie Verdau dieser mit *SacI* und *XbaI* bzw. *NcoI* und *HindIII*. Anschließend wurden diese in das Plasmid pTrc99A über die jeweiligen Restriktionsschnittstellen ligiert.

Das für die *TnlacZ*- und *TnphoA*-Mutagenese benötigte Plasmid pBAD18waaL entstand durch Ausschneiden von *waaL* aus pBAD18-KanwaaL unter Verwendung von *NheI* und *KpnI* mit anschließender Aufreinigung und Ligation von *waaL* in das mit *NheI* und *KpnI* geöffnete, dephosphorylierte Plasmid pBAD18.

Für die Komplementation von *ompU* wurde das Gen durch PCR mit den Oligonukleotiden *ompU*-5'-*SacI* und *ompU*-3'-*SphI* amplifiziert, aufgereinigt, mit *SacI* und *SphI* verdaut und in das Plasmid pBAD18-Kan, welches ebenfalls mit *SacI* und *SphI* behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Das Plasmid pBAD18-KanwbeH entstand auf ähnliche Weise unter Verwendung der Oligonukleotide *wbeH*-5'-*SacI* und *wbeH*-3'-*XbaI*, sowie den Restriktionsenzymen *SacI* und *XbaI*. Die gleichen Enzyme wurden auch bei der Klonierung von pBAD18-KanwbfK eingesetzt, wobei hier in die PCR die Oligonukleotide *wbfK*-5'-*SacI* und *wbfK*-3'-*XbaI* und chromosomale DNA von MO10 als Template eingesetzt wurden. Die Plasmide pBAD18-KanwaaLV194 und pBAD18-KanwaaLwavMV194 wurden durch Amplifikation der Gene durch PCR mit den Oligonukleotidpaaren *waaL*-V194-5'*SacI*/*waaL*-V194-3'*KpnI* bzw. *wavM*-V194-5'*SacI*/*waaL*-V194-3'*KpnI* und chromosomaler DNA von V194 als Template, Aufreinigung und Ligation der *SacI* und *KpnI* behandelten PCR-Produkte in das Plasmid pBAD18-Kan, welches ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen behandelt und dephosphoryliert worden war, konstruiert. Durch Verdau von pBAD18-KanwaaLwavMV194 mit *XbaI* und anschließender Religation konnte *waaL*<sup>V194</sup> entfernt und das Plasmid pBAD18-KanwavMV194 etabliert werden.

Um die Aktivität der O Antigenligase näher zu untersuchen, wurden die Expressionsplasmide pBAD18-KanwaaL\_hybridP27459/V194 und pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/P27459 mit Hybriden aus N- bzw. C-terminalen Bereichen von *waaL*<sup>P27459</sup> und *waaL*<sup>V194</sup> konstruiert. Dazu wurden die N-terminalen Fragmente durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotiden *waaL*-O1-5'*NheI* und *waaL*-O1-up-*NcoI* im Fall von *waaL*<sup>P27459</sup> bzw. *waaL*-V194-5'*NheI* und *waaL*-V194-up-*NcoI* für *waaL*<sup>V194</sup> amplifiziert. C-terminale Fragmente wurden analog mit den Oligonukleotiden *waaL*-O1-down-*NcoI* und *waaL*-O1-3'*KpnI* bzw. *waaL*-V194-down-*NcoI* und *waaL*-V194-3'*KpnI* vervielfältigt. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die N-terminalen Fragmente mit *NheI* und *NcoI*, die C-terminalen Fragmente mit *NcoI* und *KpnI* verdaut und zur Erzeugung von Hybriden in der geforderten Kombination in das Plasmid pBAD18-Kan, welches mit *NheI* und *KpnI* behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Neben diesen Hybridkonstruktionen wurden weiterhin die N- und C-terminalen Fragmente eines jeden *waaL* so in pBAD18-Kan ligiert, dass wieder die vollständigen Gene *waaL*<sup>P27459</sup> und *waaL*<sup>V194</sup>, nun aber mit eingefügter *NcoI*-Schnittstelle, entstanden. Für diese beiden Konstrukte, pBAD18-KanwaaL\_hybridP27459/P27459 und pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/V194, konnte die Komplementation in den entsprechenden Mutanten gezeigt werden. Dadurch konnte ein Funktionsverlust durch Insertion der



Schnittstelle und der damit einhergehenden AS nahezu ausgeschlossen werden. Durch Sequenzierung wurde die Konstruktion der Hybride kontrolliert.

Das Plasmid pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/P27459wavM wurde durch Amplifikation von *wavM* durch PCR mit den Oligonukleotiden wavM-V194-5'KpnI und wavM-V194-3'KpnI sowie chromosomaler DNA von V194 als Template, Aufreinigung und Ligation der *KpnI* behandelten PCR-Produkte in das Plasmid pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/P27459 konstruiert.

Für die Erzeugung von pBRO1core zur Komplementation verschiedener *wav*-Gene in trans, wurden zunächst die 5 bzw. 8 kb großen PCR-Fragmente, welche die Bereiche *wavD* bis *wavH* und *wavJ* bis *wavL* kodierten, durch PCR mit den Oligonukleotidepaaren core1-KpnI/core2-BamHI und core3-BamHI/core4-XbaI verfielfältigt, aufgereinigt, mit *KpnI* und *BamHI* bzw. *BamHI* und *XbaI* verdaut und sukzessiv in das Plasmid pWSK129, welches entweder mit *KpnI* und *BamHI* oder *BamHI* und *XbaI* geöffnet und dephosphoryliert worden war, ligiert. Da das so hergestellte Plasmid pWSKO1core aufgrund seiner Größe nicht effizient in *V. cholerae* transformiert werden konnte, wurde der Bereich mit den *wav*-Genen durch Verwendung von *KpnI* und *XbaI* ausgeschnitten, gereinigt, mit Klenow-Enzym behandelt und in das Plasmid pBR322, welches mit *EcoRV* geöffnet und dephosphoryliert worden war, ligiert. Das Plasmid pBRO1core konnte in einer Dreifach-Konjugation (siehe Kapitel III 4.2.) in *V. cholerae* eingebracht werden.

### 5.8.5. Expressionsplasmide mit His-Tag

Die Konstruktion von pTOPOwavL und pTOPOwavM zur Expression von WavL bzw WavM mit C-terminaler His-Tag Fusion erfolgte mit dem pCR<sup>®</sup>T7 TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit (Invitrogen). Die Gene wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden wavL-topo-up und wavL-topo-down sowie chromosomaler DNA von P27459 als Template bzw. wavM-topo-up und wavM-topo-down sowie chromosomaler DNA von V194 als Template amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese in pCR<sup>®</sup>T7/ CT-TOPO<sup>®</sup> ligiert und das Ligationsprodukt in kompetente TOP10F' Zellen transformiert. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden durch PCR und Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft.

Um WaaL und ToxR von P27459 als rekombinante Proteine mit N-terminaler His-Tag Fusion zu exprimieren, wurde das Plasmid pQE30waaL<sup>P27459</sup> konstruiert. Dazu wurde das Gen waaL<sup>P27459</sup> durch PCR mit den Oligonukleotiden waaL-start-KpnI und waaL-stop-KpnI amplifiziert. Die chromosomale DNA von P27459 diente als Template. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde dieses mit *KpnI* verdaut und in das Plasmid pQE30, welches zuvor

mit *KpnI* behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente XL1-Blue Zellen transformiert. Um eine Expression von WaaL<sup>P27459</sup> zunächst weitgehend zu unterdrücken wurde den LB/Ap-Agarplatten 0,2% Glc beigefügt. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden wie oben beschrieben überprüft.

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung kontrolliert.

### 5.8.6. Plasmide für die Transposonmutagenese

Das in dieser Arbeit entwickelte Transposonplasmid-System wurde aus bereits bestehenden Plasmiden zusammengestellt. Zunächst wurde das Ausgangsplasmid pKD46 aus GM2163 präpariert, mit *ClaI* verdaut und religiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente XL1-Blue transformiert. Da es sich um ein temperatursensitives Replikationssystem handelte, wurden Zellen mit diesem Plasmid für die folgenden Arbeiten bei 30°C inkubiert. Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden durch Restriktionsverdau der daraus gewonnenen Plasmide kontrolliert. Das dadurch entstandene 3,6 kb große Plasmid pKDClaI hatte beachtliche Teile des Red-Systems, den durch Arabinose induzierbaren Promotor sowie *araC* verloren. Das Plasmid pZT344, das als Quelle für das Tn10-System diente, wurde mit *EcoRI* in drei Fragmente gespalten, wobei die größte und die kleinste Bande (3 und 1,5 kb) aufgereinigt wurden und in eine Ligation mit dem Plasmid pKDClaI, welches mit *EcoRI* geöffnet und anschließend dephosphoryliert worden war, eingesetzt. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente XL1-Blue Zellen transformiert. Um eine Expression der Transposase zunächst weitgehend zu unterdrücken, wurde den LB/Ap/Cm-Agarplatten 0,2% Glc beigefügt. Ap<sup>r</sup> und Cm<sup>r</sup> Kolonien wurden durch Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft, wodurch pStSchcat isoliert werden konnte. Durch Verdau von pStSchcat mit *BamHI*, Religation, Transformation des Ligationsprodukts in kompetente XL1-Blue Zellen und Überprüfung der Ap<sup>r</sup> und Cm<sup>s</sup> Kolonien konnte pStSch isoliert werden. Um das Transposonplasmid pStSchcatpirkan zu etablieren, wurde durch PCR *cat* aus pACYC184 ohne eigenen Promotor mit den Oligonukleotiden cat-BamHI und cat-KpnI, *pir* aus SM10λpir ebenfalls ohne eigenen Promotor mit den Oligonukleotiden pir-KpnI und pir-NcoI und *kanR* mit eigenem Promotor aus pACYC177 mit den Oligonukleotiden kan-NcoI und kan-BamHI amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *NcoI* verdaut und zu gleichen Teilen in eine Ligation eingesetzt. Über eine PCR mit den Oligonukleotiden cat-BamHI und kan-BamHI konnte das Ligationsprodukt amplifiziert werden. Nach Aufreinigung und Inkubation mit *BamHI* wurde das PCR-Produkt in das Plasmid pStSch, welches mit *BamHI* geöffnet und anschließend dephosphoryliert worden war, eingesetzt. Das

Ligationsprodukt wurde anschließend in kompetente XL1-Blue Zellen transformiert. Um eine Expression der Transposase zunächst weitgehend zu unterdrücken, wurde den LB/Ap/Km-Agarplatten 0,2% Glc beigefügt. Ap<sup>r</sup> und Km<sup>r</sup> Kolonien wurden durch Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft, wodurch pStSchcatpirkan isoliert werden konnte. Das Tn10-Derivat TncatpirkanR wurde durch Sequenzierung kontrolliert.

### 5.9. TnlacZ- und TnphoA-Mutagenese mit pBADwaaL

Zur Überprüfung der vorhergesagten Transmembrantopologie von WaaL<sup>O1</sup> durch verfügbare Computerprogramme (vgl. III 10.) wurden über Transposonmutagenese Proteinfusionen von WaaL mit PhoA oder LacZ hergestellt. Im Fall der WaaL-PhoA Fusionen wurde pBAD18waaL in den Stamm IS212, welcher ein TnphoA auf dem  $\lambda$ -Phagen besitzt, transformiert. Geeignete Verdünnungen von ÜNK der Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden auf LB-Agarplatten mit einer Kanamycinkonzentration von 300  $\mu\text{g/ml}$  ausplattiert. Km<sup>r</sup> Kolonien wurden durch Abwaschen von den Platten und Resuspendieren in LB vereinigt. Aus diesem Gemisch wurde eine Plasmidpräparation angefertigt, welche anschließend in CC118 transformiert wurde. Die Transformation wurde auf LB/Ap/Km/X-Phos-Agarplatten mit 0,02% Arabinose ausplattiert, wodurch aktive WaaL-PhoA-Fusionen durch Blaufärbung detektiert werden konnten. Die Transposition von TnphoA in waaL auf pBAD18waaL, welche zur Entstehung von diversen pBAD18waaL::TnphoA-Konstrukten führte, wurde durch PCR und Sequenzierung mit den Oligonukleotiden phoA-seq und waaL-O1-5'NheI kontrolliert.

Zur Erzeugung von WaaL-LacZ Fusionen wurde pBAD18waaL in den Stamm CC313 transformiert, welcher pOxygen mit TnlacZ auf dem Chromosom trägt. Geeignete Verdünnungen von ÜNK der Ap<sup>r</sup> Kolonien wurden auf LB-Agarplatten mit einer Kanamycinkonzentration von 300  $\mu\text{g/ml}$  ausplattiert. Km<sup>r</sup> Kolonien wurden durch Abwaschen von den Platten und Resuspendieren in LB vereinigt. Aus diesem Gemisch wurde eine Plasmidpräparation angefertigt, welche anschließend in CC118 transformiert wurde. Die Transformation wurde auf LB/Ap/Km/X-Gal-Agarplatten mit 0,02% Arabinose ausplattiert, wodurch aktive WaaL-LacZ-Fusionen durch Blaufärbung der Kolonien detektiert werden konnten. Die Transposition von TnlacZ in waaL auf pBAD18waaL, welche zur Entstehung von diversen pBAD18waaL::TnlacZ-Konstrukten führte, wurde durch PCR und Sequenzierung mit den Oligonukleotiden lacZ-seq und waaL-O1-5'NheI kontrolliert.

### 5.10. AS-Austausch in WaaL

Um gezielt Punktmutationen in WaaL von *V. cholerae* O1 und SARC6 einzubringen, wurde der QuikChange® site-directed mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Die jeweilige PCR wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde zum einen pQE30waaL<sup>P27459</sup> als Ausgangsplasmid und die Oligonukleotidpaare waaL-R186M und waaL-R186M-antisense für den Austausch von R<sup>186</sup> zu M, waaL-H309A und waaL-H309A-antisense für den Austausch von H<sup>309</sup> zu A, waaL-H311A und waaL-H311A-antisense für den Austausch von H<sup>311</sup> zu A, sowie waaL-H309/311A und waaL-H309/311A-antisense für den Austausch von H<sup>309</sup> und H<sup>311</sup> zu je einem A eingesetzt. Zum anderen diente pWQ322 als Ausgangsplasmid unter Verwendung der Oligonukleotide waalSal-H321A und waalSal-H321A-antisense für den Austausch von H<sup>321</sup> zu A und waalSal-R208M und waalSal-R208M-antisense für den Austausch von R<sup>208</sup> zu M. Durch Verdau der PCR mit *DpnI* für 2 h bei 37°C konnte das Ausgangsplasmid abgebaut werden. 4 µl der so behandelten PCR wurden in XL1-Blue transformiert, von den Ap<sup>r</sup> Kolonien das Plasmid präpariert und durch Sequenzierung auf den jeweiligen AS-Austausch überprüft. Um die Expression und Komplementation von WaaL<sup>P27459</sup>-R<sup>186</sup>M, WaaL<sup>P27459</sup>-H<sup>309</sup>A, WaaL<sup>P27459</sup>-H<sup>311</sup>A und WaaL<sup>P27459</sup>-H<sup>309/311</sup>A zu überprüfen, wurden die zugehörigen Plasmide pQE30waaL<sup>P27459</sup>-R186M, pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H309A, pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H311A und pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H309/311A in MO10ΔwaaL transformiert. Um die Expression und Komplementation von WaaL<sup>SARC6</sup>-R<sup>208</sup>M und WaaL<sup>SARC6</sup>-H<sup>321</sup>A zu überprüfen, wurden die zugehörigen Plasmide pWQ322-R186M und pWQ322-H321A in SL3749 transformiert. In beiden Fällen wurden Ap<sup>r</sup> Transformanten durch Ausstreichen einmal gereinigt und eine ÜNK in LB/Ap mit 0,02% Arabinose angeimpft. Am nächsten Tag wurde aus der ÜNK einerseits LPS (vgl. III 6.1.), andererseits ein Gesamtzellextrakt präpariert. Dazu wurden 500 µl der ÜNK abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min), in 1 ml 1 x PBS gewaschen, anschließend in 50 µl 5 x Lämmli-Puffer aufgenommen und ÜN bei 42°C inkubiert.

## 6. Biochemische Methoden

### 6.1. Präparation von LPS

Für die Isolierung von LPS wurde erstmals eine neue Methode (pers. Mitteilung von J. Nesper) ohne Verwendung von Phenol getestet. Dazu wurde die OD<sub>600</sub> der jeweiligen ÜNK bestimmt und ein Volumen, welches einer Zellzahl von OD<sub>600</sub> = 1 entsprochen hat,

abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, RT). Dadurch wurde immer eine annähernd gleiche Zellzahl für unterschiedliche Präparationen eingestellt. Das Zellpellet wurde einmal in 1 ml 1 x PBS gewaschen und danach in 100 µl Lysepuffer (4,5 ml H<sub>2</sub>O, 800 µl Glycerin, 1,6 ml 10% SDS, 400 µl β-Mercaptoethanol, 500 µl 1 M Tris/HCl pH 6,8 und 3-4 Körner Bromphenolblau) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch Erhitzen auf 100°C für 30 min aufgeschlossen. Zum Abbau von Proteinen wurden danach 20 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Sigma) zugegeben und die Probe über Nacht bei 55°C inkubiert. Je 12 µl der Proben konnten nun ohne weitere Behandlung direkt auf ein PAA-Gel (Protean Xi Cell) geladen werden. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Für die *in vitro* <sup>14</sup>C Einbauversuche (vgl. III 6.10.) war eine modifizierte Präparationsmethode des LPS ohne störende Substanzen notwendig. Dazu wurden 50 ml einer ÜNK des betreffenden Stammes abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, RT), 1 x in TMD (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT) gewaschen und schließlich in 1,5 ml TMD resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem Zellaufschlussgerät bei maximaler Geschwindigkeit unter Verwendung von Silikatkügelchen (Lysing Matrix B, Q BioGene). Intakte Zellen, größere Zellfragmente sowie die Silikatkügelchen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min und anschließend bei 13000 rpm für 1 min vom Überstand getrennt. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in einer Ultrazentrifuge bei 60000 rpm für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet, in welchem das LPS enthalten war, wurde in 500 µl TMD resuspendiert, mit 16 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Sigma) versetzt und ÜN bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das LPS erneut durch Ultrazentrifugation pelletiert, 2 x in 2 ml TMD mit Proteaseinhibitormix (Complete EDTA-free, Boehringer-Ingelheim) gewaschen und schließlich in 500 µl TMD mit Proteaseinhibitormix resuspendiert. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

## 6.2. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen und LPS erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (147). Dazu wurden PAA-Gele mit einer Polyacrylamid-Endkonzentration von 15% für Proteine bzw. 15 bis 16,5% für LPS angefertigt. Die Herstellung des Laufpuffers und der Lösungen für das Gießen der SDS-Gele erfolgte wie im Laborhandbuch beschrieben (158). Dafür wurde eine gebrauchsfertige 30% Acrylamid-/ 0,8% Bisacrylamid-Stammlösung (Roth) verwendet. Die SDS-PAGE wurde in Protein-Gelapparaturen von BioRad (Mini Protean III für Proteine und LPS bei Western Blots, Protean II Xi Cell für LPS) durchgeführt, wobei für die Auftrennung von Proteinen 14 mA

pro Gel und für die Auftrennung von LPS 18 mA pro Gel angelegt wurden. Das Probenvolumen betrug bei Proteinen je nach Anwendung zwischen 5 und 15  $\mu\text{l}$  und bei LPS 12  $\mu\text{l}$ .

### **6.3. Färbung von Proteinen in PAA-Gelen**

Die Färbung von Proteinen erfolgte durch Inkubation der PAA-Gele nach SDS-PAGE in Coomassie-Färbelösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% Methanol, 10% Eisessig) über Nacht. Anschließend wurde der Hintergrund durch Schwenken in Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Eisessig) entfärbt.

### **6.4. Silberfärbung von LPS in PAA-Gelen**

Der Nachweis von LPS in PAA-Gelen erfolgte nach einer leicht abgewandelten Methode der Silberfärbung (pers. Mitteilung W. Brabetz), die ursprünglich von Tsai und Frasch entwickelt worden war (260). Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel über Nacht in 100 ml Fixierlösung (25% Isopropanol, 7% Essigsäure) auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde das LPS für 10 min in 100 ml Fixierlösung mit 0,87 g  $\text{NaJO}_4$  (Sigma) oxidiert. Nach 3 Waschschrritten mit  $\text{H}_2\text{O}$  für je 30 min wurde das Gel für 10 min in einer frisch angesetzten Färbelösung (70 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 1,4 ml 1 M NaOH + 1 ml  $\text{NH}_3$  konz. + 1,25 ml 20%  $\text{AgNO}_3$ ; dabei ist es wichtig, die angegebene Reihenfolge der Substanzen beim Zusammenmischen einzuhalten) inkubiert. Anschließend wurde 3 x für 15 min mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und dann in 200 ml Entwickler (2,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 27  $\mu\text{l}$  40% Formaldehyd, frisch angesetzt und auf 60°C vorgewärmt) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 ml 50 mM EDTA (pH 8) gestoppt. Nach 10 min wurde das Gel in  $\text{H}_2\text{O}$  gelegt und darin bis zum Trocknen im Geltrockner aufbewahrt.

### **6.5. Western Blot**

Der Western Blot wurde zum immunologischen Nachweis von Proteinen einerseits, sowie des O Antigens und der Kapsel von O139 andererseits eingesetzt. In beiden Fällen erfolgte zunächst die Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE und anschließend der elektrophoretische Transfer vom PAA-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (259).

Für Proteine wurde die Semi-Dry-Apparatur (BioRad) nach Anleitung des Herstellers verwendet und eine Spannung von 20 V für 30 min angelegt. Danach wurde die Membran 2 x in TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) für je 10 min gewaschen. Anschließend wurden freie Bereiche mit 3% BSA in TBS über Nacht bei 4°C abgesättigt. Nach 2 x

Waschen in TBS-Tween-Triton (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100) und einmal in TBS für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-Penta-His-Antikörper, Qiagen, 1:2500 in TBS mit 3% BSA) für 1 h bei RT. Nachdem erneut die Waschschriffe mit TBS-Tween-Triton und TBS durchgeführt worden waren, wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, Dianova, 1:5000 in TBS mit 10% Magermilch) für 1 h bei RT inkubiert. Bevor der Nachweis mit ECL-Reagenz erfolgte, wurde die Membran noch 4 x mit TBS-Tween-Triton für je 10 min gewaschen. Der Nachweis der Protein-Antikörperkomplexe erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ECL-Reagenz (Amersham), eine Substanz, die nach enzymatischer Spaltung durch die Meerrettichperoxidase luminesziert. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Autoradiographiefilm zwischen 2 min und 1 h aufgelegt.

Zum Nachweis der Waal-PhoA-Fusionen wurden je 500 µl einer ÜNK in LB/Km mit 0,02% Arabinose von CC118 mit dem entsprechenden pBAD18waaL-TnphoA-Konstrukt abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min), in 1 ml 1 x PBS gewaschen, anschließend in 50 µl 5 x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 30 min bei 100°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein in derselben Weise präparierter Extrakt aus CC118 verwendet. Für den Western Blot wurden 10 µl jeder Probe elektrophoretisch im PAA-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde die Membran 2 x in TBS für je 10 min gewaschen, mit 10% Magermilchpulver in TBS über Nacht bei 4°C abgesättigt, erneut 2 x in TBS für je 10 min gewaschen und schließlich für 2 h mit dem Meerrettichperoxidase gekoppelten Anti-PhoA-Antikörper (BioTrend, 1:5000 in TBS mit 10% Magermilch) inkubiert. Nach 4 x Waschen in TBS-Tween-Triton für je 10 min erfolgte direkt die Detektion mit dem ECL-Reagenz.

Da sich LPS wesentlich schlechter als Proteine transferieren läßt, wurde ein adaptiertes Protokoll angewandt (pers. Mitteilung W. Brabetz). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in 4°C kaltes H<sub>2</sub>O gelegt. Der Transfer erfolgte anschließend in einem mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol; pH 8,3) gefülltem Tankblotgerät bei einer Spannung von 40 V für 24 h bei 4°C. Nach dem Blotten wurde das LPS auf der Membran durch Inkubation bei 37°C für 2 h fixiert. Die freien Bereiche der Membran wurden anschließend in Blocklösung (5% Magermilchpulver in TBS) für 2 h bei RT abgesättigt. Als primäre Antikörper wurde ein polyklonales Antiserum (gegen das O Antigen der Serogruppe O139, 1:1000 in Blocklösung verdünnt, Inkubation ÜN bei 4°C) und als sekundärer Antikörper ein Anti-Kaninchen IgG (gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, Dianova, 1:10000 in Blocklösung verdünnt, Inkubation 2 h bei RT) verwendet. Nach jeder

Inkubation mit Antikörpern wurde 3 x mit TBS (je 10 min) gewaschen. Der Nachweis erfolgte wie oben beschrieben mit dem ECL-Reagenz.

### 6.6. Präparation von Außenmembranproteinen

Die Präparation von Proteinen der AM erfolgte nach Carlone et al. (42). Dazu wurden 50 ml einer ÜNK des betreffenden Stammes bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 15 ml Hepes-Puffer (10 mM, pH 7,4) gewaschen und in 1,5 ml Hepes-Puffer (10 mM, pH 7,4) mit Proteaseinhibitormix (Complete, Boehringer-Ingelheim) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem Zellaufschlussgerät bei maximaler Geschwindigkeit unter Verwendung von Silikatkügelchen (Lysing Matrix B, Q BioGene). Intakte Zellen, größere Zellfragmente sowie die Silikatkügelchen wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min vom Überstand mit den AM-Proteinen getrennt. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteine bei 15000 rpm für 30 min abzentrifugiert. Das Membranpellet wurde dann in 400 µl Hepes-Puffer (10 mM, pH 7,4) resuspendiert und anschließend mit 400 µl Hepes-Puffer (10 mM, pH 7,4) mit 2% Sarcosyl gemischt. Dieses Gemisch wurde unter gelegentlichem Invertieren bei RT für 30 min inkubiert. Danach wurden die Proteine erneut abzentrifugiert (15000 rpm für 30 min), das Pellet in 500 µl Hepes-Puffer (10 mM, pH 7,4) gewaschen und letztlich in 50 µl Hepes-Puffer (10 mM, pH 7,4) mit Proteaseinhibitormix (Complete, Boehringer-Ingelheim) aufgenommen. Davon wurden je nach OD<sub>600</sub> der ÜNK 5-12 µl für eine SDS-PAGE verwendet, wobei eine annähernd vergleichbare Proteinmenge in allen Spuren angestrebt wurde.

### 6.7. Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Um die β-Galaktosidase-Aktivität der WaaL-LacZ Fusionen in dem Stamm CC118 mit den verschiedenen pBADwaal-lacZ-Derivaten zu bestimmen, wurde ein β-Galaktosidase-Aktivitätstest (161) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml einer durch Zugabe von Arabinose induzierten ÜNK des betreffenden Klons abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT) und in 1 ml Z-Puffer (16,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 5,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,75 g KCl, 0,246 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, ad 1l H<sub>2</sub>O) aufgenommen. Mit je 100 µl dieses Ansatzes wurde zum einen die OD<sub>600</sub> bestimmt, zum anderen wurden 100 µl in 900 µl Z-Puffer gegeben und mit je 25 µl Chloroform und SDS (0,1%) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT konnte durch Zugabe von 100 µl 2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (oNPG, 0,4% in Z-Puffer gelöst) die Reaktion gestartet werden. Beim Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Als Negativkontrolle diente der *lacZ* Stamm CC118, wobei die



Reaktion nach 30 min abgestoppt wurde. Nach kurzem Abzentrifugieren (13000 rpm, 1 min) wurde die OD<sub>405</sub> gemessen und die Aktivität (Produkt in μmol pro Zeit in min und eingesetztem Volumen in l) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{l}} \right) = \frac{\Delta E_{405} \cdot V_t}{t \cdot \varepsilon \cdot V_b \cdot d \cdot \text{OD}_{600}}$$

ΔE<sub>405</sub> = Extinktion von *o*-Nitrophenol bei 405 nm

V<sub>t</sub> = Endvolumen des Ansatzes (1 ml)

t = Reaktionszeit (min)

V<sub>b</sub> = Probenvolumen (100 μl)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

OD<sub>600</sub> = eingesetzte Bakterienmenge

ε = Extinktionskoeffizient von *o*-Nitrophenol (4860 l/mol·cm)

### 6.8. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität der WaaL-PhoA Fusionen in dem Stamm CC118 mit den verschiedenen pBAD<sub>waaL</sub>-phoA-Derivaten erfolgte in Anlehnung an den Phosphatase-Aktivitätstest von Manoil (161). Dazu wurde 1 ml einer durch Zugabe von Arabinose induzierten ÜNK des betreffenden Klons abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT), in 1 ml P1-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl) gewaschen und schließlich in 1 ml P1-Puffer aufgenommen. Mit je 100 μl dieses Ansatzes wurde zum einen die OD<sub>600</sub> bestimmt, zum anderen wurden 100 μl in 900 μl P2-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>) gegeben und mit je 25 μl Chloroform und SDS (0,1%) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT konnte durch Zugabe von 100 μl *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP, 0,4%) die Reaktion gestartet werden. Beim Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 125 μl 2,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gestoppt. Als Negativkontrolle diente der *phoA*<sup>-</sup> Stamm CC118, wobei die Reaktion nach 30 min abgestoppt wurde. Nach kurzem Abzentrifugieren (13000 rpm, 1 min) wurde die OD<sub>405</sub> gemessen und die Aktivität (Produkt in μmol pro Zeit in min und eingesetztem Volumen in l) nach der Formel (siehe III 6.7.) berechnet. Der Extinktionskoeffizient von pNPP beträgt 9600 l/mol·cm.

Desweiteren wurde dieser Test verwendet, um Veränderungen der Genregulation unter verschiedenen Bedingungen bei *V. cholerae* zu untersuchen. Dazu wurde die Phosphatase-Aktivität von verschiedenen *V. cholerae* Stämmen gemessen, die eine pGP<sub>phoA</sub>-Insertion in *ompU* oder *hutA* hatten. Da die ÜNK dieser Stämme in Minimalmedium M9 mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen angezogen wurden und *phoA* als einzelne Kopie auf dem Chromosom vorlag, wurden jedoch 2 ml ÜNK abzentrifugiert und letztlich nur in 500 μl P2-Puffer aufgenommen.

### 6.9. Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag

Die rekombinanten His-Tag-Proteine WavL und WavM wurden in BL21 (DE3) pLysS bzw. BL21 (DE3) mit C-terminaler V5 Epitop/ His<sub>6</sub>-Fusion exprimiert. Nach der Transformation der Plasmide pTOPOwavL oder pTOPOwavM wurden die Bakterien in 400 ml LB/Ap bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 bei 37°C und 200 rpm im Schüttler kultiviert. Danach wurde die Temperatur auf 20°C herabgesetzt, die Expression der His-Tag-Proteine durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) in die Kultur induziert und die Bakterien ÜN bei RT inkubiert. Zur Aufreinigung der Proteine wurden die ÜNK bei 5000 rpm für 5 min bei 4°C pelletiert, in LEW (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 8) gewaschen und in 1,5 ml LEW mit Proteaseinhibitormix (Complete EDTA-free, Boehringer-Ingelheim) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem Zellaufschlussgerät bei höchster Einstellung unter Verwendung von Silikatkügelchen (Lysing Matrix B, Q BioGene). Intakte Zellen, größere Zellfragmente sowie die Silikatkügelchen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C vom Überstand getrennt. Für die Aufreinigung von WavL wurden die Protino<sup>®</sup> Ni 1000 prepacked columns (Macherey-Nagel) entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Nachdem der Überstand auf die Säule, welche zuvor mit 2 ml LEW equilibriert wurde, geladen war, wurde 2 x mit je 2 ml LEW gewaschen. Schließlich konnte WavL mit 1,5 ml Elutionspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) eluiert werden. Da WavM trotz wiederholten Versuchen unter diversen Bedingungen nicht an die Protino<sup>®</sup> Ni 1000 prepacked columns gebunden hat, wurde in diesem Fall der Überstand des Lysat nach dem Aufschluss der Zellen gegen 2 l TMD bei 4°C dialysiert (Dialyseschlauch VISKING, Typ20/32, Roth). Als Negativkontrolle diente Lysat aus BL21 (DE3), welches ebenso behandelt wurde. Durch die Dialyse war das Zelllysat weitgehend frei von störender Hintergrundaktivität wie de novo-Synthese von LPS oder Proteinbiosynthese. Das gereinigte WavL bzw. die dialysierten Zelllysate wurden direkt für den <sup>14</sup>C-Glykosyltransferase-Assay (vgl. III 6.10.) verwendet und durch SDS-PAGE mit anschließender Färbung durch Coomassie (vgl. III 6.2.-6.3.), sowie durch Western Blot überprüft (vgl. III 6.5.).

### 6.10. In vitro <sup>14</sup>C-Glykosyltransferase-Assay

Die Aktivitäten der Glykosyltransferasen WavM und WavL wurden in einem Experiment mit radioaktiv markierten Substraten untersucht. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 25 µl gereinigtem LPS (vgl. III 6.1.), radioaktiv markierten UDP-<sup>14</sup>C-Zuckern (0,2 µCi mit einer spezifische Aktivität von 304 mCi/mmol, Amersham Biosciences) und 50 µl Zellextrakt für WavM bzw. gereinigtem WavL (vgl. III 6.9.) zusammen und wurde mit TMD auf 108 µl

Endvolumen aufgefüllt. Zur Kontrolle wurden die gereinigten LPS-Proben, die Zellextrakte und das gereinigte WavL einzeln mit radioaktiv markierten UDP-<sup>14</sup>C-Zuckern in TMD gemischt. Nach Inkubation der Reaktionen ÜN bei 37°C wurde das LPS bei 13000 rpm für 30 min abzentrifugiert und in 50 µl Lysepuffer aufgenommen. Davon wurden 25 µl für eine SDS-PAGE (vgl. III 6.2.) verwendet. Danach wurde das PAA-Gel getrocknet und zur Detektion der Radioaktivität ein Röntgenfilm für 5-14 Tage aufgelegt. Zur Kontrolle wurden 15 µl des gereinigten LPS auf das gleiche PAA-Gel geladen. Diese Spuren wurden nach der SDS-PAGE abgetrennt und das LPS durch Silberfärbung (vgl. III 6.4.) sichtbar gemacht.

### **6.11. Proteinsequenzierung**

Die Sequenzierung von Proteinen wurden im Labor von Dr. A. Sickmann am Rudolf-Virchow Zentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Die Proteinbande wurde dazu aus einem mit Coomassie gefärbten PAA-Gel nach der SDS-PAGE ausgeschnitten.

## **7. Phänotypische Tests**

### **7.1. Serumresistenztest**

Das Überleben von *V. cholerae* in Gegenwart von Humanserum (gewonnen und vereinigt von 4 Labormitgliedern) wurde mit logarithmisch wachsenden Zellen bestimmt. Ein Aliquot einer Kultur (1 ml) wurde abzentrifugiert, in PBS/ 0,1% Pepton gewaschen und 250 µl dieser Kultur mit 20% menschlichem Serum in PBS/ 0,1% Pepton (Endvolumen 400 µl) gemischt. Parallel wurde ein Ansatz mit 20% hitzeinaktiviertem Serum angesetzt. Die Hitzeinaktivierung war zuvor durch Inkubation für 30 min bei 56°C erfolgt. Nach Inkubation bei 37°C für 45 min wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen, verdünnt in PBS/ 0,1% Pepton und verschiedene Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten ausplattiert.

### **7.2. Resistenz gegenüber Gallensäuren**

Die Resistenz gegenüber Gallensäure wurde durch Wachstum auf TCBS-Agarplatten untersucht. Die Bakterien wurden hierzu ausgehend von einer LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum auf eine TCBS-Agarplatte ausgestrichen. Um einen Effekt der anderen Bestandteile des Mediums auszuschließen, wurden die Bakterien parallel auf einer TCS-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen.

### 7.3. Wachstum unter Salzstress

Das Wachstum von *V. cholerae* unter Salzstress wurde in einer Wachstumskurve ermittelt. Um Einflüsse durch verschiedene Substanzen des Vollmediums zu verhindern, wurde für diese Testreihen das definierte Minimalmedium M9 mit 0,2% Glc verwendet. Dazu wurden 100 µl einer in M9 angezogenen ÜNK der betreffenden Stämme in 5 ml Testmedium (M9 mit NaCl) überimpft. Die NaCl-Konzentrationen lagen zwischen 750 und 1000 mM, wobei in Abständen von 50 mM getestet wurde. Um die Eigenschaft von Betain als schützende Substanz unter Salzstress zu untersuchen, wurde in einigen Fällen parallel eine zweite Testreihe gestartet. Dazu wurde das Testmedium, welches nun mit 2 mM Betain versetzt war, wie oben beschrieben beimpft. Die NaCl-Konzentrationen im Experiment lagen hier bei 900, 950 und 1000 mM NaCl. Die Kulturen wurden in Kapsenbergröhrchen bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. Nach 24, 48 und 72 h wurde das Wachstum durch Messung der OD<sub>600</sub> jeder Kultur bestimmt.

### 7.4. Adhäsion an Mukus

Die Adhäsionsversuche von *V. cholerae* an Mukus wurden von der Arbeitsgruppe Dr. C. Fourestier in Clermont-Feround, Frankreich durchgeführt. Die Assays wurden wie kürzlich beschrieben (84) an konfluent gewachsenen Monolayern der humanen Darmzelllinie HT-29-Rev MTX 10<sup>-6</sup> (150) in Zellkulturschalen durchgeführt.

## 8. Elektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung und Analyse am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) erfolgte am Biozentrum der Universität Würzburg im Labor von Herrn Prof. Dr. G. Krohne. Für die Analyse ganzer Zellen wurde ein Tropfen der in M9 resuspendierten Bakterien auf ein mit Pioloform beschichtetes Nickelnetzchen gegeben, für ca. 30 sec inkubiert, mit 0,5% Uranylacetatlösung abgespült und schließlich für weitere 30 sec mit einem Tropfen Uranylacetatlösung kontrastiert. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt.

Zur O Antigen-Detektion wurden 500 µl der jeweiligen ÜNK abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min), in 1 x PBS gewaschen und ÜN bei 4°C in 1 x PBS mit 4% Formaldehyd fixiert. Nach 5 x Waschen für je 3 min in 1 x PBS bei 4°C wurden die freien Aldehydgruppen durch Inkubation mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl für 15 min bei RT abgesättigt und die Probe erneut 5 x für 3 min in 1 x PBS bei 4°C gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Probe durch Inkubation für 2 x 30 min bei 4°C in Lösungen mit steigender Ethanolkonzentration (30, 50,

70, 90 und 100%). Nach Inkubation in einem Ethanol/ LR-White-Gemisch (1:1) ÜN bei 4°C wurde die Probe 4 x mit LR-White für 4 h oder ÜN bei 4°C überschichtet, anschließend in eine Gelatine kapsel überführt und zur Polymerisation für mindestens 3 Tage bei 40°C gelagert.

Am Ultramikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von ca. 50 nm angefertigt und auf ein mit Pioloform beschichtetes Nickelnetzchen gelegt.

Nach Waschen für jeweils 5 min in 1 x PBS und in TEM1 (1% BSA und 0,1% Tween 20 in 1 x PBS) wurden die Nickelnetzchen 1 h mit dem ersten Antikörper (O139-Antiserum, 1:50 in TEM1) inkubiert. Nach 4 x Waschen für je 10 min in TEM1 und 1 x in TEM2 (0,1% BSA und 0,1% Tween 20 in 1 x PBS) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen IgG mit 6 nm Goldkugeln gekoppelt, Dianova, 1:10 in TEM2) für 1 h. Nach 2 x Waschen in TEM2 und 1 x PBS für je 10 min wurde für 2 min ein Tropfen 1,25% Glutaraldehydlösung zugegeben. Danach wurde erneut 3 x mit H<sub>2</sub>O für 5 min gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte für 5 min mit Uranylacetatlösung (2%). Nach 2 x Waschen in H<sub>2</sub>O für 30 sec wurde für 5 min mit Bleicitrat inkubiert und wiederum 2 x mit H<sub>2</sub>O für 30 sec gewaschen. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt.

Die Proben wurden am TEM analysiert. Durch eine eingebaute Plattenkamera konnten von den Präparate Aufnahmen erstellt werden.

## 9. Tierversuche

Die Tierversuche wurden von der Arbeitsgruppe Dr. K. E. Klose in San Antonio, Texas durchgeführt. Verwendet wurden 5-6 Tage alte CD1 Mäuse, die 2 h vor der Inokulation mit *V. cholerae* von dem Muttertier getrennt wurden. Im sogenannten „competition assay“ wurde die Kolonisierungsfähigkeit von *V. cholerae* Mutanten (P27459 bzw. MO10-Derivate, *lac*<sup>+</sup>) mit dem Wt P27459*lacZ* (*lac*<sup>-</sup>) bzw. MO10*lacZ* (*lac*<sup>-</sup>) für O1-Stämme verglichen (136). Über den direkten Vergleich von Wt und Mutante in jeder Maus konnten Effekte durch Variationen in der Kolonisierungsfähigkeit von Tier zu Tier ausgeschlossen werden. Die Stämme wurden ÜN bei 37°C in LB angezogen, gewaschen und in 150 mM NaCl verdünnt. Mutante und Wt wurden gemischt und mit einem blauen Lebensmittelfarbstoff versetzt. 50 µl dieser Bakteriensuspension (enthielten ungefähr 10<sup>7</sup> CFU Mutanten und 10<sup>7</sup> CFU Wt) wurden mit Hilfe eines Schlauches in den Magen der mit Äther betäubten neugeborenen Mäuse injiziert. Parallel wurden geeignete Verdünnungen dieses Inokulums auf LB/X-Gal-Agarplatten ausplattiert, um die exakte Lebendzellzahl von Mutanten und Wt im Inokulum zu bestimmen. Die Mäuse wurden für 24 h ohne Nahrung bei 30°C gehalten, anschließend getötet und der

Dünndarm herauspräpariert. Nach Homogenisierung des Darms wurden geeignete Verdünnungen auf LB/Sm/X-Gal-Agarplatten ausplattiert, um die Lebendzellzahl von Mutanten und Wt im Darmhomogenat zu bestimmen. Der „competitive index“ (CI) wurde folgendermaßen ermittelt: Verhältnis von Mutanten/Wt im Dünndarmhomogenat geteilt durch das Verhältnis von Mutanten/Wt im Inokulum.

## 10. Computeranalysen

Seit August 2000 ist die DNA-Sequenz des Stammes N16961 aus dem *V. cholerae* Genomprojekt zusammen mit den annotierten ORFs veröffentlicht (106) und damit öffentlich zugänglich (<http://www.tigr.org/tdb/>).

Weitere Sequenzanalysen erfolgten mit folgenden Programmen:

Suche nach Protein- und DNA-Homologie:

<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Sequenzvergleich auf Protein- und DNA-Ebene:

<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Domänensuche:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

„Carbohydrate-Active Enzymes“ (CAZy)-Datenbank für Enzyme, die Zucker aktivieren, modifizieren oder transferieren:

<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>

Topologieanalyse:

<http://www.enzim.hu/hmmtop/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

<http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>

[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>

<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

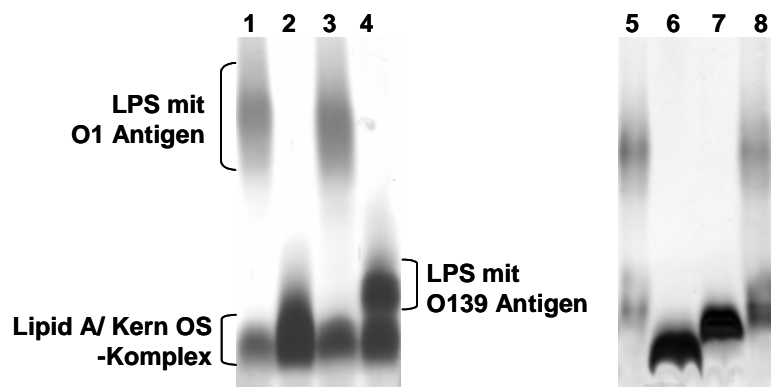
Erstellung von Hydrophobizitätsdiagrammen:

[http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc\\_mcampbell\\_genomics\\_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm](http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm)

## IV Ergebnisse

### 1. Versuch eines Kern OS-/ O Antigen-Austausches bei *V. cholerae* O1

Die bedeutende Funktion von O Antigen und Kern OS von O1 und O139, sowie der Kapsel von O139 bei der Infektion wurde u .a. im Mausmodell durch die Attenuation der LPS- und Kapsel-Mutanten im Vergleich zum Wt gezeigt (191, 194). Um eine direkte Beteiligung von O1 LPS bei der Kolonisierung des Cholera-Erregers nachzuweisen, sollte das O Antigen bzw. das Kern OS des pathogenen Stammes P27459-S durch analoge Strukturen aus anderen Gram<sup>-</sup> Bakterien ersetzt werden. Da spätere Wechselwirkungen zwischen bereits vorhandenen und neu eingebrachten *wbe*- bzw. *wa*\*-Genen ausgeschlossen werden sollten, mussten im pathogenen Ausgangsstamm P27459-S zunächst die *wbe*-Gene bzw. die *wa*\*-Gene weitgehend deletiert werden. Durch vorangegangene Analysen des *wa*\*- und *wbe*-Genclusters war genügend Information über die betroffenen chromosomalen Bereiche vorhanden, um definierte Deletionen in diesen Genclustern im Ausgangsstamm P27459-S zu erzeugen. Für den O Antigen-Austausch wurde ein 16 kb großer Bereich von *manC* bis *wbeT* deletiert. Da alle untersuchten *V. cholerae* Stämme bis zur Hep II im Kern OS keine Unterschiede zeigen, war ein weiterer Zuckerverlust im Kern OS für den Austausch nicht erforderlich. Bezüglich des Kern OS-Austausches mussten daher die 5 bzw. 8 kb großen Bereiche *wavD-H* und *wavI-L* deletiert werden, wobei jedoch die Expression der zum Teil essentiellen Genprodukte (WaaC, WavC und WaaA) nicht beeinträchtigt werden sollte. Für die Erzeugung solch umfangreicher Deletionen, wurde eine neue Methode etabliert, die auf dem Mutagenese-Verfahren mit den Suizidvektoren pKEK229 und pGP704 basiert. Diese ist in Kapitel III 4.4.3. kurz dargestellt.



**Abbildung IV.1: LPS nach SDS-PAGE (15%) und Silberfärbung.** 1: Wt P27459-S; 2: P27459 $\Delta$ *wbe*; 3: P27459 $\Delta$ *wbe* pRMB2; 4: P27459 $\Delta$ *wbe* pSSV1223K; 5: Wt P27459-S; 6: P27459 $\Delta$ *wav*; 7: P27459 $\Delta$ *wav* pBRO1core; 8: P27459 $\Delta$ *wavL* pBRO1core;

Die Abbildung IV.1 zeigt das LPS der Mutanten P27459 $\Delta$ *wbe* und P27459 $\Delta$ *wav*. Wie erwartet war im LPS von P27459 $\Delta$ *wbe* kein O Antigen mehr vorhanden (Abb. IV.1, Spur 2). Der Lipid A/ Kern OS-Komplex zeigte keinen Unterschied zum Wt. Der O Antigen-Defekt konnte durch Transformation des Plasmids pRMB2 in die Mutante aufgehoben werden (Abb. IV.1, Spur 3). Desweiteren war die Synthese der Kapsel und des O Antigens von O139 durch Einbringen des Plasmids pSSV1223K, auf welchem das *wbf*-Gencluster von O139 kodierte, möglich (Abb. IV.1, Spur 4). Die Kapsel konnte durch eine Western Blot-Analyse unter Verwendung eines O139-Antiserums nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Expressionsversuche diverser O Antigene aus anderen Bakterien blieben jedoch erfolglos. Dazu zählten die O Antigene von *E. coli* O4 (103), *K. pneumoniae* O1 (276), *Vibrio anguillarum* O2 (8), *S. enterica* sv. Borreze (132) und *Yersinia enterocolitica* O:8 und O:3 (4, 21)

Die Deletion der *wa*\*-Gene hingegen bewirkte neben dem Verlust des O Antigens auch eine deutliche Veränderung des Laufverhaltens des Lipid A/ Kern OS-Komplexes (Abb. IV.1, Spur 6). Die schnellere Migration der Lipid A/ Kern OS-Bande bei der Mutante deutet auf ein stark reduziertes Kern OS hin. Ein Verlust der putativen Heptosyl-II-Transferase WaaF führt spätestens nach der Heptose I zu einem Abbruch der Kern OS-Biosynthese. Da somit auch die im äußeren Bereich des Kern OS liegende Akzeptorstelle für das O Antigen fehlt, kann in P27459 $\Delta$ *wavL* dieses nicht mehr angeheftet werden. Das Plasmid pBRO1core konnte nur die Migration des Lipid A/ Kern OS-Komplexes verändern, aber nicht die Anheftung des O Antigens bewirken (Abb. IV.1, Spur 7). Daher wurde zunächst versucht, mit pBRO1core die Mutante P27459 $\Delta$ *wavI-L* zu komplementieren. Auch hier konnte das Einbringen von pBRO1core die O Antigen-Anheftung nicht bewirken (Daten nicht gezeigt). Erfolgreiche Komplementationsversuche einzelner *wa*\*-Gene wie z. B. *wavL* in P27459 $\Delta$ *wavL* zeigten aber, dass pBRO1core durchaus die Anheftung des O Antigens ermöglichen kann (Abb. IV.1, Spur 8, vgl. mit LPS von P27459 $\Delta$ *wavL* in Abb. VI.5, Spur 9). Aufgrund der fehlenden Komplementation wurde von einem Kern OS-Austausch abgesehen.

Da frühere Studien eine Beteiligung des LPS bei der Adhäsion an den Mukus des Darmepithels andeuteten (22), wurde die konstruierte O Antigen-Mutante P27459 $\Delta$ *wbe* hinsichtlich der Adhäsion an Mukus-produzierende Zellen getestet. Um die Wechselwirkung zwischen O Antigen und Mukus auch in der zweiten virulenten Serogruppe O139 zu analysieren, wurde die O Antigen- und Kapsel-Mutante MO10 $\Delta$ *waaLotnA* verwendet. Für die Kultivierung der Bakterien wurde AKI-Medium benutzt, da in die Untersuchung auch eine



*toxR*-Mutante einbezogen wurde. Bei Wachstum in AKI-Medium ist das ToxR-Regulon, unter dessen Einfluss wichtige Virulenzfaktoren wie z. B. das Cholera-toxin und der Toxin-koregulierte Pilus (TCP) stehen, induziert (119, 166).

**Tabelle IV.1: Adhäsion von O Antigen-Mutanten von *V. cholerae* an den Mukus.** Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Testreihen. 1) Zur Kultivierung der Bakterien wurde AKI-Medium verwendet. 2) Die Adhäsionsrate der Bakterien an den Mukus in Prozent wurde wie folgt berechnet: eingesetzte Bakterien/ adhärirte Bakterien · 100.

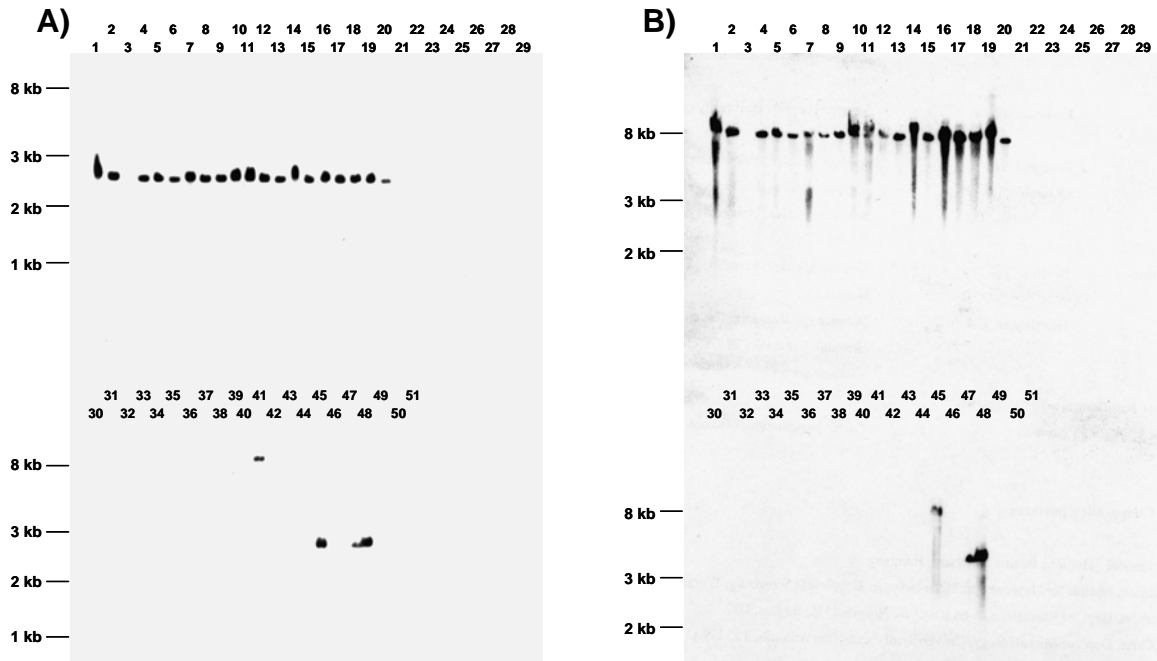
Stamm	Anzahl der eingesetzten Bakterien <sup>1)</sup>	adhärirte Bakterien (CFU pro cm <sup>2</sup> )	Adhäsionsrate (% <sup>2)</sup> )
Wt MO10	$9,6 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^5$	46
MO10 $\Delta$ <i>waaLotnA</i>	$9,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	15
Wt P27459-S	$7,6 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^5$	72
P27459 $\Delta$ <i>toxR</i>	$1,3 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^5$	19
P27459 $\Delta$ <i>wbe</i>	$1,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	11

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV.1 aufgeführt. Dabei zeigten P27459-S und MO10, die Wt Stämme der Serogruppen O1 und O139, eine durchweg hohe Adhäsionsrate von 72 bzw. 46%. Alle getesteten Mutanten adhärirten schlechter als der jeweilige Wt. Bei der Mutante P27459 $\Delta$ *toxR* wurde eine Verringerung der Adhäsionsrate um den Faktor 3 beobachtet. Im Fall der LPS-Mutanten konnte für MO10 $\Delta$ *waaLotnA* eine dreifache, für P27459 $\Delta$ *wbe* sogar eine sechsfache Reduktion im Vergleich zum Wt festgestellt werden.

## 2. Die O1/ O139-spezifischen Gene *wavD* und *wavJ*

### 2.1. Verbreitung und Funktionsanalyse von WavD und WavJ

Vergleichende Analysen des *wa*\*-Genclusters von pathogenen und apathogenen *V. cholerae* Isolaten zeigten eine Assoziation zwischen der Fähigkeit Cholera zu verursachen und einem bestimmten *wa*\*-Gencluster (Typ 1) auf (191). Um den Aufbau und die mögliche Rolle der Kern OS-Struktur der Cholera-verursachenden Isolate mit dem *wa*\*-Gencluster Typ 1 zu verstehen, wurden die kodierten Genprodukte WavJ und WavD im Detail untersucht.



**Abbildung IV.2: Southern Blot zur Ermittlung der Verbreitung von *wavJ* (A) und *wavD* (B) im Genom verschiedener *V. cholerae*-Isolate.** Stämme der Serogruppe O1 sind durch <sup>1)</sup>; Stämme der Serogruppe O139 durch <sup>2)</sup> gekennzeichnet. Für Details zu den Stämmen siehe Tab. III.1.

1: AI1837; <sup>2)</sup>	10: F1873; <sup>1)</sup>	19: O395;	28: Ch154;	37: Ch762;	46: 1528-79;
2: AI1838; <sup>2)</sup>	11: F1875; <sup>1)</sup>	20: P27459; <sup>1)</sup>	29: Ch187;	38: Ch765;	47: 3223-74; <sup>1)</sup>
3: AI1841; <sup>2)</sup>	12: M654; <sup>1)</sup>	21: O83;	30: Ch309;	39: Ch780;	48: O37;
4: AI1852; <sup>2)</sup>	13: M799; <sup>1)</sup>	22: O103;	31: Ch359;	40: Ch821;	49: 170/99B;
5: AI4450; <sup>2)</sup>	14: M804; <sup>1)</sup>	23: A2-2;	32: Ch430;	41: Ch18001;	50: OA2-3 (1);
6: C6709; <sup>1)</sup>	15: M807; <sup>1)</sup>	24: B2-3(5);	33: Ch433;	42: Ch18022;	51: CLP1;
7: CO966; <sup>1)</sup>	16: M817; <sup>1)</sup>	25: B2-2(6);	34: Ch457;	43: Ch18117/I;	
8: CO968; <sup>1)</sup>	17: MAK757; <sup>1)</sup>	26: Ch83;	35: Ch757;	44: Ch 18133;	
9: CO970; <sup>1)</sup>	18: MO10; <sup>2)</sup>	27: Ch84;	36: Ch761;	45: 2559-78; <sup>1)</sup>	

Vorangegangene PCR-Analysen und Sequenzierungen einzelner Teilbereiche des *wa\**-Genclusters verschiedener Stämme ließen die weitgehende Abwesenheit von *wavD* und *wavJ* in allen zur Verfügung stehenden apathogenen Umweltisolaten vermuten. Zur Bestätigung dieses Verdachts wurde ein Southern Blot (Abbildung IV.2) mit chromosomaler DNA von 51 verschiedenen *V. cholerae* Isolaten durchgeführt. Die chromosomale DNA wurde zuvor mit *PstI* verdaut, was der veröffentlichten Genomsequenz von Stamm N16961 (106) zufolge zu einem 2,5 kb Fragment mit *wavJ* und einem 8,8 kb Fragment mit *wavD* führen sollte. Die aufgereinigten PCR-Produkte, welche auch zur Klonierung der Expressionsplasmide pTrc99AwavD und pTrc99AwavJ eingesetzt wurden (siehe III 5.8.4.), dienten als Sonden. Diese PCR-Fragmente enthielten die vollständige kodierende Region des jeweiligen Gens.

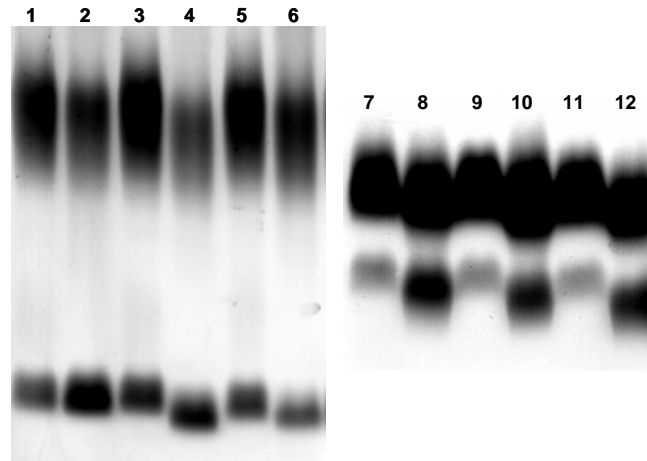
Nach sukzessiver Detektion von *wavJ* und *wavD* (Abb. IV.2 A und B) wurde noch eine weitere Hybridisierung mit einer *wavB*-Sonde als Positivkontrolle durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Das Gen *wavB* liegt ebenfalls im *wa\**-Gencluster, kodiert für eine putative  $\beta$ -1,4-Glykosyltransferase und ist nach bisherigen Analysen in allen Stämmen von *V. cholerae* vorhanden (191, 229). Daher sollte mit einer *wavB*-Sonde bei allen aufgetragenen Proben eine Bande detektierbar sein. Da dies für die Proben in den Spuren 3, 35 und 49 nicht der Fall war, konnte über diese Stämme hinsichtlich der Präsenz von *wavJ* und *wavD* keine Aussage getroffen werden. Es ist jedoch durchaus möglich, dass sie bei ihrer Isolierung falsch klassifiziert wurden und es sich bei diesen Umweltisolaten gar nicht um *V. cholerae* handelt. Daneben wurde in allen untersuchten Stämmen der Serogruppe O1 und O139 *wavJ* und *wavD* nachgewiesen. Beide Gene konnten ebenfalls in einem Isolat der Serogruppe O37 (Abb. IV.2 A und B, Spur 48) detektiert werden. Ferner hybridisierte mit der *wavJ*-Sonde eine Bande in Spur 41. Diese liegt jedoch mit ca. 8 kb weit über der erwarteten 2,5 kb Bande.

Das Protein WavD (VC0228, im Weiteren erfolgt die Angabe des Locus für O1 oder in allen anderen Fällen die Angabe der Accession-Nummer für die einzelnen Genprodukte in Klammern) ist 319 AS lang, hat ein errechnetes Molekulargewicht von 37,7 kDa und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 9,71. Das 39,5 kDa große WavJ (VC0235) hat eine Länge von 349 AS und einen theoretischen pI von 8,28. Das Hydrophobizitätsmodell nach Kyte und Doolittle ergab für beide Proteine keine auffälligen hydrophoben Bereiche, die eine Transmembrandomäne vermuten lassen (146).

Das Domänensuchprogramm des NCBI-Server (163) konnte WavD weder einer Proteinfamilie noch einem bekannten Motiv zuordnen. Bemerkenswert war jedoch die Identität (30%) zu WavE (AAF93405), welches direkt neben WavD im *wa\**-Gencluster von *V. cholerae* O1 kodiert. Eine BLAST-Suche (5) für WavD ergab nur eine Homologie mit einer Identität von 34% zu einem konservierten hypothetischen Protein (PSPTO0713) von *Pseudomonas syringae* DC3000. Das Domänensuchprogramm des NCBI-Server fand für WavJ anhand der Proteinsequenz homologe Bereiche zu der Glykosyltransferase-Familie 9 (Pfam01075) und zu RfaF, als Vertreter der ADP-Heptose:LPS Heptosyltransferasen (COG0859). In der CAZy-Datenbank wurde WavJ ebenfalls der Glykosyltransferase-Familie 9 zugeordnet (59). Nach bisherigem Erkenntnisstand besitzen Proteine dieser Familie eine N-Acetyl-Glucosaminyltransferase- oder Heptosyltransferase-Aktivität. Eine BLAST-Suche auf Proteinebene ergab, dass WavJ Homologie zu einigen Heptosyltransferasen anderer Bakterien zeigt. Darunter waren z. B. mit 30% Identität die Heptosyl-I-Transferase (AAD07342) von

*Helicobacter pylori* und mit 25% Identität eine Heptosyltransferase (NP\_661126) von *Chlorobium tepidum* TLS zu finden.

## 2.2. Phänotypische Charakterisierung von *wavD*- und *wavJ*-Mutanten



**Abbildung IV.3: LPS von *wavD*- und *wavJ*-Mutanten nach SDS-PAGE (16,5%) und Silberfärbung.** 1: Wt P27459-S; 2: P27459 $\Delta$ *wavD*; 3: P27459 $\Delta$ *wavD* pTrc99A*wavD*; 4: P27459 $\Delta$ *wavJ*; 5: P27459 $\Delta$ *wavJ* pTrc99A*wavJ* 6: P27459 $\Delta$ *wavDJ*; 7: Wt MO10; 8: MO10 $\Delta$ *wavD*; 9: MO10 $\Delta$ *wavD* pTrc99A*wavD*; 10: MO10 $\Delta$ *wavJ*; 11: MO10 $\Delta$ *wavJ* pTrc99A*wavJ*; 12: MO10 $\Delta$ *wavDJ*;

Um den Einfluss von WavJ und WavD auf die LPS-Biosynthese näher zu untersuchen, wurden entsprechende Deletionsmutanten in den Stämmen P27459-S und MO10 etabliert. Erste Anhaltspunkte hinsichtlich der Funktion und Aktivität dieser Genprodukte lieferte die Analyse des gereinigten LPS aus diesen *wa*\*-Mutanten durch SDS-PAGE (Abbildung IV.3). Beide Mutationen führten zu einem veränderten Laufverhalten des Lipid A/ Kern OS-Komplexes, hatten aber keinen sichtbaren Einfluss auf die O Antigen-Synthese bzw. dessen Anheftung. So läuft die Lipid A/ Kern OS-Bande bei den *wavD*-Mutanten leicht, bei den *wavJ*-Mutanten deutlich unterhalb der entsprechenden Wt-Bande. Die Effekte erscheinen bei O139 stärker, als bei O1. In den Mutanten beider Serogruppen konnte durch die Komplementationsplasmide pTrc99A*wavD* bzw. pTrc99A*wavJ* der wildtypische Zustand wiederhergestellt werden. Die schnellste Migration der Lipid A/ Kern OS-Bande wurde sowohl für O1, als auch für O139 durch die Deletion beider Gene in den Doppelmutanten P27459 $\Delta$ *wavDJ* und MO10 $\Delta$ *wavDJ* erzielt.

LPS ist als Hauptbestandteil der äußeren Schicht der AM unter anderem an der Stabilität und Funktionalität dieser beteiligt (196). Insbesondere das Kern OS trägt entscheidend zur Integrität der AM bei. Dadurch wird die Diffusion hydrophober Substanzen mit geladenen

Gruppen effektiv vermindert. Mutationen, welche zu Veränderungen des Kern OS führen, können die Sekretion und Aktivität extrazellulärer Proteine, aber auch die Faltung von Oberflächenstrukturen und Proteinen der AM beeinflussen (18, 173, 270). Weiterhin konnte beispielsweise für *E. coli*, *S. typhimurium* und *V. cholerae* bei Mutanten mit defektem Kern OS eine Sensitivitätszunahme gegenüber membranangreifenden Substanzen beobachtet werden (188, 194, 198, 262, 282).

Daher wurden die *wavD*- und *wavJ*-Mutanten beider Serogruppen bezüglich ihrer Resistenz gegenüber verschiedenen Agenzien untersucht. Zu den getesteten Substanzen zählten anionische hydrophobe Detergenzien (z .B. Novobiocin, Gallensäure) ebenso wie Defensine (z .B. Protamin), die einen unspezifischen Abwehrmechanismus des Immunsystems darstellen. Novobiocin wirkt nicht nur als Detergenz, sondern kann auch die semi-konservative Replikation der DNA spezifisch inhibieren (242). Gallensäuren spielen insbesondere bei der Fettverdauung im menschlichen Körper eine wichtige Rolle und können im oberen Dünndarmtrakt je nach Nahrung eine Konzentration von bis zu 1% erreichen (114). Defensine sind kurze polykationische Peptide, die sich über elektrostatische Wechselwirkungen in das LPS einlagern, dabei zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  verdrängen und so die Integrität der AM zerstören können (261). Weiterhin wird vermutet, dass durch eine Einlagerung der Defensine in die CM die Depolarisation dieser bewirkt werden kann (80). Neben den Defensinen ist auch das zu der unspezifischen humoralen Immunabwehr gehörende Komplementsystem im Darmtrakt vertreten. Insbesondere der alternative Weg über den C3-Aktivator kann durch mikrobielle Komponenten wie Lipoteichonsäuren und LPS ausgelöst werden. Für die Resistenz von Gram<sup>-</sup> Bakterien gegenüber dem alternativen Weg der Komplementaktivierung ist aber gerade die LPS-Dichte auf der AM und die Beschaffenheit des O Antigens von entscheidender Bedeutung (121). Daher wurde auch auf das Überleben in Gegenwart von Humanserum getestet. Abschließend wurde die Kolonisierungsfähigkeit der Mutanten im Vergleich zum Wt in neugeborenen Mäusen untersucht.

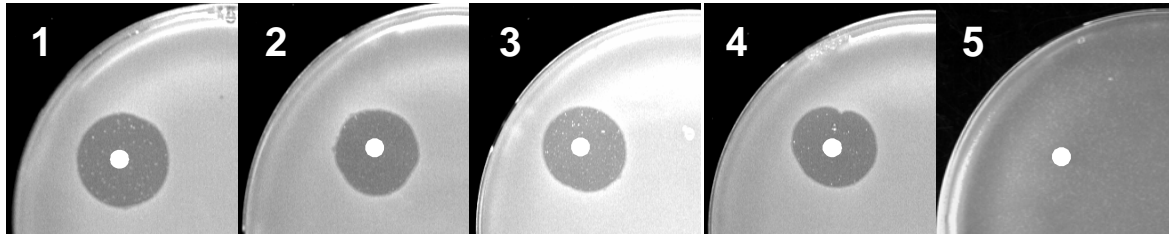
**Tabelle IV.2: Phänotypische Charakterisierung von *wavJ*- und *wavD*-Mutanten in O1 und O139.** Alle Untersuchungen wurden mindestens viermal unabhängig durchgeführt. 1) Der prozentuale Anteil überlebender Zellen wurde folgendermaßen berechnet:  $100 \cdot (100 \cdot \text{CFU nach Inkubation in 20\% Serum} / \text{CFU nach Inkubation in 20\% hitzeinaktiviertem Serum}) / \text{prozentualen Anteil überlebender Zellen des Wt P27457-S bzw. MO10}$ . Angegeben ist der Mittelwert aus den unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. 2) Der „competitive index“ drückt die Kolonisierungsfähigkeit im Vergleich zum Wt aus und wurde wie folgt ermittelt: Verhältnis von Mutante/Wt im Dünndarmhomogenat geteilt durch das Verhältnis von Mutanten/Wt im ursprünglichen Inokulum.

Stamm	MHK Novobiocin ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBK Protamin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Serumresistenz (% Überleben <sup>1)</sup> )	Kolonisierung „in vivo“ („competitive index“ <sup>2)</sup> )	Wachstum auf TCBS-Platten
Wt MO10	0,75	150			+
MO10 $\Delta$ <i>wavD</i>	0,75	150	100%	0,46	+
MO10 $\Delta$ <i>wavJ</i>	0,75	150	100%	0,3	+
MO10 $\Delta$ <i>wavDJ</i>	0,375	150	99,03 $\pm$ 2,42	0,21	+
Wt P27459-S	1,5	150			+
P27459 $\Delta$ <i>wavD</i>	1,5	150	n.d.	0,78	+
P27459 $\Delta$ <i>wavJ</i>	1,5	150	n.d.	1,07	+
P27459 $\Delta$ <i>wavDJ</i>	0,75	150	88,5% $\pm$ 25,7	2,91	+

Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung sind in Tabelle IV.2 aufgeführt und können nun mit denen anderer Mutanten aus früheren Analysen verglichen werden (188, 194, 229). Eine Veränderung der Resistenz gegenüber Protamin oder Gallensäure im Vergleich zum Wt konnte für keine Mutante unabhängig der Serogruppe beobachtet werden. Auch das Überleben in Gegenwart von Humanserum war bei den Doppelmutanten P27459 $\Delta$ *wavDJ* und MO10 $\Delta$ *wavDJ* ähnlich hoch wie beim jeweiligen Wt, weshalb die Einzelmutanten für die Serogruppe O1 dahingehend nicht weiter untersucht wurden. Dennoch zeigten die Doppelmutanten P27459 $\Delta$ *wavDJ* und MO10 $\Delta$ *wavDJ* eine Sensitivitätszunahme gegenüber Novobiocin. Dies konnte bei keiner Einzelmutante festgestellt werden. „In vivo“ wurde nur bei den Mutanten der Serogruppe O139 eine signifikante Reduktion der Kolonisierungsfähigkeit erfasst. Dabei war die Doppelmutante MO10 $\Delta$ *wavDJ* am stärksten attenuiert.

Der Phage K139 wurde erstmals 1995 beschrieben (218) und anschließend in unserer Arbeitsgruppe von D. Kapfhammer ausführlich charakterisiert (127). Ursprünglich aus O139 isoliert, ist der Phage zwar in der Lage O1 Stämme, aber nicht Stämme der Serogruppe O139 zu infizieren. Dabei dient das O1 Antigen als Rezeptor, während das Kern OS eine wichtige Rolle bei der Penetration zu spielen scheint (189, 192). Da K139 innerhalb der klinischen Isolate von O1 und O139 weit verbreitet ist, belegen diese und weitere Befunde die Hypothese, dass die Serogruppe O139 aus O1 El Tor Stämmen durch Serogruppenkonversion hervorgegangen ist (111). J. Nesper benutzte den Phagen K139 zur Erzeugung spontan

phagenresistenter *V. cholerae* O1 Mutanten und konnte so diverse LPS-Mutanten isolieren (188). Wie bereits in der Diplomarbeit wurde der hochlytische Phage K139.cm9 zur Charakterisierung von LPS-Mutanten verwendet (229).



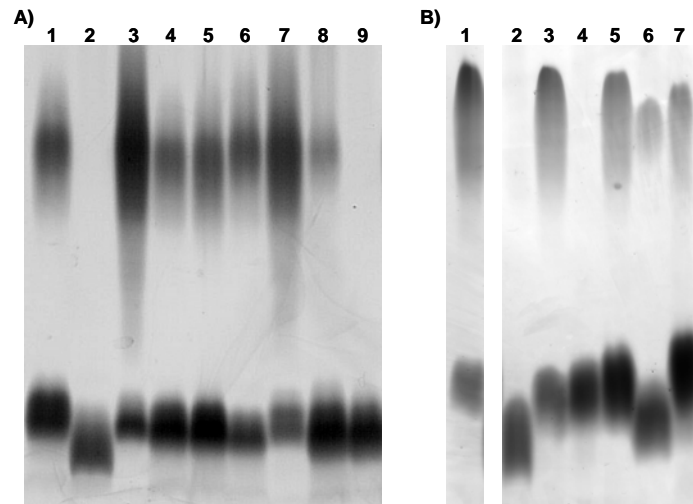
**Abbildung IV.4: Phagenplaquestudien mit K139.cm9.** Die Auftropfstelle des Phagenlysats ist durch einen hellen Kreis markiert. 1: Wt. P27459-S; 2: P27459 $\Delta$ wavD; 3: P27459 $\Delta$ wavJ; 4: P27459 $\Delta$ wavDJ; 5: P27459wavB;

In Abbildung IV.4 ist die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber K139.cm9 der *wavD*- und *wavJ*-Mutante der Serogruppe O1 gezeigt. P27459 $\Delta$ wavD, P27459 $\Delta$ wavJ und die Doppelmutante P27459 $\Delta$ wavDJ zeigten keinen Unterschied in der Sensitivität im Vergleich zum Wt. Als Kontrolle wurde die phagenresistente putative  $\beta$ -1,4-Glykosyltransferase-Mutante P27459wavB in die Analyse mit einbezogen.

### 3. Charakterisierung der O Antigen-Ligase WaaL von *V. cholerae*

#### 3.1. Analyse von *wa*\*-Mutanten hinsichtlich der Anheftung des O Antigens

Um die Strukturen des Kern OS zu identifizieren, welche für die Erkennung durch die O Antigen-Ligase und die Anheftung des O Antigens essentiell sind, wurden systematisch die Gene des *wa*\*-Genclusters in P27459-S durch Insertions- und/ oder Deletionsmutagenese zerstört. Dabei wurden *waaC*, *wavC* und *waaA* unter Berücksichtigung ihrer wahrscheinlichen Funktion (*waaC* kodiert die Heptosyl-I-Transferase, *wavC* die KDO-Kinase und *waaA* die putative KDO-Transferase) und infolge vergleichender Analysen mit *E. coli* als putativ essentiell eingestuft und nicht in diese Mutantenreihe einbezogen.



**Abbildung IV.5: Analyse von *wa\**-Mutanten von P27459-S. LPS nach SDS-PAGE (A: 16% und B: 15%) und Silberfärbung.** A) 1: Wt P27459-S; 2: P27459*wavA*; 3: P27459*wavE*; 4: P27459*wavF*; 5: P27459*wavG*; 6: P27459*wavI*; 7: P27459*wavK*; 8: P27459 $\Delta$ *wavL* pTrc99A*wavL*; 9: P27459 $\Delta$ *wavL*; B) 1: Wt P27459-S; 2: P27459*waaF*; 3: P27459*waaF* pACYC*waaF*; 4: P27459*waaL*; 5: P27459*waaL* pBAD18-Kan*waaL*; 6: P27459*wavB*; 7: P27459*wavB* pTetR*wavB*;

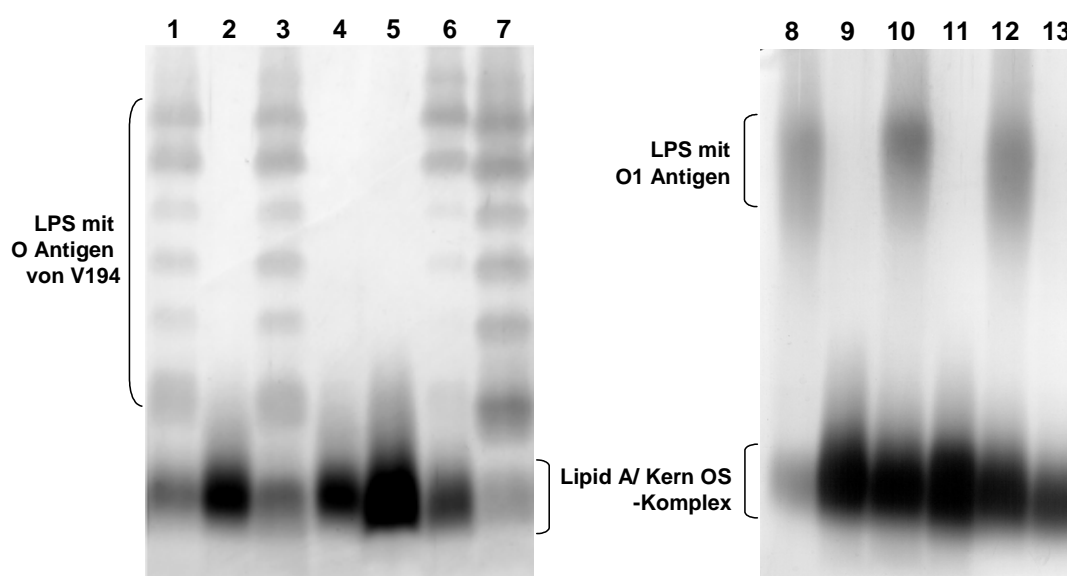
Das gereinigte LPS aus den erzeugten Mutanten wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert (Abbildung IV.5 A). Das LPS von Mutanten, die aus früheren Untersuchungen zur Verfügung standen (191), ist mit zugehöriger Komplementation in Abbildung IV.5 B dargestellt. Da mehrere Versuche, das Gen *wavH* durch Insertion des Suizidvektors pGP704 zu zerstören, scheiterten, konnte die entsprechende Mutante nicht erzeugt werden. Durch Deletion von *wavH* in der Mutante P27459 $\Delta$ *wav* (siehe III 5.8.3. und IV 1.) konnte jedoch gezeigt werden, dass *wavH* keineswegs essentiell ist. Auf die Gene *wavD* und *wavJ*, sowie ihren Einfluss auf das LPS wurde bereits ausführlich in Kapitel IV 2. eingegangen. Ein Verlust des O Antigen konnte nur beim LPS der Mutanten P27459*wavA*, P27459 $\Delta$ *wavL*, P27459*waaF* und P27459*waaL* beobachtet werden (Abb. IV.5 A, Spuren 2 und 9, sowie B, Spuren 2 und 4). Da *wavA* und *waaF* für die putativen Heptosyl-II- und III-Transferasen kodieren, ist das fehlende O Antigen bei diesen Mutanten durch den Abbruch der Kern OS-Biosynthese und der damit fehlenden Akzeptorstelle für das O Antigen erklärbar. Das verkürzte Kern OS dieser Mutanten äußerte sich auch in dem schnelleren Laufverhalten des Lipid A/Kern OS-Komplexes im PAA-Gel. Neben der Mutation der O Antigen-Ligase WaaL, führte demzufolge nur noch die Mutation von *wavL* zum Verlust des O Antigen. Dabei war nur ein geringer Einfluss auf das Kern OS, verglichen zu den signifikanten Effekten bei den Heptosyltransferase-Mutanten, zu erkennen. Eine Komplementation der Mutante P27459 $\Delta$ *wavL* durch das Expressionsplasmid pTrc99A*wavL* war möglich (Abb. IV.5 A, Spur 8).



### 3.2. Komplementationsstudien von WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup>

Für eine genaue Charakterisierung der schwach homologen O Antigen-Ligasen der verschiedenen *wa\**-Genclustertypen von *V. cholerae*, sollten die WaaL's aus Stämmen mit unterschiedlichen *wa\**-Genclustern näher untersucht werden. Für diese Studie wurden WaaL<sup>P27459</sup>, die O Antigen-Ligase des O1 El Tor Stammes P27459 mit dem *wa\**-Genclustertyp 1, und WaaL<sup>V194</sup>, die O Antigen-Ligase aus dem apathogenen Umweltisolat V194 mit dem *wa\**-Genclustertyp 2, ausgewählt. Da V194 unter Verwendung der etablierten Methoden, wie Konjugation und Transformation, genetisch gut manipulierbar war, eignete sich dieses Isolat sehr gut für die folgenden Analysen. Die beiden O Antigen-Ligasen besitzen auf Proteinebene eine Identität von nur 23,7%. Zudem unterscheiden sich diese beiden *wa\**-Gencluster in der Anwesenheit von *wavJ* und *wavD* bei P27459 und *wavM* bei V194.

Um zu testen, ob die O Antigen-Ligasen fähig waren, in dem jeweils anderen Stamm eine *waaL*-Mutation zu komplementieren, wurde zunächst neben der bereits vorhandenen *waaL*-Mutante in P27459 diese in V194 benötigt. Weiterhin wurden die entsprechenden Gene der O Antigen-Ligasen in das Expressionsplasmid pBAD18-Kan kloniert. Durch die Verwendung des gleichen Ausgangsvektors konnten unterschiedliche Komplementationseigenschaften durch Variation der Expressionsstärke nahezu ausgeschlossen werden. Anschließend wurden die Plasmide in die jeweiligen Mutanten transformiert und das LPS durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert.



**Abbildung IV.6: Komplementationsversuche mit WaaL von P27459 und V194. LPS nach SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung.** 1: Wt V194; 2: V194*waaL*; 3: V194*waaL* pBAD18-KanwaaLV194; 4: V194*waaL* pBAD18-KanwaaL; 5: V194*wavM*; 6: V194*wavM* pBAD18-KanwavMV194; 7: V194*wavM* pBAD18-KanwaaL; 8: Wt P27459-S; 9: P27459-S pBAD18-KanwavMV194; 10: P27459*waaL* pBAD18-KanwaaLwavMV194; 11: P27459*waaL* pBAD18-KanwaaLV194; 12: P27459*waaL* pBAD18-KanwaaL; 13: P27459*waaL*;

Das silbergefärbte PAA-Gel ist in Abbildung IV.6 dargestellt. Wie zu erwarten, waren weder P27459*waaL* noch V194*waaL* in der Lage das O Antigen an den Lipid A/ Kern OS-Komplex anzuhängen. Daher trat im LPS dieser Mutanten kein O Antigen auf (Abb. IV.6, Spuren 2 und 13), wogegen die Lipid A/ Kern OS-Bande unverändert war. Durch Expression der eigenen O Antigen-Ligase konnten die Effekte aufgehoben und der Zustand des Wt annähernd wiederhergestellt werden (Abb. IV.6, Spuren 3 und 12). Der Versuch einer Komplementation mit der jeweils fremden O Antigen-Ligase zu erzielen, schlug für beide *waaL*-Mutanten fehl (Abb. IV.6, Spuren 4 und 11).

Die *wa*\*-Gencluster von P27459 und V194 unterscheiden sich einerseits in der Anwesenheit von *wavD* und *wavJ* bei P27459. Diese Gene bzw. deren Funktionen spielen aber für die O Antigen-Anheftung keine Rolle (siehe Kapitel IV 2.). Andererseits fehlt in P27459 das in V194 vorhandene Gen *wavM*. Um dessen Rolle ebenfalls zu analysieren, wurde die Mutante V194*wavM* hergestellt und das LPS untersucht. Wie in Spur 5 der Abbildung IV.6 zu sehen, ist auch diese Mutante nicht mehr zur Anheftung des O Antigens in der Lage. Eine Komplementation war durch Einbringen des Expressionsplasmids pBAD18-Kan*wavMV194* in V194*wavM* möglich (Abb. IV.6, Spur 6). Eine Expression von *WaaL*<sup>V194</sup> durch pBAD18-Kan*waaLV194* in V194*wavM* hatte keinen Einfluss auf den O Antigen-Verlust (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte aber nun die Expression von *WaaL*<sup>P27459</sup> durch pBAD18-Kan*waaL* die Anheftung des O Antigens in V194*wavM* bewirken (Abb. IV.6, Spur 7).

In P27459-S führte *WavM*, über pBAD18-Kan*wavMV194* in trans exprimiert, zu einer Blockierung der eigenen O Antigen-Ligase *WaaL*<sup>P27459</sup> und somit zum Verlust des O Antigens (Abb. IV.6, Spur 9). Demgegenüber war die Mutante P27459*waaL* durch Einbringen des Plasmids pBAD18-Kan*waaLV194* und der daraus folgenden Expression von *WaaL*<sup>V194</sup> in Kombination mit *WavM* wieder in der Lage, das O Antigen an den Lipid A/ Kern OS-Komplex anzuheften (Abb. IV.6, Spur 10).

### 3.3. Charakterisierung der Aktivitäten von *WavL* und *WavM*

#### 3.3.1. *WavL* aus P27459

Das 67,1 kDa große Protein *WavL* (VC0239) umfasst 591 AS. Die Blast-Suche (5) ergab über nahezu die gesamte Proteinsequenz von *WavL* 65% Identität zu einer putativen Glykosyltransferase (AAR27963.1) aus *Aeromonas hydrophila* und 44% Identität zu einer Polysacchariddeacetylase (ZP\_00143243.1) aus *Fusobacterium nucleatum*. Eine Suche nach konservierten Domänen (163) zeigte, dass es sich bei *WavL* wahrscheinlich um ein Protein

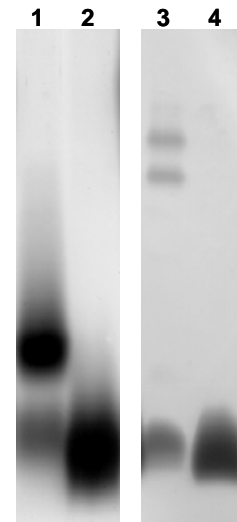
mit zwei Domänen handelt. Dabei wurden für den N-terminalen Teil von AS 1 bis 342 Ähnlichkeiten zur Glykosyltransferase-Familie 1 (Pfam00534) und von AS 13 bis 260 zur MurG-Familie (COG0707), zu welcher UDP-N-Acetyl-Glucosamin:LPS N-Acetyl-Glucosaminyltransferasen gehören, entdeckt. Der C-terminale Teil konnte von AS 348 bis 544 der CDA1-Gruppe (COG0726), zu der Xylanasen und Chitindeacetylasen gehören, und von AS 405 bis 543 der Familie der Polysacchariddeacetylasen (Pfam01522) zugeteilt werden.

Um die Rolle der beiden putativen Enzymaktivitäten bezüglich der O Antigen-Anheftung getrennt zu analysieren, wurde ein größerer Bereich von *wavL* in P27459-S als bei der in IV 3.1. vorgestellten Mutante P27359 $\Delta$ *wavL* deletiert. Die neue Mutante P27359 $\Delta$ 1*wavL* besaß nur noch 176 AS vom N-terminalen und 100 AS am C-terminalen Bereich, wodurch nun große Teile beider Domänen entfernt worden waren. Wie in Abbildung IV.7 gezeigt, konnte die O Antigen-Anheftung in dieser Mutante sowohl durch das komplette WavL, kodiert auf pGEM*wavL*, als auch durch den N-terminalen Teil von WavL mit der Glykosyltransferase-Domäne, kodiert auf pGEM*wavL*(N-term), erreicht werden.



**Abbildung IV.7: Domänenanalyse von WavL.** LPS nach SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung.

- 1: Wt P27459-S;
- 2: P27459 $\Delta$ 1*wavL*;
- 3: P27459 $\Delta$ 1*wavL* pGEM*wavL*;
- 4: P27459 $\Delta$ 1*wavL* pGEM*wavL*(N-term);

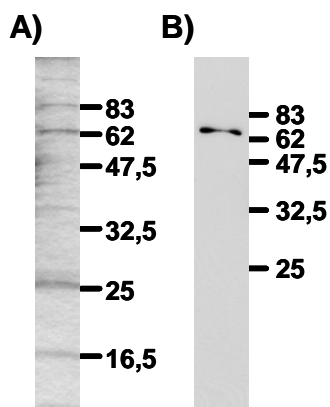


**Abbildung IV.8: *wavL*-Mutanten in MO10 und V194.** LPS nach SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung.

- 1: Wt MO10;
- 2: MO10*wavL*;
- 3: Wt V194;
- 4: V194*wavL*;

Vergleichende Analysen ergaben, dass *wavL* bei allen bisher untersuchten *V. cholerae* Stämmen unabhängig vom Kern OS-Typ im *wa\**-Gencluster vorhanden ist (191). Daher wurde für die Serogruppe O139 und für den Umweltstamm V194 durch Mutation von *wavL* geprüft, ob die Aktivität von WavL auch in diesen Isolaten für die O Antigen-Anheftung essentiell ist. Das LPS der Mutanten MO10*wavL* und V194*wavL* ist in Abbildung IV.8 dargestellt. In beiden Stämmen bewirkte die Mutation von *wavL* den Verlust des O Antigens.

Um die durch bioinformatische Analysen (siehe oben) vorhergesagte Glykosyltransferase-Aktivität von WavL, welche scheinbar kritisch für die O Antigen-Anheftung ist, näher zu charakterisieren, wurde *wavL* von P27459 in pCR<sup>®</sup>T7/CT-TOPO<sup>®</sup> kloniert (siehe III 5.8.5.). Daher konnte WavL nun als rekombinantes Protein mit N-terminaler His-Tag-Fusion exprimiert und über Ni<sup>2+</sup>-Matrix-Säulen aufgereinigt werden (siehe III 6.9.).

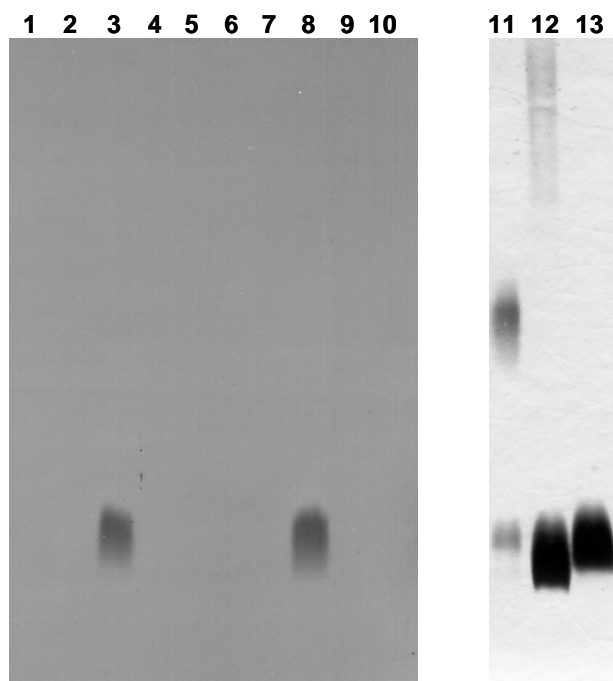


**Abbildung IV.9: Aufreinigung von WavL mit N-terminalem His-Tag.** Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben.

A) Coomassie gefärbtes PAA-Gel (15%) nach SDS-PAGE der aufgereinigten Proteinfraction mit His-Tag-WavL;

B) Western Blot derselben Probe. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen Anti-His-Antikörpern.

Eine Probe der eluierten Proteinfraction, welche WavL mit N-terminalem His-Tag enthält, ist in Abbildung IV.9 A nach SDS-PAGE und Färbung durch Coomassie gezeigt. Dabei sind vier stärkere Banden zu erkennen. Im Western Blot wurde bei Verwendung der gleichen Probe jedoch nur die Bande knapp über 62 kDa durch monoklonale Anti-His-Antikörper detektiert. Dies stimmt mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von WavL von ca. 67,1 kDa überein. Die Proteinkonzentration des Eluats wurde nach der Methode von Bradford (35) bestimmt und lag bei 60 µg/ml.



**Abbildung IV.10: Einbau von  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc ins LPS durch WavL.** Spuren 1 bis 10 zeigen einen entwickelten Röntgenfilm nach Exposition auf dem getrockneten PAA-Gel (16%), auf welchem zuvor die Reaktionsgemische aufgetragen und durch SDS-PAGE aufgetrennt worden sind. Spuren 11 bis 13 zeigen das gereinigte LPS, welches in den Reaktionsansatz gegeben wurde, auf demselben PAA-Gel nach SDS-PAGE und Silberfärbung.

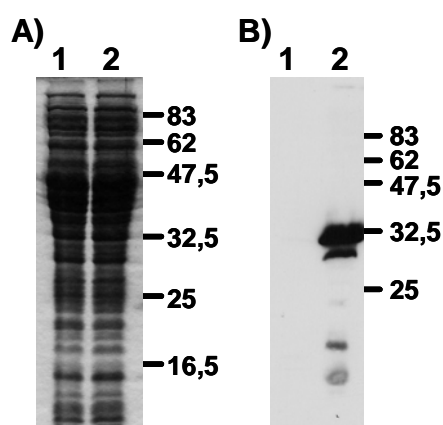
- 1: LPS von Wt P27459-S + WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 2: LPS von Wt P27459-S + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 3: LPS von P27459 $\Delta$ wavL + WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 4: LPS von P27459 $\Delta$ wavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 5: WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 6: LPS von P27459 $\Delta$ wavLwavA + WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 7: LPS von P27459 $\Delta$ wavLwavA + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 8: LPS von P27459 $\Delta$ wavL + WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc;
- 9: LPS von P27459 $\Delta$ wavL + WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -Gal;
- 10: LPS von P27459 $\Delta$ wavL + WavL + UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc;
- 11: LPS von Wt P27459-S;
- 12: LPS von P27459 $\Delta$ wavLwavA;
- 13: LPS von P27459 $\Delta$ wavL;

Das Eluat mit His-Tag-WavL wurde mit radioaktiv markierten UDP- $^{14}\text{C}$ -Zuckern und gereinigtem LPS aus P27459-S, P27459 $\Delta$ wavL oder P27459 $\Delta$ wavLwavA in einen  $^{14}\text{C}$ -Glykosyltransferase-Assay (siehe III 6.10.) eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung IV.10 dargestellt. Nur in Gegenwart von gereinigtem WavL, LPS aus P27459 $\Delta$ wavL und UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc konnte der Einbau von  $^{14}\text{C}$  ins LPS beobachtet werden (Abb. IV.10, Spuren 3 und 8). Ein Vergleich des Laufverhaltens mit den parallel aufgetragenen LPS-Proben in den Spuren 11 bis 13 bestätigte, dass es sich bei den detektierten Banden auf dem Röntgenfilm um die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Markierung des Lipid A/ Kern OS-Komplexes handelte. Durch den Nachweis des LPS über Silberfärbung wurde ferner bestätigt, dass in allen Reaktionen ausreichende Mengen an LPS eingesetzt worden waren. Weder die Zugabe von UDP- $^{14}\text{C}$ -

Glc noch die von UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal anstelle von UDP-( $^{14}\text{C}$ )-GlcNAc hatte einen  $^{14}\text{C}$ -Einbau ins LPS aus P27459 $\Delta$ wavL zur Folge (Abb. IV.10, Spuren 9 und 10). Einbauversuche unter Verwendung von gereinigtem WavL, UDP-( $^{14}\text{C}$ )-GlcNAc und LPS aus dem Wt P27459-S oder der Doppelmutante P27459 $\Delta$ wavLwavA waren ebenfalls erfolglos (Abb. IV.10, Spuren 1 und 6). In den Kontrollansätzen mit UDP-( $^{14}\text{C}$ )-GlcNAc in Kombination mit den gereinigten LPS-Proben oder dem gereinigten Eluat mit WavL konnte keine Aktivität festgestellt werden (Abb. IV.10, Spuren 2, 4, 5 und 7).

### 3.3.2. WavM aus V194

Das Gen *wavM* stellt eine Besonderheit im *wav*-Genclustertyp 3 und 4 von *V. cholerae* dar. In Isolaten der Serogruppe O1 oder O139 ist *wavM* nicht vorhanden. Das 242 AS umfassende Protein WavM (AAL77358) hat ein Molekulargewicht von ca. 28,4 kDa und besitzt einer BLAST-Suche zufolge 34% Identität zu Lex2B (AAM33309.1), einer Glykosyltransferase aus *Haemophilus influenzae* (5). Weiterhin konnten durch Suche nach konservierten Domänen bei NCBI (163) Homologien zur Glykosyltransferase-Familie 25 (Pfam01755), welcher Enzyme der LPS-Biosynthese angehören, festgestellt werden. CAZy ordnete WavM der Glykosyltransferase-Familie 15 zu, deren Enzyme sich durch eine Galaktosyltransferase-Aktivität auszeichnen (59).



**Abbildung IV.11: Zellysate von BL21 mit und ohne exprimiertem WavM mit N-terminalem His-Tag.** Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben.

A) Coomassie gefärbtes PAA-Gel (15%) nach SDS-PAGE.

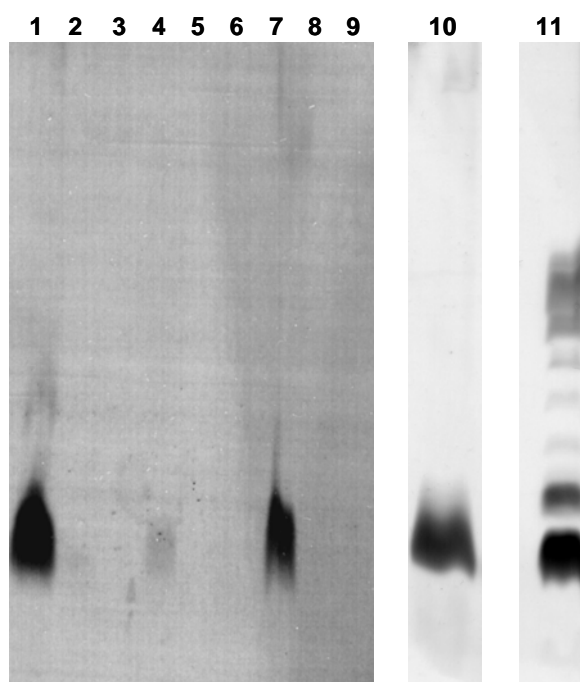
1: Zellysate von BL21 (DE3);

2: Zellysate von BL21 (DE3) pTopowavM mit His-Tag-WavM;

B) Western Blot derselben Proben. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen Anti-His-Antikörpern.

Um die enzymatische Aktivität von WavM zu bestimmen, wurden ähnliche Experimente durchgeführt, welche bereits unter IV 3.3.1. für WavL beschrieben worden sind. Trotz wiederholter Versuche interagiert WavM mit N-terminalem His-Tag jedoch nicht mit den  $\text{Ni}^{2+}$ -Matrix-Säulen und konnte demzufolge über dieses System nicht aufgereinigt werden. Daher wurde für den  $^{14}\text{C}$ -Glykosyltransferase-Assay (siehe III 6.10.) dialysiertes Zellysate von BL21 (DE3) pTopowavM verwendet. Wie in Abbildung IV.11 B gezeigt, konnte die

Expression von WavM mit N-terminalem His-Tag durch Analyse des dialysierten Zelllysats von BL21 (DE3) pTopowavM im Western Blot mit monoklonalen Anti-His-Antikörpern nachgewiesen werden (Spur 2). Wogegen im dialysierten Kontrolllysate von BL21 (DE3) keine Bande detektiert werden konnte (Spur 1), obwohl annähernd gleiche Proteinmengen auf das Gel geladen wurden, was die Coomassie-Färbung eines PAA-Gels der jeweiligen Zelllysate nach SDS-PAGE in Abbildung IV.11 A bestätigte. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach der Methode von Bradford (35) bestimmt und lag in beiden Fällen bei ca. 16 mg/ml.



**Abbildung IV.12: Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Gal ins LPS durch WavM.** Spuren 1 bis 9 zeigen einen entwickelten Röntgenfilm nach Exposition auf dem getrockneten PAA-Gel (16%), auf welchem zuvor die Reaktionsgemische aufgetragen und durch SDS-PAGE aufgetrennt worden sind. Spuren 10 und 11 zeigen das gereinigte LPS, welches in den Reaktionsansatz gegeben wurde, auf demselben PAA-Gel nach SDS-PAGE und Silberfärbung.

- 1: LPS von V194wavM + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) pTopowavM + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 2: LPS von V194wavM + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 3: LPS von V194wavM + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 4: LPS von Wt V194 + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) pTopowavM + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 5: LPS von Wt V194 + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 6: LPS von V194 + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 7: LPS von V194wavM + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) pTopowavM + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Gal;
- 8: LPS von V194wavM + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) pTopowavM + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Glc;
- 9: LPS von V194wavM + dialysiertes Zelllysate von BL21 (DE3) pTopowavM + UDP-( $^{14}\text{C}$ )-GlcNAc;
- 10: LPS von V194wavM;
- 11: LPS von Wt V194;

Für den Glykosyltransferase-Assay (siehe III 6.10.) wurde das dialysierte Zelllysate von BL21 (DE3) pTopowavM mit radioaktiv markierten UDP-( $^{14}\text{C}$ )-Zuckern und gereinigtem LPS aus

V194 bzw. V194*wavM* inkubiert. Um eine Hintergrundaktivität durch die im Lysat vorhandenen Proteine von BL 21 (DE3) auszuschließen, wurden Kontrollansätze mit dialysiertem Zellysate von BL21 (DE3) ohne WavM durchgeführt. Wie in Abbildung IV.12 zu erkennen, konnte in Anwesenheit von WavM ein signifikanter Einbau nur unter Verwendung von UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal (Abb. IV.12, Spuren 1 und 7), nicht aber durch Zugabe von UDP-(<sup>14</sup>C)-GlcNAc oder UDP-(<sup>14</sup>C)-Glc (Abb. IV.12, Spuren 8 und 9), in das LPS von V194*wavM* beobachtet werden. In das LPS von V194 wurden in Anwesenheit von WavM und UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal nur geringe Mengen Galaktose eingebaut (Abb. IV.12, Spur 4). In den Kontrollansätzen mit UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal, gereinigten LPS-Proben und Zellysate aus BL21 (DE3) (Abb. IV.12, Spuren 3 und 6) oder den gereinigten LPS-Proben mit UDP-(<sup>14</sup>C)-Gal (Abb. IV.12, Spuren 2 und 5) wurde kein Einbau festgestellt.

### 3.4. Molekulare und funktionale Analyse der O Antigen-Ligase WaaL

#### 3.4.1. Die Topologie von WaaL

Frühere Untersuchungen unterschiedlicher O Antigen-Ligasen deckten bereits die geringe Homologie zueinander auf Proteinebene durch eine Gegenüberstellung auf (107, 191). Dieses Phänomen trifft auch für WaaL-Sequenzen aus verschiedenen Serogruppen der gleichen Bakterienspezies zu. So sind sich die O Antigen-Ligasen der verschiedenen *wa\**-Genclustertypen von *V. cholerae* nur zu knapp 30% ähnlich. In Abbildung VII.1 (siehe Anhang) sind Proteinsequenzen von verschiedenen O Antigen-Ligasen aus *V. cholerae* und anderen Gram<sup>-</sup> Bakterien einander gegenübergestellt. Über die gesamte Sequenz sind vereinzelt konservierte AS zu finden, aber identische AS können nur für wenige Positionen zugeordnet werden. Diese Motive werden in Kapitel IV 3.4.3. näher charakterisiert. Insgesamt demonstriert die Grafik eindrucksvoll die geringe Ähnlichkeit der O Antigen-Ligasen auf Proteinebene. Dennoch zeichnen sich die O Antigen-Ligasen durch ein gemeinsames charakteristisches Profil im Hydrophobizitätsdiagramm aus (siehe Anhang, Abb. VII.3).

Da bisher noch keine Studie zur Sekundärstruktur dieses Transmembranproteins durchgeführt wurde, war die Aufdeckung der Topologie von WaaL aus P27459 eines der Ziele dieses Teilprojekts. Durch Computerprogramme zur Vorhersage von Transmembrandomänen konnte ein erstes Modell der WaaL-Topologie skizziert werden. Dieses wurde durch eine Transposonmutagenese von WaaL<sup>P27459</sup> mit den Transposons *TnphoA* und *TnlacZ* überprüft (161). Auf diese Weise konnten eine Reihe von WaaL-PhoA bzw. WaaL-LacZ Fusionen generiert werden (siehe III 5.9.). Da PhoA nur im Periplasma aktiv ist, jedoch in dieser Fusion



keine eigene Signalsequenz besitzt, weisen aktive WaaL-PhoA Fusionen auf eine periplasmatische Lage von PhoA hin. Für LacZ hingegen gilt genau das Gegenteil, da es nur im Cytoplasma aktiv ist.

**Tabelle IV.3: Aktivitäten von *waaL::TnphoA* (Nummer 1–22) im Phosphatase- und *waaL::TnlacZ* (Nummer 23–28) im  $\beta$ -Galaktosidase-Test.** Als Stelle der Transposoninsertion ist die letzte AS von WaaL<sup>P27459</sup> vor dem Transposon angegeben.

Nummer	Stelle der <i>TnphoA</i> Insertion	alkalische Phosphatase Aktivität ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{l}$ )	Nummer	Stelle der <i>TnlacZ</i> Insertion	$\beta$ -Galaktosidase Aktivität ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{l}$ )
1	L_30_phoA	1222,04 $\pm$ 134,59	23	G_22_lacZ	20729,90 $\pm$ 2436,75
2	L_33_phoA	1161,12 $\pm$ 191,98	24	G_118_lacZ	1800,88 $\pm$ 326,83
3	Y_34_phoA	1702,69 $\pm$ 333,01	25	V_173_lacZ	1350,19 $\pm$ 471,66
4	S_36_phoA	591,26 $\pm$ 106,80	26	L_213_lacZ	2389,16 $\pm$ 1444,93
5	N_45_phoA	1129,43 $\pm$ 260,49	27	V_214_lacZ	2156,96 $\pm$ 310,07
6	T_56_phoA	564,29 $\pm$ 136,25	28	T_354_lacZ	3375,17 $\pm$ 300,17
7	S_58_phoA	161,12 $\pm$ 85,23		CC118	13,97 $\pm$ 3,29
8	D_79_phoA	28,07 $\pm$ 7,35			
9	A_84_phoA	73,93 $\pm$ 20,14			
10	M_132_phoA	210,97 $\pm$ 41,83			
11	N_143_phoA	85,60 $\pm$ 7,23			
12	V_179_phoA	299,86 $\pm$ 62,05			
13	Q_228_phoA	273,27 $\pm$ 50,79			
14	E_235_phoA	491,11 $\pm$ 132,20			
15	S_246_phoA	510,97 $\pm$ 91,55			
16	G_279_phoA	492,44 $\pm$ 72,54			
17	L_264_phoA	1224,83 $\pm$ 309,96			
18	A_268_phoA	257,16 $\pm$ 27,97			
19	A_310_phoA	434,22 $\pm$ 96,18			
20	E_369_phoA	327,06 $\pm$ 79,97			
21	L_372_phoA	348,54 $\pm$ 44,97			
22	M_384_phoA	273,84 $\pm$ 39,33			
	CC118	0,18 $\pm$ 0,13			

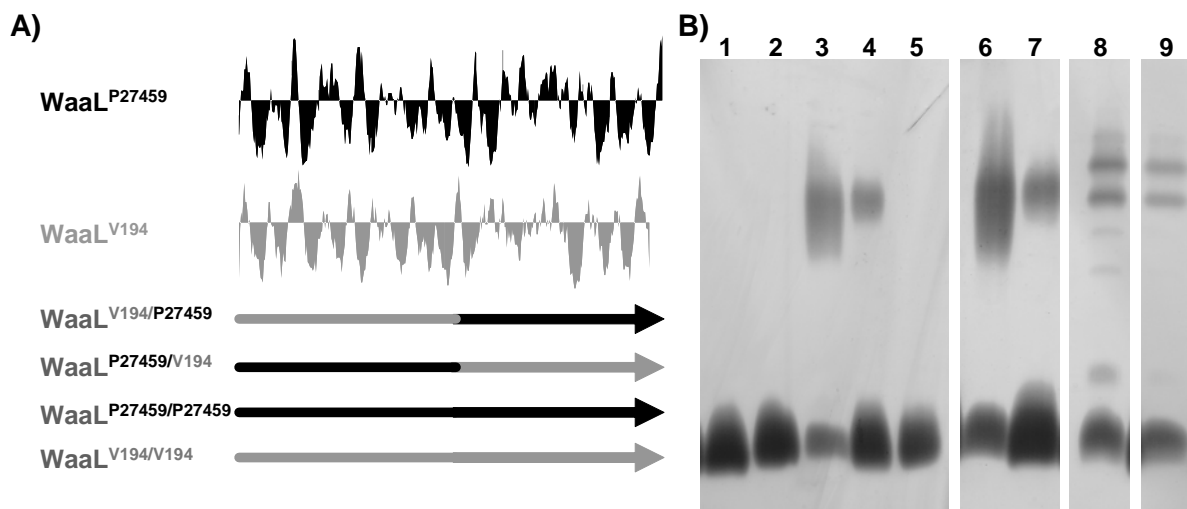
Die Aktivitäten wurden für jede Insertion von *TnphoA* oder *TnlacZ* durch einen Phosphatase- bzw.  $\beta$ -Galaktosidase-Test quantifiziert (siehe III 6.7. und III 6.8.) und sind in Tabelle IV.3 aufgelistet. Dabei wiesen die WaaL-PhoA Fusionen eine 150 bis 6700 fach höhere Aktivität gegenüber der Negativkontrolle CC118 auf. Die Aktivitätswerte der WaaL-LacZ Fusionen lagen 150 bis 1500 fach über der Kontrolle. Grundsätzlich war zu beobachten, dass die Aktivität mit der Entfernung der Fusionstelle vom N-terminalen Ende von WaaL abnimmt.



Als Ergebnis der durch bioinformatische Analysen vorhergesagten Transmembrandomänen und der durchgeführten Experimente zeigt die Abbildung IV.14 die Topologie von WaaL. Nach diesem Modell besitzt WaaL 10 Transmembrandomänen mit 5 periplasmatischen (PI-V) und 4 cytoplasmatischen (C1-4) Schleifen. Dabei fallen besonders die großen periplasmatischen Schleifen PI (von AS 31 bis 86) und PIV (von AS 224 bis 327) auf. Die N- und C-terminalen Enden sind im Cytoplasma lokalisiert.

### 3.4.2. Komplementationsversuche mit Hybriden aus WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup>

Durch die in Kapitel IV 3.2. beschriebenen Experimente war bekannt, dass eine Komplementation von *waaL*-Mutanten in P27459-S und V194 nur durch Expression der eigenen O Antigen-Ligase in trans möglich war. Dieses Ergebnis wurde nun verwendet, um die funktionellen Bereiche von WaaL näher zu bestimmen. Dazu wurden Hybridfusionen der beiden O Antigen-Ligasen WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup> konstruiert, wobei die Fusionsstelle laut Topologiemodell von WaaL<sup>P27459</sup> in der cytoplasmatischen Schleife C3 lag.



**Abbildung IV.15: Analyse der Hybride von WaaL aus V194 und P27459.** A) Gezeigt ist das Hydrophobizitätsdiagramm von WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup>. Darunter sind die Hybridkonstruktionen schematisch dargestellt. Anteile von V194 sind grau, Anteile von P27459 schwarz markiert. B) LPS nach SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung. 1: P27459*waaL* pBAD-Kan*waaL*\_hybridV194/P27459*wavM*; 2: P27459*waaL*; 3: Wt P27459-S; 4: P27459*waaL* pBAD-Kan*waaL*\_hybridV194/P27459; 5: P27459*waaL* pBAD-Kan*waaL*\_hybridP27459/V194; 6: Wt P27459-S; 7: P27459*waaL* pBAD-Kan*waaL*\_hybridP27459/P27459; 8: Wt V194; 9: V194*waaL* pBAD-Kan*waaL*\_hybridV194/V194;

Die Methode zur Erzeugung dieser Hybridfusionen ist ausführlich in Kapitel III 5.8.4. beschrieben. In Abbildung IV.15 A sind die Hybride grafisch dargestellt. Das erste Hybrid WaaL<sup>P27459/V194</sup>, kodiert auf pBAD18-Kan*waaL*\_hybridP27459/V194, bestand aus den 212 N-terminalen AS von WaaL<sup>P27459</sup>, welche an die 180 C-terminalen AS von WaaL<sup>V194</sup> fusioniert

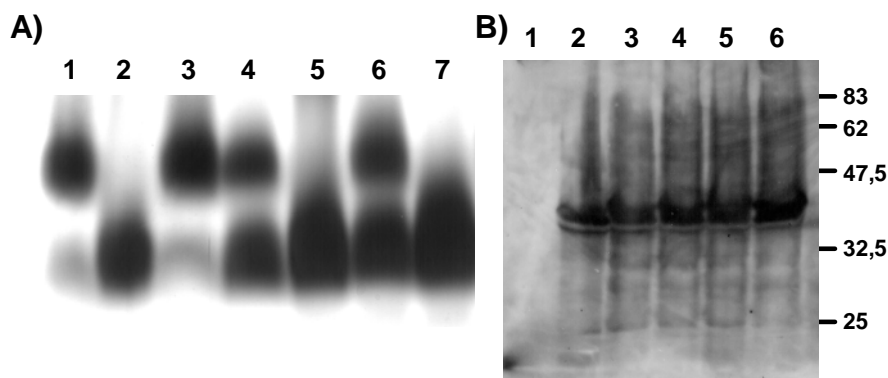
worden waren. Der Anteil von WaaL<sup>V194</sup> begann daher mit dem Threonin an der ursprünglichen Position 224. Weiterhin wurden durch den Konstruktionsmechanismus zwischen die Anteile von WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup> ein Methionin und ein Valin eingefügt. Das zweite Hybrid WaaL<sup>V194/P27459</sup>, kodiert auf pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/P27459, bestand aus den 220 N-terminalen AS von WaaL<sup>V194</sup>, welche an die 186 C-terminalen AS von WaaL<sup>P27459</sup> fusioniert worden waren. Der Anteil von WaaL<sup>P27459</sup> begann daher mit dem Valin an dessen ursprünglicher Position 214. Hier wurden zwischen die Anteile von WaaL<sup>V194</sup> und WaaL<sup>P27459</sup> ein Alanin und ein Methionin eingefügt. Da die parallel angefertigten Hybride WaaL<sup>P27459/P27459</sup> und WaaL<sup>V194/V194</sup>, kodiert auf pBAD18-KanwaaL\_hybridP27459/P27459 und pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/V194, welche aus den entsprechenden N- und C-terminalen Anteilen hergestellt worden waren, noch in der Lage waren, in der jeweiligen *waaL*-Mutante zu komplementieren (Abb. IV.15 B, Spuren 7 und 9), kann ein Funktionsverlust durch Insertion von zusätzlichen AS ausgeschlossen werden. Um die Hybride WaaL<sup>V194/P27459</sup> und WaaL<sup>P27459/V194</sup> auf ihre Fähigkeit zur Komplementation einer *waaL*-Mutante in P27459 zu testen, wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in die Mutante P27459*waaL* transformiert und nach Induktion das LPS präpariert und analysiert. Wie in Abb. IV.15 B Spur 4 zu sehen, war nur das Hybrid WaaL<sup>V194/P27459</sup>, kodiert auf pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/P27459, in der Lage, das O Antigen an den Lipid A/ Kern OS-Komplex anzuheften. Durch eine gleichzeitige Expression des Hybrids WaaL<sup>V194/P27459</sup> und WavM durch pBAD18-KanwaaL\_hybridV194/P27459wavM in P27459*waaL* konnte wiederum keine O Antigen-Anheftung bewirkt werden (Abb. IV.15 B, Spur 1). Das Hybrid WaaL<sup>P27459/V194</sup>, kodiert auf pBAD18-KanwaaL\_hybridP27459/V194, hatte dagegen keinen Einfluss auf das LPS von P27459*waaL* (Abb. IV.15 B, Spur 5). Eine Komplementation in V194*waaL* konnte mit keinem der beiden Hybriden festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.3. Punktmutanten in WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>SARC6</sup>

Die Gegenüberstellung verschiedener O Antigen-Ligasen diverser Gram<sup>-</sup> Bakterien mit einer Identität von unter 30% führte zur Entdeckung von zwei konservierten Motiven (siehe Anhang, Abb. VII.1). Dabei liegt das erste Motiv R(X<sub>3</sub>)L in Bezug auf die Topologie von WaaL<sup>P27459</sup> in der periplasmatischen Schleife PIII und das zweite Motiv H(X<sub>10</sub>)G in der großen periplasmatischen Schleife PIV. Weiterhin wurde durch die Suche nach konservierten Domänen (163) in diesen O Antigen-Ligasen festgestellt, dass alle einen homologen Bereich zu einer Wzy-Konsensus-Sequenz (Pfam04932) besitzen, welcher unter Berücksichtigung der Topologie von WaaL<sup>P27459</sup> in der großen periplasmatischen Schleife PIV liegt. Die

Gegenüberstellung der Wzy-Konsensus-Sequenz zu den entsprechenden Bereichen der ausgewählten O Antigen-Ligasen ist in Abbildung VII.2 im Anhang gezeigt. In dieser Wzy-Konsensus-Sequenz ist auch das H(X<sub>10</sub>)G Motiv zu finden.

Die Funktion dieser hochkonservierten AS wurde durch Etablierung von Punktmutanten (siehe III 5.10.) in WaaL<sup>P27459</sup>, kodiert auf pQE30waaL, untersucht. Dabei wurden R<sup>186</sup> zu M und H<sup>311</sup> zu A ausgetauscht, wodurch die basische Eigenschaft der AS ohne massive strukturelle Änderungen entfernt wurde. Die Fähigkeit, eine chromosomale *waaL*-Deletion zu ersetzen, wurde in MO10Δ*waaL* getestet, da trotz wiederholter Versuche eine Deletion von *waaL* in P27459 nicht etabliert werden konnte. Um eine Wechselwirkung der exprimierten O Antigen-Ligasen mit Punktmutationen und den möglicherweise noch gebildeten WaaL-Fragmenten in der Insertionsmutante P27459*waaL* auszuschließen, wurde die Studie in der Deletionsmutante MO10Δ*waaL* durchgeführt. Da beide, P27459 und MO10, den *wa*\*-Genclustertyp 1 besitzen, daher die WaaL-Sequenz identisch ist und bereits früher eine O Antigen-Anheftung in MO10Δ*waaL* durch Expression von WaaL<sup>P27459</sup> gezeigt werden konnte (194), ist diese Kombination zulässig.

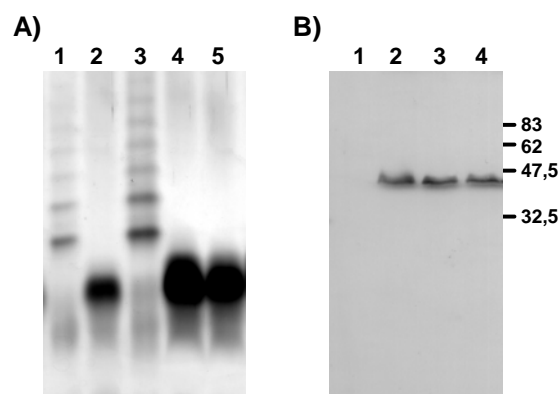


**Abbildung IV.16: Punktmutationen in WaaL<sup>P27459</sup> und deren Effekt auf die O Antigen-Anheftung.** A) LPS nach SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung. 1: Wt MO10; 2: MO10Δ*waaL*; 3: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>; 4: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H311A; 5: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-R186M; 6: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H309A; 7: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H311/309A; B) Western Blot von Gesamtzellextrakten. Nachweis erfolgte mit monoklonalen Anti-Penta-His-Antikörpern. Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben. 1: Wt MO10; 2: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>; 3: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H311A; 4: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-R186M; 6: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H309A; 6: MO10Δ*waaL* pQE30waaL<sup>P27459</sup>-H311/309A;

Die Aktivität der O Antigen-Ligasen mit Punktmutation bezüglich der Anheftung des O Antigens in MO10Δ*waaL* wurde durch eine Analyse des LPS aus den jeweiligen Stämmen bestimmt. Das LPS ist in Abbildung IV.16 A nach SDS-PAGE und Silberfärbung dargestellt. Deutlich ist die Anheftung des O Antigens in MO10Δ*waaL* durch WaaL<sup>P27459</sup>, kodiert auf pQE30waaL<sup>P27459</sup>, im Vergleich zu Wt und Mutante zu erkennen (Abb. IV.16, Spuren 1 bis

3). Der Austausch von R<sup>186</sup> zu M führte zum Verlust der O Antigen-Ligase Aktivität (Abb. IV.16, Spur 5), wogegen der Austausch von H<sup>311</sup> zu A nur eine Reduktion dieser bewirkte (Abb. IV.16, Spur 4). Da mit H<sup>309</sup> in WaaL<sup>P27459</sup> zwei Positionen neben H<sup>311</sup> ein weiteres Histidin zu finden ist, wurde auch diese AS zu A ausgetauscht. Weiterhin wurde ein Austausch beider AS H<sup>309</sup> und H<sup>311</sup> zu jeweils einem A vorgenommen. Dabei konnte für den Austausch von H<sup>309</sup> zu A, wie bereits bei der Mutation von H<sup>311</sup> zu A festgestellt, eine Verminderung der O Antigen-Anheftung beobachtet werden. Dagegen führte der Austausch beider Histidine zu einem vollständigen Verlust des O Antigen-Transfers. Aufgrund der N-terminalen His-Tag-Fusion von WaaL<sup>P27459</sup> konnte im Western Blot unter Verwendung von monoklonalen Anti-Penta-His-Antikörper (Abbildung IV.16 B) die Expression des wildtypischen WaaL-Proteins und die der mutierten Formen demonstriert werden. Da diese in allen Fällen etwa gleich stark war, konnte ausgeschlossen werden, dass die Effekte bei der O Antigen-Anheftung durch unterschiedliche Mengen der O Antigen-Ligase hervorgerufen wurden.

Um zu überprüfen, ob diese AS auch bei anderen O Antigen-Ligasen entscheidend zur Funktion von WaaL beitragen, wurden die äquivalenten AS in WaaL<sup>SARC6</sup> unter Verwendung der gleichen Strategie (siehe III 5.10.) ausgetauscht. Bei WaaL<sup>SARC6</sup> handelt es sich um die O Antigen-Ligase aus *Salmonella enterica* sv. Arizonae IIIA. Wie in der Gegenüberstellung in Abbildung VII.1 abzulesen, entspricht H<sup>311</sup> von WaaL<sup>P27459</sup> dem H<sup>321</sup> von WaaL<sup>SARC6</sup> und R<sup>186</sup> von WaaL<sup>P27459</sup> dem R<sup>208</sup> von WaaL<sup>SARC6</sup>. Die Fähigkeit eine chromosomale *waaL*-Deletion zu ersetzen, wurde im Stamm SL3749 getestet. Dies ist zwar ein SARC1 Isolat, aber die O Antigen-Ligasen aus beiden Stämmen sind zu 92% identisch und eine Komplementation von WaaL<sup>SARC6</sup> in SL3749 konnte bereits gezeigt werden (124).



**Abbildung IV.17: Punktmutationen in WaaL<sup>SARC6</sup> und deren Effekt auf die O Antigen-Anheftung.** A) LPS nach SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung. 1: Wt SARC1; 2: SL3749; 3: SL3749 pWQ322; 4: SL3749 pWQ322-H321A; 5: SL3749 pWQ322-R186M; B) Western Blot von Gesamtzellextrakten. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen Anti-Penta-His-Antikörpern. Der Größtstandard (in kDa) ist seitlich angegeben. 1: Wt SARC1; 2: SL3749 pWQ322; 3: SL3749 pWQ322-H321A; 4: SL3749 pWQ322-R208M;

Auch in diesem Fall wurde die Aktivität der punktmutierten O Antigen-Ligasen bezüglich der Anheftung des O Antigens in SL3749 durch Analyse des LPS aus den jeweiligen Stämmen bestimmt. Das LPS ist in Abbildung IV.17 A nach SDS-PAGE und Silberfärbung dargestellt. WaaL<sup>SARC6</sup>, kodiert auf pQE30waaLSARC6, konnte in der Mutante SL3749 die Anheftung des O Antigens auf das Niveau des Wt bewirken (Abb. IV.17 A, Spuren 1 bis 3). Sowohl der Austausch von H<sup>321</sup> zu A, als auch der von R<sup>208</sup> zu M führte zum Verlust der O Antigen-Ligase Aktivität (Abb. IV.16, Spuren 4 und 5). Die Expression von WaaL<sup>SARC6</sup> mit N-terminaler His-Tag-Fusion erlaubte die Detektion des wildtypischen WaaL-Proteins und der mutierten Formen im Western Blot (Abbildung IV.17 B). Da hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression nachgewiesen wurden, konnten die Effekte bei der O Antigen-Anheftung erneut nicht durch unterschiedliche Mengen der O Antigen-Ligase erklärt werden.

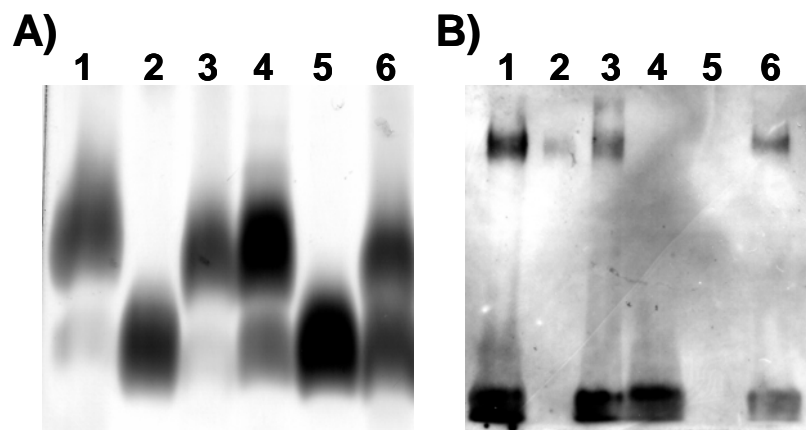
#### 4. Charakterisierung von putativen O Antigen-Transportern bei O1 und O139

Bisher sind drei unterschiedliche O Antigen-Transportsysteme bekannt, welche in der Einleitung kurz dargestellt sind (siehe Kapitel II 4.1.). Einige Bakterien, z. B. *E. coli* kodiert alle drei Transportsysteme. Daher können hier problemlos fremde O Antigene durch Einbringen und Expression des entsprechenden O Antigen-Biosynthesegenclusters gebildet, in den periplasmatischen Raum transportiert und auf den Lipid A/ Kern OS-Komplex umgehängt werden. Einige der fehlgeschlagenen Versuche O Antigene aus anderen Bakterien in *V. cholerae* zu exprimieren (siehe Kapitel IV 1.) könnten unter Umständen auf den ausbleibenden Transport des fremden O Antigens in *V. cholerae* zurückzuführen sein. Daher bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Aufdeckung und Charakterisierung der O Antigen-Transporter von *V. cholerae* O1 und O139. Für beide Serogruppen waren den *wb*\*-Genen bereits durch frühere Computeranalysen putative Funktionen zugeordnet worden (106, 247, 281). Dabei wurden für O1 die Genprodukte Wzm (VC0246) und Wzt (VC0247) als putatives O Antigen-Transportsystem beschrieben, wobei Wzm den Kanal in der CM und Wzt die Energiequelle in Form einer cytoplasmatischen ATPase darstellen sollte. Für O139 wurden bisher nur WbfF und Wzz (früher OtnA und OtnB/ BAA33592 und BAA33593) charakterisiert, welche das Kapsel-Exportsystem an der AM bilden (28). Eine Funktion bei dem O Antigen-Transport über die CM konnte bisher keinem Genprodukt zugeteilt werden.

#### 4.2. WbfK von O139

Mittels diverser bioinformatischer Analysen wurden sämtliche Genprodukte des O Antigen-Biosynthesegenclusters von O139 nochmals auf eine Beteiligung an dem Transport des O Antigens über die CM überprüft. Dabei fielen insbesondere die Proteine WbfK (BAA33599) und WbfQ (BAA33605) durch ihre putativen Transmembrandomänen auf (Daten nicht gezeigt). Da WbfQ eine Funktion als putative O Antigen-Polymerase zugesprochen wurde (247), ist das Protein möglicherweise in die Aufeinanderreihung der O Antigen-Untereinheiten bei der Kapselsynthese von O139 involviert. Eine Insertion von pGP704 in *wbfQ* konnte trotz mehrerer Versuche nicht etabliert werden. Vielleicht führt die Zerstörung von WbfQ bei gleichzeitig fortlaufender O Antigen-Synthese in O139 zu lethalen Bedingungen.

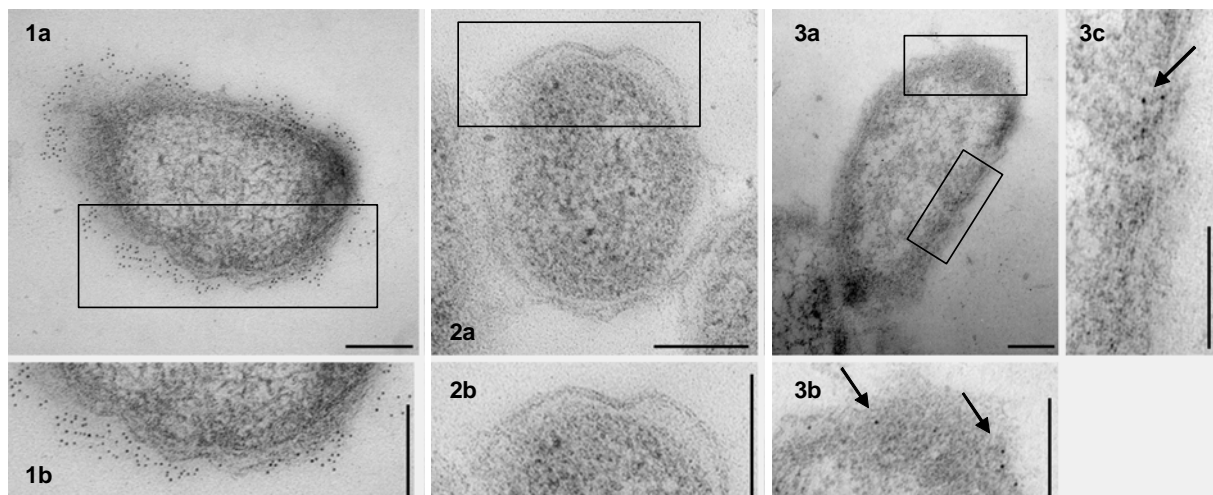
Das 479 AS lange Protein WbfK zeichnet sich durch ein errechnetes Molekulargewicht von 54,6 kDa und einen theoretischen pI von 9,46 aus. WbfK besaß Ähnlichkeiten zu einigen Permeasen und Transportern, darunter auch mit 29% Identität die O Antigen-Flippase von *E. coli* (AAO37697) (5). Das Hydrophobizitätsdiagramm deutete mehrere Transmembrandurchgänge an (Abb. VII.3). Weiterhin konnte WbfK von O139 über nahezu die gesamte Proteinsequenz der RfbX-Familie (COG2244), welche als Membranproteine in den Export von O Antigenen und Teichonsäuren involviert sind, zugeordnet werden (163). Die Beteiligung und Funktion von WbfK an der LPS-Biosynthese wurde durch Erzeugung einer *wbfK*-Mutante in MO10 durch Insertion von pGP704 und anschließender Charakterisierung des LPS untersucht.



**Abbildung IV.18: LPS der *wbfK*-Mutante von MO10 im Vergleich zu anderen Mutanten.** A) Analyse des LPS durch SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung. 1: Wt MO10; 2: MO10 $\Delta$ *waaL*; 3: MO10 $\Delta$ *waaL* pBAD18-KanwaaL; 4: MO10 $\Delta$ *wbfF*; 5: MO10 $\Delta$ *wbfK*; 6: MO10 $\Delta$ *wbfK* pBAD18-KanwbfK; B) Analyse des LPS durch Western Blot. Nachweis mit O139-Antiserum. Beladung siehe A);



Das LPS von MO10*wbfK* ist in Abbildung IV.18 im Vergleich zum Wt MO10, sowie einer *waaL*- und *wbfF*-Mutante dargestellt. Abbildung IV.18 A zeigt das LPS nach SDS-PAGE und Silberfärbung, Abbildung IV.18 B einen Western Blot derselben LPS-Proben. Durch ein O139-Antiserum konnten im Western Blot das O Antigen und die aus dem gleichen Material aufgebaute Kapsel detektiert werden. Wie bereits früher demonstriert wurde (194), führte eine Mutation in dem Gen *wbfF*, welches für eine Komponente des Kapseltransporters kodiert, zu einem Verlust der Kapsel, hatte aber keinen Einfluss auf das O Antigen (Abb. IV.18, Spur 4). Im Gegenteil dazu konnte die O Antigen-Ligase Mutante MO10*waaL* zwar noch die Kapsel bilden, aber keine O Antigen-Anheftung mehr vollziehen (Abb. IV.18, Spur 3). Eine Mutation in *wbfK* führte nicht nur zum Verlust des O Antigens, sondern auch zum Verlust der Kapsel (Abb. IV.18, Spur 5). Durch Expression von WbfK auf pBAD18-Kan*wbfK* konnten beide Effekte aufgehoben werden (Abb. IV.18, Spur 6). Um einen Defekt in der Biosynthese des O Antigens bei MO10*wbfK* auszuschließen, wurden Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt und das O Antigen und die Kapsel durch Immunlokalisation mit O139-Antiserum und Sekundärantikörper, welche mit Gold markiert waren, detektiert.



**Abbildung IV.19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen am TEM.** 1a: Wt MO10; 2a: MO10 $\Delta$ *galEK*; 3a: MO10*wbfK*; b und c zeigen eine Vergrößerung der in a durch Rechtecke markierten Ausschnitte; Pfeile weisen auf Goldpartikel bei MO10*wbfK* hin; Eichstrich entspricht 100 nm;

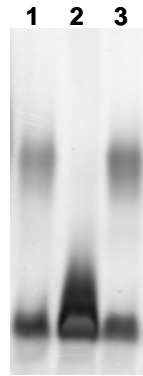
In Abbildung IV.19 sind Aufnahmen der Immunlokalisation von O139-Antigen am TEM gezeigt. Deutlich konnte im Wt MO10 die O139 Antigen-Einheiten detektiert werden (Abb. IV.19, 1a und b). Die Lage der Goldpartikel außerhalb der AM deutet wahrscheinlich die massive Kapselproduktion im Wt an. Eine genaue Auflösung des Periplasmas war jedoch nicht möglich, daher erscheint es sehr schwer zwischen detektiertem Kapselmaterial und

O139 Antigen im LPS zu unterscheiden. Als Negativkontrolle diente MO10 $\Delta galEK$ . Diese Mutante ist aufgrund eines Defekts im Gal-Stoffwechsel nicht in der Lage Galaktose-1-Phosphat zu synthetisieren (194). Da Gal ein wichtiger Bestandteil des O139 Antigens und somit auch der Kapsel ist (62, 63, 137, 139), kann MO10 $\Delta galEK$  keine O139 Antigen-Untereinheiten synthetisieren. Sie wurde bereits durch frühere Studien als Kapsel<sup>-</sup> und O Antigen<sup>-</sup> charakterisiert (194). Die Immunlokalisation bestätigte dies, da weder an der Membran noch im Cytoplasma Goldpartikel nachgewiesen werden konnten (Abb. IV.19, 2a und b). Bei der *wbfK*-Mutante hingegen konnten vereinzelt Goldpartikel an oder nahe der Membran detektiert werden (Abb. IV.19, 3a, b und c). Weit extrazellulär liegende Goldpartikel, wie für den Wt charakteristisch, konnten nicht beobachtet werden.

#### 4.1. Wzm von O1

Wzm (früher RfbH, VC0246) ist 264 AS lang, besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 30,8 kDa und einen theoretischen pI von 9,49. Durch vergleichende Analysen auf Proteinebene (5) konnten Homologien zu diversen ABC-Transportern/Permeasen aufgedeckt werden. Darunter befanden sich u. a. mit 34% Identität die putative ATP-Transporter Permease von *Azospirillum brasilense* (AAS83021), mit 31% Identität die Permease des ABC-Polysaccharid/ Polyolphosphat Exportsystems von *Xylella fastidiosa* Ann-1 (ZP\_00341333) und mit 25% Identität die Permease des O Antigen Exportsystems von *Gluconobacter oxydans* 621H (YP\_191829). Weiterhin konnte Wzm von O1 über nahezu die gesamte Proteinsequenz den Typ2 ABC-Transportern (Pfam01061) und den ABC-Transportern TagG des Polysaccharid/ Polyolphosphat Exportsystems (COG1682) zugeordnet werden (163). Das Hydrophobizitätsdiagramm von Wzm deutete auf mehrere Transmembrandomänen hin (Abb. VII.3).

Da das putative O Antigen-Transportsystem von O1, Wzm und Wzt, bisher nicht genetisch untersucht worden war, wurde ein *wzm*-Mutante in P27459-S durch Insertion von pGP704 generiert und phänotypisch charakterisiert.



**Abbildung IV.20: Analyse des LPS der *wzm*-Mutante von P27459-S durch SDS-PAGE (16%) und Silberfärbung.**

1: Wt P27459-S;  
2: P27459*wzm*;  
3: P27459*wzm* pBAD18-Kan*wzm*;

Wie in Abbildung IV.20 zu erkennen, konnte im LPS von P27459*wzm* keine O Antigen-Anheftung an den Lipid A/ Kern OS-Komplex beobachtet werden. Eine Expression von Wzm über pBAD18-Kan*wzm* in trans konnte den O Antigen-Verlust beheben.

Um einen Defekt in der Biosynthese des O1 Antigens bei P27459*wzm* auszuschließen, soll noch eine Immunlokalisierung O Antigens mit einem O1-Antiserum, ähnlich wie für O139 gezeigt, durchgeführt werden.

## 5. Transposonmutagenese mit pStSchcatpirkan

Während dieser Arbeit wurde das Transposonplasmid pStSchcatpirkan unter Verwendung des Tn10 von pZT344 und des temperatursensitiven Replikationssystems von pKD46 konstruiert (siehe Kapitel III 5.8.6.). Dieses Transposonplasmid enthielt zwischen den beiden IS-Elementen des Mini-Tn10 von 5` nach 3` ein promotorloses *cat* und *pir*, sowie *kanR* mit Promotor. Die Transposition in das Chromosom des Rezipienten (hier P27459-S) wurde enzymatisch von der Transposase katalysiert, welche außerhalb der IS-Elemente auf dem Plasmid kodierte und deren Expression von einem IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor kontrolliert wurde.

Für die Transposonmutagenese wurde das Transposonplasmid pStSchcatpirkan in P27459-S durch Elektroporation transformiert. Die Bakterien wurden danach in 30°C warmes LB-Medium überführt und zunächst für 90 min bei 30°C in einen Schüttelinkubator gegeben. Die Inkubation bei der permissiven Temperatur erlaubte zunächst die Replikation von pStSchcatpirkan. Eine Zugabe 1 mM IPTG nach 30 min induzierte die Transposase, wodurch die Transposition von TncatpirkanR stattfinden konnte. Nach 90 min wurde die Temperatur auf 37°C erhöht (restriktive Temperatur für die Replikation von pStSchcatpirkan) und die Transformanten für weitere 60 min inkubiert, bevor sie auf LB/Km-Agarplatten in geeigneten Verdünnungen ausplattiert wurden. Nach Inkubation bei 37°C ÜN wurden alle Km<sup>r</sup> Kolonien parallel auf eine LB/Km-, eine LB/Cm- und eine LB/Ap-Agarplatte ausgestrichen und ÜN bei

37°C inkubiert. Km<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup> und Ap<sup>s</sup> Kolonien hatten das Transposon in Chromosom aufgenommen, waren jedoch frei von pStSchcatpirkan, wodurch die Insertion des Transposons stabil war. Gleichzeitig musste *cat* von *TncatpirkanR* unter die Kontrolle eines aktiven Promotors gelangt sein, wodurch diese Transposonmutanten nun Cm<sup>r</sup> waren. Auf diese Weise konnten insgesamt 3600 Transposonmutanten isoliert werden. Anhand einer Southern Blot-Analyse der chromosomalen DNA von 72 willkürlich ausgewählten Transposonmutanten unter Verwendung von *TncatpirkanR* als Sonde konnte gezeigt werden, dass ca. 85% nur eine Kopie des Transposons auf dem Chromosom trugen, wobei die Detektion unterschiedlich großer Banden in den verschiedenen Isolaten eine weitgehend zufällige Verteilung der Insertionen andeutete (Daten nicht gezeigt).

### **5.1. Identifizierung der osmosensitiven Mutante P27459*osmR::TncatpirkanR***

Alle 3600 Transposonmutanten wurden hinsichtlich ihres Wachstums auf unterschiedlichen Agarplatten analysiert. Dazu zählten Agarplatten auf der Basis von TCBS, M9 und LB mit 900 mM NaCl. Da Wachstumsdefekte besonders gut auf den LB-Agarplatten mit 900 mM NaCl detektiert werden konnten und hyperosmotische Stressantworten bei *V. cholerae* kaum untersucht sind, wurden zunächst die Transposonmutanten mit Wachstumsproblemen unter hoher Osmolarität im Detail untersucht. Durch eine wie unter IV 5. beschriebene Southern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten nur eine Insertion von *TncatpirkanR* besaßen. Durch eine Sequenzierung der subklonierten Teilbereiche von *TncatpirkanR* mit benachbarter chromosomaler DNA aus diesen Mutanten in pBR322 konnte die jeweilige Insertionsstelle des Transposons ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII.1 im Anhang aufgelistet. Da die Mutante Osm6 einen besonders starken Wachstumsdefekt unter hypertonen Bedingungen zeigte, wurde sie im Folgenden näher charakterisiert. Der Insertionsort des Transposons bei Osm6 ist als putative Sensor-Histidinkinase annotiert und bildet mit putativen Regulator, kodiert durch VCA0566, ein Zwei-Komponentensystem. Aufgrund des Phänotyps wurde der ORF VCA0565 fortan als *osmK*, der ORF VCA0566 als *osmR* bezeichnet.

### **5.2. Charakterisierung des Zwei-Komponentensystems OsmRK**

Das 56,5 kDa große Protein OsmK, kodiert im Locus VCA0565 auf dem zweiten Chromosom von *V. cholerae*, umfasst 499 AS und hat einen pI von 6,6. Der C-terminale Bereich von OsmK konnte anhand einer konservierten Domänensuche (163) mehreren Domänen zugeordnet werden, darunter u. a. von AS 400 bis 491 den konservierten Domänen der

Histidinkinase-ähnlichen ATPasen HATPase\_c (cd00075, smart00387 und pfam02518) und von AS 291 bis 357 der Dimerisierungsdomänen HisKA (smart00388 und cd00082). Eine BLAST-Suche (5) stellte eine hohe Ähnlichkeit von 71% Identität des OsmK aus *V. cholerae* zu den Sensor-Histidinkinasen der nah verwandten Bakterien *V. parahaemolyticus* (BAC62263) und *Vibrio vulnificus* CMCP6 (AAO07274) fest. Daneben zeigte OsmK auf Proteinebene Homologien zu einer Reihe weiterer Sensor-Histidinkinasen anderer Bakterien auf, darunter u. a. mit 26% Identität EnvZ von *S. enterica* sv. Paratyphi ATCC 9150 (AAV79179) und sv. Thyphimurium LT2 (NP\_462404). Interessant war, dass OsmK mit 32% Identität zu dem Genprodukt des ORFs VCA0257, einer anderen putativen Sensor-Histidinkinasen von *V. cholerae*, und mit immerhin 26% Identität zu EnvZ (VC2713) von *V. cholerae* ähnlich war.

Der auf Locus VCA0565 kodierte putative Regulator OsmR umfasst 245 AS, hat ein errechnetes Molekulargewicht von 28,1 kDa und einen theoretischen pI von 5,86. Auch hier konnte die hohe Ähnlichkeit mit 91 bzw. 84% Identität zu den entsprechenden Regulatoren der Zwei-Komponentensysteme in den verwandten Bakterien *V. parahaemolyticus* (BAC62262) und *V. vulnificus* CMCP6 (AAO07273) ermittelt werden (5). Die hohe Identität von OsmR zu Genprodukten aus anderen *Vibrio* Spezies deutet an, dass es sich um ein in der Familie der *Vibrionaceae* verbreitetes Zwei-Komponentensystem handelt. Wiederum war eine Homologie zu vielen anderen Response-Regulatoren diverser Zwei-Komponentensysteme in anderen Bakterien zu beobachten. Weiterhin konnten in OsmR aufgrund einer konservierten Domänensuche (163) Ähnlichkeiten zu der Signal-Empfängerdomäne REC (cd00156) von AS 33 bis 142, zu der Effektordomäne von Regulatoren Trans\_reg\_C (cd00383) von AS 158 bis 243 und von AS 172 bis 243 zu der Domäne Trans\_reg\_C von Transkriptionsregulatoren (pfam00486) gefunden werden. Hervorzuheben ist die Homologie über beinahe die gesamte Proteinelänge zu der Regulatorgruppe OmpR (COG0745).

Um eine erste Übersicht der von OsmR kontrollierten Regulons zu erhalten, begann A. Halscheidt vergleichende Mikroarray-Analysen zwischen dem Transkriptom von Kulturen des Wt P27459-S und P27459osmK::TncatpirkanR, welche zunächst in M9-Medium angezogen und anschließend durch Inkubation für 90 min in M9-Medium mit 800 mM NaCl osmotisch geschockt wurden, durchzuführen. Gleichzeitig wurde auch das Transkriptom von Wt P27459-S bzw. P27459osmK::TncatpirkanR, kultiviert in M9-Medium, mit dem Transkriptom von Wt P27459-S bzw. P27459osmK::TncatpirkanR, hypertonisch geschockt in M9-Medium mit 800 mM NaCl, verglichen. Dabei konnte die typische Antwort auf

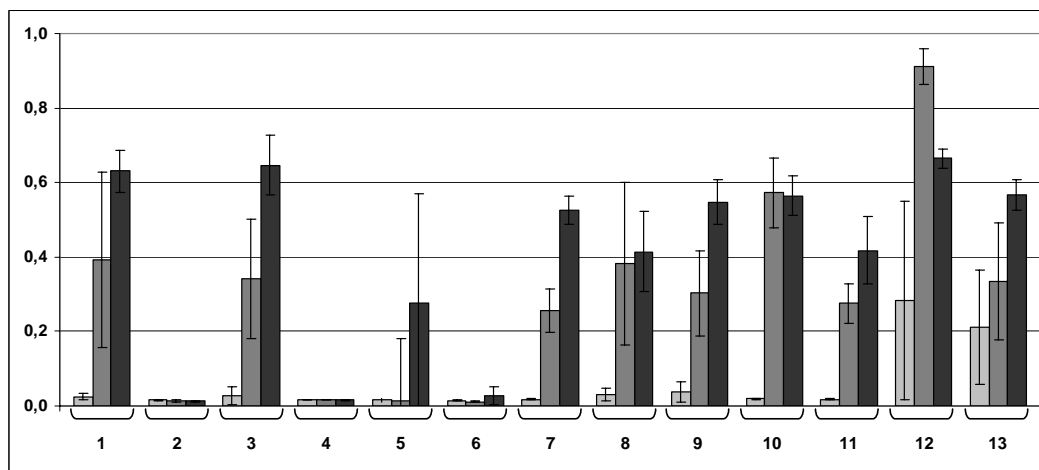
hypertonischen Stress im Wt und in der Mutante beobachtet werden. Mit am stärksten wurden beispielsweise in beiden Fällen die Gene für die Ectoin-Biosynthese und für die Aufnahme des kompatiblen Solut/ Osmo-Protektans Betain induziert.

Durch Kooperation mit E. Brehmer in Marburg wurde die Produktion von Ectoin in hypertonisch gestressten Kulturen von Wt P27459-S und P27459*osmK::TncatpirkanR* nachgewiesen, wobei die Mengen an synthetisiertem Ectoin durchwegs vergleichbar waren (Daten nicht gezeigt).

Besonders auffällig war die unterschiedliche Expression von OmpU im Vergleich des Transkriptoms des Wt P27459-S zur Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* unter hypertonischen Bedingungen. Neben OmpT ist OmpU das häufigste Porin in der AM von *V. cholerae* und gilt als wichtiger Virulenzfaktor. Eine entscheidende Rolle spielt OmpU bei der Resistenz gegenüber anionischen Detergenzien (z. B.: Gallensäure) (212, 213), nach neueren Untersuchungen aber auch bei der Resistenz gegenüber einigen Defensinen (P2, Polymyxin B) (164). Eine Funktion für das Wachstum unter hypertonischen Bedingungen wurde noch nicht beschrieben. Bisher wurde die Kontrolle der Expression von OmpU und OmpT ausschließlich dem membranständigen Regulator ToxR zugeordnet, dem u. a. auch die Transkriptionregulation des CT und des TCP unterliegt (177, 178). Dabei wurde in früheren Analysen ein Verlust der aktivierenden bzw. reprimierenden Wirkung von ToxR mit zunehmender NaCl-Konzentration festgestellt, aber nicht näher untersucht (177).

### 5.2.1. Wachstum unter Salzstress

Da die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen keine eindeutige Erklärung für das eingeschränkte Wachstum der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* unter hypertonischen Bedingungen lieferte, sollte der Wachstumsdefekt nochmals bestätigt werden. Hierzu wurden Kulturen verschiedener Mutanten und des Wt in M9-Medium mit unterschiedlichem NaCl-Gehalt bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und nach 24, 48 und 72 h das Wachstum bei OD<sub>600</sub> ermittelt (siehe III 7.3.). Als Negativkontrolle stand die *ectC*-Mutante P27459Δ*ectC* zur Verfügung, welche durch eine Deletion in *ectC* nicht mehr zur Synthese des kompatiblen Solut/ Osmo-Protektans Ectoin fähig ist. Da Ectoin als endogenes Osmo-Protektans in der Osmoadaptation von *V. cholerae* eine entscheidende Rolle spielt, sind Mutanten mit defekter Ectoinbiosynthese deutlich in ihrem Wachstum unter hypertonischen Bedingungen inhibiert (210). Dabei zeigte sich für den Wt P27459-S, dass erst ab einer Konzentration von 800 mM NaCl eine deutliche Wachstumsverzögerung im Vergleich zu einer Kultur ohne zusätzliches NaCl auftrat (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung IV.21: Wachstum unter hypertonischen Bedingungen.** Dargestellt ist der Verlauf der OD<sub>600</sub> in M9-Kulturen mit 900 mM NaCl. Die Messpunkte jeder Kultur nach 24 h sind durch hellgraue, nach 48 h durch graue und nach 72 h durch dunkelgraue Balken gekennzeichnet. Alle Wachstumskurven wurden mindestens viermal unabhängig durchgeführt. 1: Wt P27459-S; 2: P27459*osmK*::*TncatpirkanR*; 3: P27459*osmK*::*TncatpirkanR* pGEM*osmK*; 4: P27459Δ*ectC*; 5: P27459*osmK*; 6: P27459*osmR*; 7: P27459*envZ*; 8: P27459VCA0257; 9: P27459Δ*ompU*; 10: P27459Δ*toxR*; 11: P27459Δ*toxS*; 12: Wt P27459-S mit 1 mM Betain; 13: P27459*osmK*::*TncatpirkanR* mit 1 mM Betain;

In Abbildung IV.21 werden die Wachstumsdaten für Kulturen grafisch präsentiert, welche in M9 mit 900 mM NaCl inkubiert wurden. Diese Salzkonzentration wurde ausgewählt, da der Wt P27459-S innerhalb von drei Tagen bei stetigem Wachstum immerhin eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 erreichte (Abb. IV.21, Balken 1), Kulturen der Mutante P27459Δ*ectC* jedoch auch nach 72 h noch keine messbare Trübung zeigten (Abb. IV.21, Balken 4). Da dies auch für die Mutante P27459*osmK*::*TncatpirkanR* zutraf (Abb. IV.21, Balken 2), konnte der Wachstumsdefekt unter hypertonischen Bedingungen bestätigt werden. Bei der Expression von *OsmK* in trans von pGEM*osmK* in P27459*osmK*::*TncatpirkanR* wurde wieder ein dem Wt vergleichbares Wachstum beobachtet (Abb. IV.21, Balken 3). Um dennoch eine zusätzliche Mutation in der Transposonmutante auszuschließen, wurden die Mutanten P27459*osmR* und P27459*osmK* durch gezielte Insertion des Suizidvektors pGP704 (siehe III 4.4.1.) etabliert und ebenfalls auf das Wachstum unter hypertonischen Bedingungen getestet. In beiden Fällen war ein gehemmtes Wachstum im Vergleich zum Wt erkennbar (Abb. IV.21, Balken 5 und 6), wobei manche Kulturen von P27459*osmK* nach 72 h deutlich bewachsen waren, andere hingegen keine Trübung zeigten. Durch Ausplattieren von Zellen der bewachsenen Kulturen auf LB/Sm- und parallel auf LB/Ap-Agarplatten wurde festgestellt, dass es sich dabei um Ap<sup>s</sup> Revertanten handeln muss. In die Kulturen der Testreihe wurde kein Antibiotikum gegeben, um einen zusätzlichen Selektionsdruck zu vermeiden. Daher war ein Verlust des Suizidvektors durchaus denkbar.

In anderen Gram<sup>-</sup> Bakterien werden Veränderung der osmotischen Bedingungen u. a. über das Zwei Komponenten-System EnvZ/ OmpR wahrgenommen, welches u. a. die Expression der Porine der AM reguliert (165, 200). Da OsmK durchaus Homologie (26% Identität) zu EnvZ aus *V. cholerae* und anderen Bakterien aufweist, wurden weiterhin die Mutanten P27459*envZ* und P27459VCA0257 erzeugt. Der Locus VCA0257 kodiert eine zu OsmK ähnliche (32% Identität) putative Sensor-Histidinkinase. In die Testreihe wurden auch die Deletionsmutanten P27459 $\Delta$ *ompU*, P27459 $\Delta$ *toxR* und P27459 $\Delta$ *toxS* einbezogen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Deregulation von OmpU in der *osmK*-Mutante und dem hypertonen Wachstumsdefekt nachzuweisen. Jedoch konnte für keine Mutante ein signifikanter Unterschied zum Wt P27459-S festgestellt werden (Abb. IV.21, Balken 7 bis 11).

Selbst nach 72 h konnten aus M9-Medium mit 900 mM NaCl noch lebenden Zellen der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* isoliert werden. Eine Inkubation von M9-Kulturen des Wt P27459-S und der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* in M9-Medium mit 900 mM NaCl für bis zu 24 h ergab, dass die Lyseraten durch den osmotischen Schock in beiden Stämmen etwa gleich hoch war (Daten nicht gezeigt).

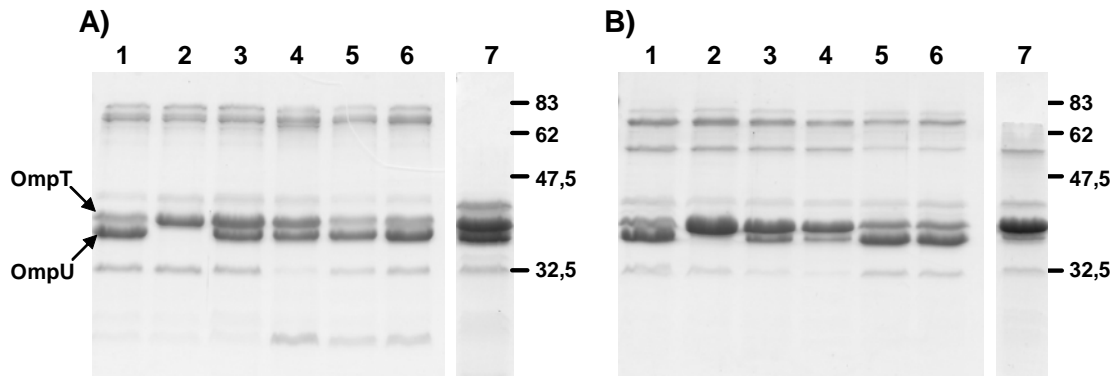
Durch Zugabe des kompatiblen Soluts Betain (1 mM) unter hypertonen Bedingungen zu der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* konnte der Wachstumsdefekt weitgehend aufgehoben werden (Abb. IV.21, Balken 13). Das Wachstum des Wt P27459-S wurde durch Betain stark beschleunigt, wodurch die höchste OD<sub>600</sub> bereits nach 48 h erreicht worden ist (Abb. IV.21, Balken 12).

Eine Wachstumskurve unter hypotonischen Bedingungen in M9-Medium mit nur 25% der eigentlichen Salzkonzentration ergab keinen Unterschied zwischen Wt P27459-S oder einer der untersuchten Mutanten.

### 5.2.2. Veränderungen in der Außenmembran

Der Einfluss hoher Osmolarität auf die AM wurde über eine Analyse der präparierten AM-Proteine durch SDS-PAGE und Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie untersucht. Die Bakterien wurden dazu entweder in M9- oder in M9-Medium mit 800 mM NaCl kultiviert.



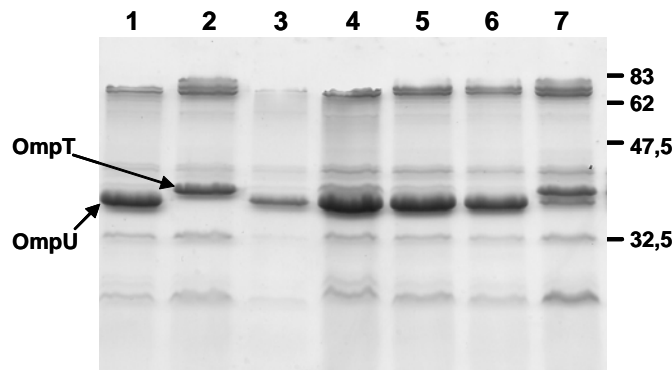


**Abbildung IV.22: Veränderungen in der AM von Wt P27459-S und verschiedenen Mutanten unter hypertonen Bedingungen.** PAA-Gel (15%) von AM-Proteinen nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie. Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben. A: Kulturen gewachsen in M9-Medium, B: Kulturen gewachsen in M9-Medium mit 800 mM NaCl. 1: Wt P27459-S; 2: P27459 $\Delta$ toxR; 3: P27459osmK::TncatpirkanR; 4: P27459osmR; 5: P27459envZ; 6: P27459VCA0257; 7: P27459 $\Delta$ toxS;

Die AM-Profile des Wt P27459-S und diverser Mutanten unter isotonen und hypertonen Bedingungen sind in Abbildung IV.22 dargestellt. Deutlich waren die abundanten Banden der beiden Porine OmpT (40 kDa) und OmpU (38 kDa) zu erkennen. Charakteristisch war die fehlende OmpU-Bande bei P27459 $\Delta$ toxR, da aufgrund des deletierten Transkriptionsregulators ToxR die Mutante nicht mehr in der Lage war, *ompU* zu exprimieren (Abb. IV.22, Spur 2). Die AM-Profile der unter isotonen Bedingungen gewachsenen Mutanten waren durchwegs mit dem des Wt vergleichbar (Abb. IV.22 A), jedoch erschien bei den Mutanten des Zwei-Komponenten-Systems OsmRK und der *toxS*-Mutante die OmpT-Bande etwas intensiver (Abb. IV.22 A, Spuren 3, 4 und 7). Dieses Phänomen verstärkte sich unter hypertonen Bedingungen. Hier war die OmpU-Bande in den Mutanten P27459osmK::TncatpirkanR, P27459osmR, P27459 $\Delta$ toxS deutlich schwächer als beim Wt P27459-S (Abb. IV.22 B, Spuren 3, 4 und 7). Die Mutationen in *envZ* und VCA0257 hatten im Vergleich zum Wt unter beiden Bedingungen keinen Einfluss auf die Proteine der AM (Abb. IV.22 A und B, Spuren 5 und 6). Interessant war die geringe Veränderung zwischen iso- und hypertonen Bedingungen in der AM beim Wt. Der wesentliche Unterschied bestand im Auftreten einer Proteinbande bei etwa 55 kDa unter hypertonen Bedingungen. Auch bei den AM-Profilen der untersuchten Mutanten konnte diese Proteinbande nachgewiesen werden (Abb. IV.22 B). Diese Bande wurde aus zwei unabhängigen Proben nach einer SDS-PAGE ausgeschnitten und zur Proteinsequenzierung gegeben. Die Ergebnisse werden in Kapitel IV 6. dargelegt.

Kürzlich wurde berichtet, dass OmpU zu der Resistenz gegenüber antimikrobiellen polykationischen Peptiden beiträgt (164). Um einen Einfluss solcher Substanzen auf die Expression von OmpU durch OsmRK oder der anderen Zwei-Komponenten-Systeme

aufzudecken, wurden ferner AM-Profile des Wt und der oben erwähnten Mutanten in Anwesenheit des polykationischen Peptids Protamin untersucht.



**Abbildung IV.23: Veränderungen in der AM von Wt P27459-S und verschiedenen Mutanten durch Anwesenheit von Protamin.** PAA-Gel (15%) von AM-Proteinen nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie. Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben. Kulturen gewachsen in M9-Medium mit Protamin (300 µg/ml). 1: Wt P27459-S; 2: P27459Δ*toxR*; 3: P27459*osmK*::*TncatpirkanR*; 4: P27459*osmR*; 5: P27459*envZ*; 6: P27459VCA0257; 7: P27459Δ*toxS*;

Die jeweiligen AM-Profile der mit Protamin versetzten Kulturen sind in Abbildung IV.23 gezeigt. Deutlich war beim Wt P27459-S im Vergleich zu den AM-Profilen unter nicht gestressten Bedingungen (Abb. IV.22 A, Spur 1) die Reduktion von OmpT zu erkennen, während OmpU nun eine sehr intensive Proteinbande zeigte (Abb. IV.23, Spur 1). Das gleiche Bild war bei Betrachtung der AM von P27459*osmK*::*TncatpirkanR*, P27459*osmR*, P27459*envZ* und P27459VCA0257 festzustellen (Abb. IV.23, Spuren 3 bis 6). Dies galt nicht für P27459Δ*toxR*, da aufgrund des fehlenden Transkriptionsregulators ToxR die Mutante wiederum nicht mehr in der Lage war, *ompU* zu exprimieren (Abb. IV.23, Spur 2). Bei Mutante P27459Δ*toxS* war neben einer schwachen OmpU-, eine deutliche OmpT-Bande zu erkennen (Abb. IV.23, Spur 7).

Die laut den AM- und Mikrorarray-Analysen verminderte Expression von OmpU in der Mutante P27459*osmK*::*TncatpirkanR* unter hypertonen Bedingungen sollte durch eine *ompU-phoA*-Fusion mit anschließender Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität bestätigt und quantifiziert werden. Dazu wurde der Suizidvektor pGPphoA verwendet, auf welchem das promotorlose Gen für die alkalische Phosphatase kodiert ist. Dennoch besitzt dieses *phoA*-Fragment eine eigene Ribosomenbindestelle (RBS), die Signalsequenz zum Transport ins Periplasma und Start/ Stop-Kodon. Durch die Konstruktion von pGPphoAompU konnte dieser Vektor über *ompU* ins Chromosom von *V. cholerae* inserieren, wodurch *phoA* nun unter Kontrolle des *ompU*-Promotors stand (siehe III 5.8.1. und 4.4.1.).

**Tabelle IV.4: Quantifizierung der Expression von OmpU unter isotonischen und hypertonen Bedingungen durch Phosphatase-Assay.** Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Alle Messungen wurden viermal unabhängig durchgeführt. Zur genauen Durchführung und Berechnung der Aktivität siehe III 6.8.

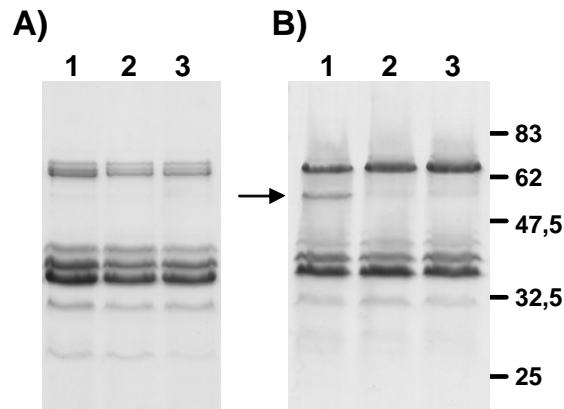
Stamm	alkalische Phosphatase-Aktivität ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{l}$ )	
	M9-Medium	M9 Medium mit 800 mM NaCl
Wt P27459-S	$3,97 \pm 0,36$	$1,23 \pm 0,27$
P27459 <i>ompU</i> ::pGP <i>phoA</i>	$1026,90 \pm 291,05$	$2924,90 \pm 200,96$
P27459 $\Delta$ <i>toxR</i>	$3,51 \pm 1,44$	$5,79 \pm 0,3$
P27459 $\Delta$ <i>toxR</i> <i>ompU</i> ::pGP <i>phoA</i>	$98,61 \pm 33,49$	$81,69 \pm 10,19$
P27459 <i>osmK</i> :: <i>TncatpirkanR</i>	$4,41 \pm 1,11$	$13,24 \pm 8,06$
P27459 <i>osmK</i> :: <i>TncatpirkanR</i> <i>ompU</i> ::pGP <i>phoA</i>	$541,39 \pm 146,13$	$17,50 \pm 2,83$

Die Ergebnisse des Phosphatase-Assays sind in Tabelle IV.4 zusammengefasst. Wie erwartet zeigten die *phoA* Kontrollstämme nur geringe Grundaktivität unabhängig von den osmotischen Bedingungen des Mediums. Erst durch die Insertion von *phoA* in *ompU* in den jeweiligen Stämmen war eine deutliche Aktivität zu messen. Dabei war sie bei isotonischen Bedingungen im wildtypischen Hintergrund (P27459*ompU*::pGP*phoA*) am höchsten, im *toxR* Hintergrund (P27459 $\Delta$ *toxR* *ompU*::pGP*phoA*) am geringsten. Die Werte von P27459*osmK*::*TncatpirkanR* *ompU*::pGP*phoA* lagen dazwischen. Unter hypertonen Bedingungen verdreifacht sich die Aktivität bei P27459*ompU*::pGP*phoA*, während sich die Phosphatase-Aktivität von P27459*osmK*::*TncatpirkanR* *ompU*::pGP*phoA* um den Faktor 30 verringerte. Die Werte von P27459 $\Delta$ *toxR* *ompU*::pGP*phoA* blieben nahezu unverändert.

## 6. Degradation von HutA unter Salzstress

Bei dem Vergleich der AM-Profile von Zellen, welche unter verschiedenen Bedingungen gewachsen waren, trat ein Proteinbande von ca. 55 kDa nur unter hypertonen Bedingungen auf (siehe Abb. IV.22). Wie Kapitel IV 5.2.2. erwähnt, wurde die Bande ausgeschnitten, das Protein isoliert und ansequenziert. Dadurch wurde das Protein aus zwei unabhängigen Proben als HutA identifiziert. Das 698 AS umfassende Transmembranprotein HutA, spielt eine wichtige Rolle bei der Eisenaufnahme (109) und kodiert auf dem zweiten Chromosom von *V. cholerae* im Locus VCA0576. Es zeichnet sich durch einen theoretischen pI von 4,79 und ein Molekulargewicht von 77,8 kDa aus. Diese Größe stimmt eindeutig nicht mit dem Migrationsverhalten im PAA-Gel überein, da die Bande deutlich unter 62 kDa lief. Allerdings wurde bei der Proteinsequenzierung keine Peptidfragmente hinter der AS 470

gefunden. Daher könnte eine C-terminale Proteindegradation stattgefunden haben. Um dies zu überprüfen wurde zunächst eine *hutA*-Deletionsmutante P27459 $\Delta$ *hutA* erzeugt und das AM-Profil im Vergleich zum Wt kontrolliert.



**Abbildung IV.24: Veränderungen in der AM unter hypertonen Bedingungen.** PAA-Gel (15%) von AM-Proteinen nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie. Die Proteinbande des verkürzten HutA ist mit einem Pfeil markiert. Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben. A: Kulturen gewachsen in M9-Medium, B: Kulturen gewachsen in M9-Medium mit 800 mM NaCl. 1: Wt P27459-S; 2: P27459 $\Delta$ *hutA*; 3: P27459*hutA*::pGPphoA;

Dies ist in Abbildung IV.24 dargestellt. Wieder war deutlich die Proteinbande zwischen 47,5 und 62 kDa in der AM des Wt P27459-S unter hypertonen Bedingungen zu erkennen (Abb. IV.24 B, Spur 1), dagegen fehlte diese in der AM-Präparation von P27459 $\Delta$ *hutA* (Abb. IV.24 B, Spur 2). Eine zusätzliche Veränderung in der AM durch die *hutA*-Mutation konnte nicht festgestellt werden. Unter isotonischen Bedingungen wurde kein Unterschied im AM-Profil der Stämme bemerkt (Abb. IV.24 A, Spur 1 und 2). Für die Mutante P27459 $\Delta$ *hutA* war im Vergleich zum Wt kein Wachstumsdefekt unter hypertonen Bedingungen nachzuweisen. Durch eine *hutA-phoA*-Fusion, welche analog zu den *phoA*-Fusionen aus Kapitel IV 5.2.2. erzeugt wurde, sollte eine mögliche Deregulation der Transkription von *hutA* quantifiziert werden. Wie der Abb. IV.24 B, Spur 3 entnommen werden kann, führte die Insertion von pGPphoA nach AS-Position 600 in P27459*hutA*::pGPphoA bereits zur Abwesenheit der degradierten HutA-Bande. Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität des Stammes P27459*hutA*::pGPphoA ergab  $164,5 \pm 18,3$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{l}$ ) unter isotonischen und  $591,5 \pm 19,3$  ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{l}$ ) unter hypertonen Bedingungen.

## V Diskussion

### Adhäsion an den Mukus

Das O Antigen von *V. cholerae* ist, wie bei vielen anderen pathogenen Gram<sup>-</sup> Bakterien auch, nicht nur eine strukturelle Komponente des LPS, sondern trägt überdies entscheidend zur Virulenz bei. Zum Beispiel führt ein Verlust des O Antigens bei *V. cholerae* O1 zu einer Sensitivitätszunahme gegenüber Humanserum (188). Bei O139 ist dagegen vor allem die Kapsel für die Serumresistenz ausschlaggebend, da sich ein Verlust des kurzen O139 Antigens kaum auf die Überlebensfähigkeit in Gegenwart von Humanserum auswirkt (194). Im Mausmodell sind O Antigen<sup>-</sup>-Mutanten beider Serogruppen im Vergleich zum Wt etwa 50 bis 100fach attenuiert (192, 194). Schon früher wurden die O Antigene bzw. die Kapsel als putative Adhäsionsfaktoren vorgeschlagen (22, 49).

Um die Rolle der beider O Antigene und der Kapsel bei der Anheftung an die Darmepithelzellen zu analysieren, wurden Adhäsionsstudien von *V. cholerae* O1 und O139 unter Verwendung der menschlichen Darmzelllinie HT-29-Rev MTX 10<sup>-6</sup> (150) durchgeführt. Dazu wurde einerseits die Mutante P27459 $\Delta$ *rfb* verwendet, welche aufgrund einer 16 kb großen Deletion im *wbe*-Gencluster keine O Antigen-Biosynthese mehr durchführen konnte. Andererseits stand für die Serogruppe O139 bereits die Kapsel/ O Antigen<sup>-</sup>-Doppelmutante MO10 $\Delta$ *waaLwbfF* zur Verfügung. Frühere Untersuchungen demonstrierten die Fähigkeit von *V. cholerae* an mukusproduzierende Darmepithelzellen zu adhären (22). Dabei wurden jedoch nur Adhäsionsraten von maximal 10% erzielt. Dagegen lagen die Adhäsionsraten von *V. cholerae* O1 und O139 mit 72 bzw. 46% in dieser Arbeit deutlich höher, was auf eine effiziente Anheftung der Bakterien an den Mukus schließen lässt. Weiterhin deuteten die Experimente von Benitez et al. eine mögliche Beteiligung des LPS am Adhäsionsvorgang an, da durch externe Zugabe von LPS aus *V. cholerae* O1 die Adhäsion um bis zu 64% verringert werden konnte. Als potentieller Adhäsionsfaktor kommt vor allem das nach außen exponierte O Antigen des LPS in Frage. Die Ergebnisse der Adhäsionsstudien in dieser Arbeit unterstützen die These, dass das O Antigen bei O1 sowie das O Antigen und die Kapsel bei O139 bei der Anheftung an den Mukus beteiligt sind. Im Vergleich zum jeweiligen Wt konnte bei der O Antigen-Mutante P27459 $\Delta$ *rfb* eine Reduktion der Adhäsionsrate um 85%, bei der Kapsel/ O Antigen-Mutante MO10 $\Delta$ *waaLwbfF* eine Abnahme der Adhäsionsrate um 70% festgestellt werden. Eine Beteiligung von Genprodukten, deren Expression über das ToxR-Regulon kontrolliert wird, konnte ebenfalls nachgewiesen werden, da die Adhäsionsrate der *toxR*-Mutante P27459 $\Delta$ *toxR* im Test etwa dreifach geringer als beim Wt war. Dies steht im

Widerspruch zu den Ergebnissen von Benitez et al., welche keinen Einfluss von ToxR feststellen konnten. Allerdings wurde in deren Studie *V. cholerae* in „meat extract“- und nicht wie in der vorliegenden Arbeit in AKI-Medium kultiviert, wodurch keine Induktion der ToxR-Kaskade erfolgte. Dadurch kann man sich die unterschiedlichen Befunde erklären.

Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten, dass keine der untersuchten Mutationen einen vollständigen Ausfall der Adhäsion zur Folge hatte. Infolgedessen sind wahrscheinlich noch andere, bisher nicht näher charakterisierte Adhäsionsfaktoren für die Anheftung von *V. cholerae* an die Darmepithelzellen von Bedeutung. Hier kommen beispielsweise die Typ IV Pili MSHA und MFRHA, sowie die Flagelle in Frage. Bei anderen Bakterien konnte bereits eine Beteiligung von Fimbrien bzw. Pili und Flagellen an der Adhäsion an Wirtszellen nachgewiesen werden (10, 86). Möglicherweise ist aber die Anheftung an den Mukus nicht nur von einem, sondern von mehreren Faktoren abhängig.

### **Die O Antigen-Ligase von *V. cholerae***

Wie bereits erwähnt stellt das O Antigen von *V. cholerae* O1 eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Kolonisierung dar. Die O Antigen-Ligase (WaaL) gilt als entscheidendes und hinreichendes Enzym für den Transfer des O Antigens auf den Lipid A/ Kern OS-Komplex (124, 215). Obwohl WaaL ein Schlüsselenzym in der LPS-Biosynthese Gram<sup>-</sup> Bakterien darstellt, ist bislang sehr wenig über dieses Enzym bekannt. Die meisten Informationen beruhen auf indirekten Daten oder Modellsystemen. Dabei bieten die LPS-Biosynthese, sowie die O Antigen-Ligase im Speziellen durchaus potentielle Angriffsziele für künftige therapeutische Ansätze von Krankheiten, die durch Gram<sup>-</sup> Bakterien verursacht werden. Dazu ist aber ein tiefgreifendes Verständnis der LPS-Biosynthese bei den jeweiligen Mikroorganismen notwendig.

Über die von Computerprogrammen vorhergesagten Transmembrandomänen und die etablierten LacZ- und PhoA-Fusionen konnte in dieser Arbeit erstmalig die Topologie der O Antigen-Ligase aus einem *V. cholerae* O1 El Tor Stamm, WaaL<sup>P27459</sup>, entschlüsselt werden. WaaL<sup>P27459</sup> besitzt demnach 10 Transmembrandomänen, 5 periplasmatische und 4 cytoplasmatische Schleifen, wobei sich das C- und das N-terminale Ende im Cytoplasma befinden. Besonders auffällig ist die große periplasmatische Schleife PIV mit über 100 AS. Eine derartige Schleife wird durch die Hydrophobizitätsdiagramme auch in den O Antigen-Ligasen von anderen *V. cholerae* Isolaten, *E. coli* und *S. enterica* sv. Thyphimurium bzw. sv. Arizonae IIIA vorhergesagt (107, 124).

In der kürzlich veröffentlichten Topologie der O Antigen-Polymerase (Wzy) von *S. flexneri* wurde ebenfalls eine große periplasmatische Schleife von 54 AS in der C-terminalen Hälfte identifiziert (68). Ähnlich wie bei den O Antigen-Ligasen zeichnen sich die O Antigen-Polymerasen unterschiedlicher Serogruppen durch geringe Identität in der Primärstruktur, aber ähnliche Hydrophobizitätsprofile aus (215). Ein Vergleich der Hydrophobizitätsdiagramme von Wzy aus *S. flexneri* und den oben genannten O Antigen-Ligasen bestätigt, dass beide Proteinfamilien eine vergleichbare Topologie besitzen (Abb. VII.3). Wie bereits in Kapitel II 4.1. beschrieben, ist Wzy ein Bestandteil in einem der drei O Antigen-Transportsysteme. Dabei katalysiert Wzy die Polymerisation von O Antigen-Wiederholungseinheiten am Und-PP auf der periplasmatischen Seite der CM, wogegen WaaL das O Antigen auf den Lipid A/ Kern OS-Komplex transferiert. Somit unterscheiden sich die Reaktionen von Wzy und WaaL nur in dem Akzeptormolekül.

Durch eine Gegenüberstellung der Proteinsequenzen von O Antigen-Ligasen aus verschiedenen Gram<sup>-</sup> Bakterien konnten zwei konservierte Motive identifiziert werden: Zum einen das Motiv R(X<sub>3</sub>)L, welches entsprechend der Topologie von WaaL<sup>P27459</sup> in der periplasmatischen Schleife PIII liegt. Eine ähnliche Sequenzabfolge ist mit R(X<sub>2</sub>)L auch in Wzy von *S. flexneri* an äquivalenter Position zu erkennen (68). Zum anderen das Motiv H(X<sub>10</sub>)G, welches sich in der Schleife PIV von WaaL<sup>P27459</sup> befindet. Dieses ist auch in der Wzy-Konsensus-Sequenz (Pfam04932) vorhanden, welche bei der Suche nach konservierten Domänen allen untersuchten O Antigen-Ligasen zugeordnet werden konnte. Die Funktion der basischen AS dieser Motive wurde durch spezifisch eingeführte Punktmutationen in WaaL<sup>P27449</sup> und WaaL<sup>SARC6</sup> analysiert. Sowohl der Austausch des Arginins, als auch der des Histidins führte zu einer inaktiven oder zumindest in der Aktivität stark beeinträchtigten Ligase. In *V. cholerae* P27459 konnte beobachtet werden, dass die Aufgabe des Histidins im Motiv H(X<sub>10</sub>)G durch ein benachbartes Histidin zumindest teilweise übernommen werden kann. Eine Mutation beider Histidine resultierte aber auch in diesem Fall zu einer komplett inaktiven Ligase. Daher repräsentieren das Arginin und das Histidin der Motive R(X<sub>3</sub>)L bzw. H(X<sub>10</sub>)G konservierte AS, welche essentiell für die Transferreaktion sind. Ob auch die hydrophoben AS Leucin und Glycin der Motive die Aktivität der Ligase beeinflussen, bleibt noch zu untersuchen.

Abgeleitet aus den biochemischen Mechanismen von periplasmatischen Glykosyltransferasen der Mureinbiosynthese (258) oder Nukleasen, könnten das Arginin und das Histidin im aktiven Zentrum von WaaL eine entscheidende Rolle bei der Abspaltung des O Antigens von

dem Und-PP spielen. So befinden sich im aktiven Zentrum der Ribonuklease A zwei Histidine, welche abwechselnd als Protonendonator und Protonenakzeptor fungieren (219). In zwei aufeinander folgenden Schritten wird über einen pentakovalenten Übergangszustand des Phosphors die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung katalysiert. Nach diesem Modell ist immer eine der beiden beteiligten AS protoniert und somit vor einer Alkylierung durch Iodacetat geschützt. In der Tat kann bei der Ribonuklease immer nur eines der beiden Histidine alkyliert werden, wodurch das Enzym inaktiv wird (153). Daher könnte ein solches Experiment den vorgeschlagenen Mechanismus für die Ligasereaktion belegen. Aufgrund der durchaus vergleichbaren Aktivität und der Anwesenheit ähnlicher Motive in Wzy könnten auch O Antigen-Polymerasen diesen Reaktionsmechanismus verwenden.

Da ein Komplementationsversuch von *waaL*-Mutanten in P27459-S und V194 mit der jeweils anderen O Antigen-Ligase scheiterte, konnte in dieser Arbeit die Spezifität von WaaL gegenüber einem definierten Kern OS bestätigt werden (107, 276). Für *E. coli* wurde bereits früher demonstriert, dass eine *waaL*-Mutation in einem R2 Isolat durch die Expression von WaaL aus K-12 nur ungenügend komplementiert werden kann (107). In einer erst kürzlich erschienen Arbeit wird vermutet, dass WaaL nicht der einzige Faktor ist, welcher für die Erkennung des Kern OS verantwortlich ist (124). In dieser Publikation gelang die Komplementation einer *waaL*-Mutante eines *S. enterica* Isolats mit der O Antigen-Ligase aus einem anderen Stamm. Jedoch wurden nah verwandte O Antigen-Ligasen untersucht, welche auf Proteinebene zu 92% identisch sind. Aufgrund dieser hohen Homologie ist die Aktivität der O Antigen-Ligase in dem fremden Stammhintergrund nicht verwunderlich. Dagegen zeigen die Ligasen WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup> aus dieser Arbeit nur 23,7% Identität.

Um die Spezifität der O Antigen-Ligasen gegenüber dem Kern OS näher zu untersuchen, wurden Hybridfusionen von WaaL<sup>P27459</sup> und WaaL<sup>V194</sup> konstruiert. Diese Hybride enthielten jeweils die N-terminale Hälfte der einen und die C-terminale Hälfte der anderen O Antigen-Ligase. Eine Komplementationsstudie demonstrierte, dass nur das Hybrid WaaL<sup>V194/P27459</sup> in P27459*waaL* eine Anheftung des O Antigens ermöglichte. Die zusätzliche Expression von WavM führte allerdings zum Aktivitätsverlust dieses Hybrids. Diese Beobachtung stimmt mit dem Phänomen überein, dass eine Expression von WavM in Wt P27459-S zu einem Verlust des O Antigens führte und WaaL<sup>P27459</sup> in V194*wavM* das O Antigen transferieren konnte. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die C-terminale Hälfte von WaaL<sup>P27459</sup> mit der großen periplasmatischen Schleife PIV wichtig für die Erkennung des eigenen Kern OS ist. Durch



den von WavM katalysierten Transfer einer zusätzlichen Galaktose an das Kern OS wurde eine Erkennung des Kern OS durch WaaL<sup>P27459</sup> verhindert.

Die entsprechenden Experimente in V194*waaL* blieben erfolglos, da keines der beiden Hybride die O Antigen-Anheftung ermöglichte. Indessen waren die parallel erzeugten Ligasefusionen WaaL<sup>P27459/P27459</sup> und WaaL<sup>V194/V194</sup> in der Lage eine *waaL*-Mutation in dem entsprechenden Stammhintergrund zu komplementieren. Ein Funktionsverlust durch die Konstruktion der Hybride, z. B. aufgrund der Insertion eines Methionins an der Fusionsstelle, kann daher nahezu ausgeschlossen werden. Dennoch kann für WaaL<sup>V194</sup> keine Aussage bezüglich der relevanten Proteinbereiche für die Erkennung der Galaktose im eigenen Kern OS getroffen werden.

Weitere Hybridkonstruktionen, in denen beispielsweise nur einzelne periplasmatischen Schleifen ausgetauscht werden, sind notwendig, um die Details der Kern OS-Spezifität von O Antigen-Ligasen zu ergründen. Alternativ wäre auch die Etablierung definierter Punktmutationen in *waaL*, die eine Kern OS-Spezifität aufheben, durch eine geeignete Selektionstechnik erstrebenswert. Da es sich um ein großes Transmembranprotein handelt, sind solche Analysen jedoch besonders schwierig.

### **Strukturelle Voraussetzungen des Kern OS für die Aktivität von WaaL**

Durch eine systematische Etablierung und Charakterisierung von *wa*\*-Mutanten in P27459-S zu Beginn dieser Studie wurden Genprodukte identifiziert, deren Aktivitäten für die O Antigen-Anheftung von Bedeutung sind. Neben den putativ essentiellen Genprodukten (WavC und WaaA), die in diese Analyse nicht einbezogen wurden, den Heptosyl-Transferasen I bis III (WaaC, WaaF und WavA), welche den Hauptstrang des Kern OS synthetisieren, und der O Antigen-Ligase selbst, führte nur noch die Mutation von *wavL* zu einem vollständigen Verlust des O Antigens.

Bioinformatische Analysen deckten die Bifunktionalität von WavL auf. Während für den N-terminalen Bereich Homologien zu einer Reihe von Glykosyltransferasen gefunden wurden, zeigte der C-terminale Bereich Ähnlichkeiten zu Polysacchariddeacetylasen. Die Detektion von WavL mit C-terminaler His-tag-Fusion im Western Blot bestätigte, dass es sich dabei um ein einzelnes Genprodukt handelt, welches zwei enzymatische Funktionen in sich vereinigt. Interessanterweise konnten für WavL viele ähnliche Proteine in verschiedenen Bakterien gefunden werden, welche die beiden Domänen als einzelne Peptide exprimieren. Dagegen ist die Konstellation als bifunktionales Polypeptid neben *V. cholerae* nur noch in *F. nucleatum* und *A. hydrophila* zu finden. Möglicherweise ist WavL durch Genfusion aus zwei zuvor

getrennten Genen entstanden. Wie diese Arbeit darlegt, ist für die O Antigen-Anheftung nur die N-terminale Glykosyltransferase-Domäne von Bedeutung.

Um die Aktivität von WavL und WavM zu analysieren, wurde ein  $^{14}\text{C}$ -Glykosyltransferase-Assay etabliert. Unter Verwendung von gereinigtem WavL mit C-terminaler His-tag Fusion konnte demonstriert werden, dass WavL spezifisch UDP-GlcNAc als Substrat verwendet und GlcNAc in das Kern OS von P27459 $\Delta$ wavL einbaut. UDP-Gal oder UDP-Glc wurden von WavL als Substrat nicht erkannt. Entsprechend der veröffentlichten Struktur des Kern OS von O1, ist GlcNAc nur an einer Position zu finden (264). Dabei bildet GlcNAc über eine  $\beta(1\rightarrow7)$ -glykosidische Bindung eine Verzweigung zur Hep III aus. Alle bisherigen bioinformatischen Daten und phänotypischen Eigenschaften lassen darauf schließen, dass die Heptosyl-III-Transferase durch *wavA* kodiert wird. Übereinstimmend mit den Strukturdaten war ein Einbau von GlcNAc in das LPS der Doppelmutante P27459 $\Delta$ wavL*wavA* durch WavL nicht möglich, da durch die Mutation der Heptosyl-III-Transferase die Akzeptorstelle für das GlcNAc fehlte. In das LPS von Wt P27459-S konnte ebenfalls kein Einbau nachgewiesen werden, was eine bereits ausreichende Substitution des wildtypischen LPS mit GlcNAc an der Hep III vermuten lässt. Aus diesen Daten geht zusammenfassend hervor, dass WavL eine N-Acetyl-Glucosaminyltransferase der Kern OS-Biosynthese in *V. cholerae* darstellt.

Hinsichtlich der putativen Deacetylasefunktion kann derzeit noch keine Aussage getroffen werden. Jedoch wäre eine Deacetylierung des GlcNAc vor oder nach dem Einbau in das Kern OS denkbar. In den bisherigen Veröffentlichungen der Strukturdaten wurde ein GlcN an der Hep III im Kern OS angegeben (62, 63, 139, 264), obwohl eine definitive Aussage des Acetylierungszustands dieses Zuckers aufgrund der Probenvorbereitung für die Strukturanalyse nicht zu ermitteln war. Letztlich fehlt ein Assay, um die Deacetylaseaktivität von WavL einwandfrei zu bestimmen.

Das Gen *wavL* ist in allen bekannten *wa*\*-Genclustertypen von *V. cholerae* konserviert (191). So überrascht es nicht, dass die Insertionsmutanten V194*wavL* und MO10*wavL* ebenfalls nicht mehr imstande waren, das O Antigen an den Lipid A/ Kern OS-Komplex anzuheften. Für O139 kann das GlcNAc als direkter O Antigen-Akzeptor ausgeschlossen werden, da bereits gezeigt wurde, dass das O139 Antigen an die Hep III angehängt wird (63, 139). Da die O Antigen-Ligasen von O1 und O139 zu 100% identisch sind, ist anzunehmen, dass bei O1 ebenfalls die Hep III der Akzeptor des O Antigens ist. Dennoch scheint GlcNAc eine generelle Voraussetzung des Kern OS darzustellen, welche für die O Antigen-Anheftung in *V. cholerae* notwendig ist. Zum Beispiel ist eine Beteiligung von GlcNAc an der Interaktion

zwischen Kern OS und O Antigen-Ligase denkbar, ohne dabei eine Spezifitätsdeterminante für einen bestimmten Ligasetyp darzustellen.

Erstaunlicherweise ist ein GlcNAc im äußeren Kern OS auch bei einigen *E. coli* und *S. enterica* Stämmen eine wichtige Voraussetzung für die O Antigen-Anheftung (107, 124). Im Detail wurde gezeigt, dass die UDP-N-Acetyl-Glucosamin:(Glykosyl) LPS  $\alpha$ 1,2-N-Acetyl-Glucosaminyltransferase-Aktivität von WaaK für *S. enterica* sv. Typhimurium und für *E. coli* R2 essentiell für die O Antigen-Anheftung ist (108). Es wurde vermutet, dass GlcNAc eine Rolle bei der Erkennung des Kern OS durch die Ligase spielt. Kürzlich präsentierte die gleiche Arbeitsgruppe jedoch Daten, wonach die O Antigen-Ligase von *S. enterica* sv. Typhimurium, die im eigenen Stammhintergrund von WaaK abhängig ist, in einem anderen Stammhintergrund (*S. enterica* sv. Arizonae IIIA) unabhängig von WaaK das O Antigen transferieren konnte (124). Da die O Antigen-Ligasen aus den beiden *Salmonella* Stämmen zu 92% identisch sind, könnte die hohe Ähnlichkeit in Kombination mit einer massiven Überexpression der fremden O Antigen-Ligase eine Erklärung für die O Antigen-Anheftung sein. Insgesamt bestätigten diese Experimente, dass GlcNAc eher generell an der Transferreaktion und nicht an der Ausprägung der Rezeptorspezifität beteiligt ist.

Die *wa*\*-Gencluster von P27459-S und V194 unterscheiden sich vor allem in der Region um *waaL*. Neben der geringen Ähnlichkeit der beiden O Antigen-Ligasen ist bei V194 eine zusätzliche putative Glykosyltransferase WavM kodiert, welche in dieser Arbeit als Galaktosyltransferase charakterisiert wurde. Ein Homolog zu *wavM* konnte weder im *wa*\*-Gencluster von P27459-S (191), noch in der veröffentlichten Genomsequenz von *V. cholerae* O1 El Tor N16961 gefunden werden (106). Eine Mutation von *wavM* in V194 führte zum Verlust des O Antigens im LPS. Demzufolge ist neben WavL auch die Aktivität von WavM in V194 für die Anheftung des O Antigens essentiell. Weiterhin demonstrierten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Modifikation des Kern OS durch WavM die Spezifität gegenüber der O Antigen-Ligase determiniert. So war eine Komplementation der *waaL*-Mutanten nur durch die Expression der eigenen Ligase möglich, wogegen beispielsweise WaaL<sup>V194</sup> in P27459*waaL* keine Aktivität zeigte. Andererseits führte die gleichzeitige Expression von WavM und WaaL<sup>V194</sup> in P27459*waaL* zur Anheftung des O Antigens. Letztlich konnte WaaL<sup>P27459</sup> in V194*wavM* das O Antigen an den Lipid A/ Kern OS-Komplex transferieren, während die Expression von WavM in Wt P27459-S zum Verlust des O Antigens führte. Die Aktivität von WavM scheint daher kritisch für die Erkennung des Kern

OS durch die O Antigen-Ligase zu sein. Für WaaL<sup>V194</sup> ist die Aktivität von WavM essentiell, während die durch WavM katalysierte Modifikation des Kern OS WaaL<sup>P27459</sup> inhibiert.

Anhand der Proteinsequenz wurde WavM in der CAZy-Datenbank der Glykosyltransferase-Familie 15 zugeordnet, wobei sich diese Enzyme durch ihre Galaktosyltransferase-Aktivität auszeichnen (59). Ein <sup>14</sup>C-Glykosyltransferase-Assay demonstrierte, dass WavM spezifisch UDP-Gal als Substrat verwendet, um das Kern OS von V194<sup>wavM</sup> mit Gal zu modifizieren. WavM konnte weder UDP-Glc noch UDP-GlcNAc als Substrat verwenden. Daher kann WavM als Galaktosyltransferase der Kern OS-Biosynthese von V194 angesehen werden. Der geringe Einbau von Gal in das Kern OS von V194 deutete auf die effiziente Substitution des Kern OS mit Gal im Wt hin. Ein Transfer von Gal durch WavM in das LPS des Wt P27459-S und diverser *wa\**-Mutanten von P27459-S scheiterte. Die Glykosyltransferasen der Kern OS-Biosynthese arbeiten sukzessiv (215, 216, 230). Daher kann man annehmen, dass es für die Aktivität von WavM durchaus entscheidend ist, ob WavM in die de novo Synthese des Kern OS eingreifen kann (z. B. durch Expression von WavM in P27459-S), oder ob WavM das bereits synthetisierte Kern OS als Substrat in den in vitro Experimenten angeboten wird. Somit ist ein Ausbleiben der Gal-Substitution des Kern OS von P27459-S im <sup>14</sup>C-Glykosyltransferase-Assay erklärbar.

### **Die *wa\**-Genclustertyp 1 spezifischen Gene *wavD* und *wavJ***

Vergleichende Studien der *wa\**-Gencluster von verschiedenen *V. cholerae* Stämmen zeigten eine Korrelation zwischen klinischen, virulenten Isolaten und dem *wa\**-Genclustertyp 1 auf (191). Dagegen sind bei Umweltisolaten die *wa\**-Genclustertypen 2 bis 4 zu finden. Zwischen den einzelnen Genclustertypen ist eine Heterogenität in der Anwesenheit und Abfolge bestimmter Gene festzustellen. So sind die Gene *wavJ* und *wavD* nur im *wa\**-Genclustertyp 1, und damit nur in den virulenten Isolaten nachzuweisen. Eine Southern Blot-Analyse der verfügbaren 51 *V. cholerae* Isolate bestätigte diese spezifische Prävalenz von *wavJ* und *wavD* in Stämmen der Serogruppe O1, O139 und O37. Das Auftreten beider Gene in O37 Stämmen ist nicht erstaunlich, da diese Serogruppe immerhin 1968 für einen größeren Cholera-Ausbruch im Sudan verantwortlich war (3, 29), seitdem aber erstaunlicherweise epidemiologisch nicht mehr in Erscheinung getreten ist. Weiterhin konnte durch den Southern Blot gezeigt werden, dass in apathogenen Umweltisolaten weder im *wa\**-Gencluster, noch im restlichen Genom Anlagen für diese Gene zu finden waren. Als einzige Ausnahme hierzu konnte bei dem Umweltisolat Ch18022 eine Bande, welche mit der *wavJ*-Sonde hybridisierte,

detektiert werden. Mit einer Größe von ca. 8 kb unterscheidet sie sich aber klar von der durch die Genomsequenz vorhergesagten (106) und bei den virulenten Isolaten detektierten 2,5 kb Bande. Dies kann zum Beispiel durch Restriktionspolymorphismus erklärt werden.

Die Daten der Sequenzanalyse weisen darauf hin, dass es sich bei WavJ um eine Heptosyltransferase handelt. Die Heptosyltransferasen, welche den Transfer der Hep I bis III im Hauptstrang des Kern OS katalysieren, werden aufgrund von Homologie- und Mutanten-Analysen höchstwahrscheinlich durch die Gene *waaC*, *waaF* und *wavA* kodiert (191). Somit liegt nahe, dass WavJ die noch offene Funktion als Heptosyl-IV-Transferase besitzt, wodurch die Seitenkette an der Hep II entstehen könnte. Da im Kern OS eines der strukturell untersuchten Nicht O1/ O139-Stämme die Anwesenheit der Hep IV nachgewiesen wurde (61, 138), ist die Detektion von *wavJ* in einem Umweltisolat (siehe oben) durchaus möglich. Die bioinformatische Analyse von WavD erbrachte keine Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion.

Durch Konstruktion von Deletionsmutanten für *wavJ* und *wavD* in *V. cholerae* O1 und O139 konnte eine ausführliche phänotypische Charakterisierung durchgeführt werden. LPS-Analysen demonstrierten, dass WavD und WavJ eine Funktion in der Biosynthese des Kern OS beider Serogruppen haben. Dabei ist nur ein geringer Unterschied im Laufverhalten des Lipid A/ Kern OS-Komplexes der Mutanten im Vergleich zum Wt zu beobachten. Daher tragen WavD und WavJ wahrscheinlich nur zum Transfer je eines Zuckers oder je einer Modifikation bei. Keines der beiden Genprodukte ist für die Anheftung des O Antigens in einer Serogruppe essentiell. Daher ist ein Einfluss auf den Hauptstrang des Kern OS (KDO mit Hep I bis III) unwahrscheinlich. Insgesamt unterstützt dies die Hypothese, dass *wavJ* für die Heptosyl-IV-Transferase kodiert. Dagegen bleibt die Funktion von WavD weiterhin ungeklärt. Solange bioinformatische Analysen keine signifikanten Ähnlichkeiten von WavD zu Proteinen mit bekannter Funktion aufzeigen, bleibt die Strukturanalyse des LPS von *wavD*-Mutanten die einzige Möglichkeit die Aktivität von WavD zu entschlüsseln. Dafür konnte bisher kein Kooperationspartner gefunden werden.

Die geringe Veränderung des Kern OS in den *wavD*- und *wavJ*-Mutanten der Serogruppe O1 wurde durch die weiterhin bestehende Sensitivität gegenüber dem Phagen K139 bekräftigt. Frühere Experimente mit den Mutanten P27459*wavB* und P27459*galU* demonstrierten dagegen, dass bereits der Verlust von Kern OS-Zuckern (Glc, Fructose) an der Hep I ausreicht, um Phagenresistenz zu erlangen (190, 192, 229). Mutationen, die das Kern OS

betreffen, können zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber membranangreifenden Substanzen führen. So verursacht beispielsweise der Verlust der Phosphatgruppe an der Hep I in einer *waaP*-Mutante bei *S. enterica* sv. Typhimurium eine erhöhte Sensitivität gegenüber Polymyxin B (282). Für *V. cholerae* wurden bei der phänotypischen Charakterisierung diverser LPS-Mutanten ähnliche Beobachtungen gemacht (188, 192, 194, 229). Während die Resistenz gegenüber Gallensäuren, Protamin und Humanserum durch Mutationen in *wavJ* und *wavD* nicht beeinträchtigt wurde, konnte in den *wavDJ*-Doppelmutanten beider Serogruppen eine erniedrigte MHK von 0,75 bzw. 0,375 µg/ml gegenüber dem anionischen, hydrophoben Novobiocin nachgewiesen werden. Im Vergleich zu früher bestimmten MHKs von beispielsweise 0,187 µg/ml für die *wavB*-Mutanten P27459*wavB* und MO10*wavB* (229) ist dieser Effekt aber eher als gering einzustufen. Auch die 3-5fache Attenuation im Mausmodell, welche nur für die *wavD*- und *wavJ*-Mutanten der Serogruppe O139 festgestellt werden konnte, ist im Vergleich zu anderen Kern OS-Mutanten, welche mindestens 50fach attenuiert waren (192, 194), eher minimal. Insgesamt bleibt daher festzuhalten, dass WavJ und WavD einen kleinen Beitrag zur Integrität der AM von *V. cholerae* O1 und O139 leisten. Da eine Relevanz dieser Genprodukte in vivo nur für O139 nachzuweisen war, bleibt die Frage offen, warum diese beiden Genprodukte nur in pathogenen Stämmen kodiert sind und welcher Selektionsvorteil durch sie möglicherweise vermittelt wird.

### **Der O Antigen-Transport bei *V. cholerae* O1 und O139**

Der Transport des O Antigens über die CM wurde bei *V. cholerae* bislang noch nicht untersucht. Im Fall von O139 wurde noch keinem Gen eine Funktion beim O Antigen-Transport zugesprochen. Bei der Suche nach putativen Transmembranproteinen, welche im *wbf*-Gencluster von O139 kodiert sind, wurden WbfQ und WbfK gefunden.

Eine *wbfQ*-Mutante in O139 konnte trotz mehrerer Versuche nicht etabliert werden. Vielleicht tritt durch Zerstörung von WbfQ bei gleichzeitig fortlaufender O Antigen-Synthese in O139 eine lethale Situation auf. Frühere Berichte weisen WbfQ als putative O Antigen-Polymerase aus (247). Das O Antigen von O139 besteht jedoch nur aus einer einzigen Wiederholungseinheit, was eine Beteiligung eines solchen Enzyms bei der LPS-Biosynthese von O139 fragwürdig macht. Im *wbf*-Gencluster kodieren auch die Gene für die Biosynthese der Kapsel, welche aus O139 Antigen-Einheiten aufgebaut ist (27, 28, 54, 137, 139). Daher könnte WbfQ eine Funktion bei der Polymerisation der Kapseluntereinheiten besitzen, aber für die Synthese und Anheftung des O139 Antigens im LPS nicht notwendig sein. Analysen von phagenresistenten Mutanten von O139 lassen eine ähnliche Interpretation zu (11).

In der Mutante MO10*wbfK* konnte weder die Sekretion der Kapsel, noch die Anheftung des O Antigen an den Lipid A/ Kern OS-Komplex beobachtet werden. Durch die Immunlokalisation des O139 Antigen und anschließender Analyse im Elektronenmikroskop wurde nachgewiesen, dass das O139 Antigen in der Mutante noch synthetisiert und im Cytoplasma bzw. an der CM detektiert werden kann. WbfK greift demnach nicht in die Biosynthese des O139 Antigen ein. Die genaue Lokalisation des O139 Antigen an der CM konnte nicht aufgelöst werden. Theoretisch wäre eine Akkumulation des O Antigen durch den ausbleibenden Transport in der *wbfK*-Mutante denkbar. Dennoch konnten nur geringe Mengen an O Antigen-Einheiten im Cytoplasma nachgewiesen werden. Daher könnte die O Antigen-Biosynthese über eine „Feedback“-Regulation kontrolliert werden. Da Und-P neben dem O Antigen auch für den Transport der Peptidoglykan-Untereinheiten des Mureins zuständig ist, erscheint eine solche Regulation durchaus sinnvoll, um eine Blockade des Carriers zu verhindern.

WbfK zeigt Ähnlichkeiten zu der O Antigen-Flippase aus *E. coli*. Dies würde für ein Wzy-abhängiges Transportsystem sprechen. In der Tat deutet das Hydrophobizitätsdiagramm von WbfK (Abb. VII.3) die typischen 12 Transmembrandomänen der Flippase Wzx dieses Systems an (215). Dieses System ist typisch für heterologe, verzweigte O Antigene (215), wie es bei O139 der Fall ist (62, 63, 139). Nun benötigt das Wzy-abhängige Transportsystem neben der Flippase Wzx weiterhin die O Antigen-Polymerase Wzy und den Längenregulator Wzz. Wie bereits erwähnt könnte WbfQ die Polymerase darstellen. Ein Wzz-Homolog wurde bei O139 nicht identifiziert, obwohl dieses Protein in verschiedenen Spezies gut konserviert ist (215). Da das O139 Antigen aber nur aus einer Wiederholungseinheit aufgebaut ist, sind diese Enzymfunktionen möglicherweise für die O139 Antigen-Biosynthese bzw. Transport gar nicht notwendig. Eine Polymerisation der einzelnen O Antigen-Untereinheiten, sowie eine Längenkontrolle des O Antigen für die Biosynthese des LPS wären überflüssig.

Aufgrund von bioinformatischen Analysen des *wbe*-Genclusters von O1 wurde zwar vermutet, dass *wzm* und *wzt* für einen ABC-Transporter kodieren (248), aber bislang nicht näher charakterisiert. Dabei wurde Wzm aufgrund seiner putativen Transmembrandomänen und Homologie zu diversen Permeasen die Rolle des Kanals zugesprochen, während Wzt als ATPase auf der cytoplasmatischen Seite der Membran die Energie für den Transport liefern soll (159). Das O1 Antigen besteht aus einem linearen, unverzweigten Homopolymer von 16-18 Perosamin-Einheiten, die über eine Amidbindung mit 3-Deoxy-L-Glycerotetronat

substituiert sind (134). In der Tat besitzen Gram<sup>-</sup> Bakterien mit einem homogen aufgebauten O Antigen meist das ABC-Transporter-abhängige System (215).

Eine Mutation in *wzm* führte bei *V. cholerae* O1 zum Verlust des O Antigens im LPS. Eine Immunlokalisation des O1 Antigens mit anschließender Analyse im Elektronenmikroskop wird derzeit durchgeführt, um ähnlich wie für MO10*wbfK* zu demonstrieren, dass die *wzm*-Mutante das O1 Antigen noch synthetisieren und es im Cytoplasma bzw. an der CM nachgewiesen werden kann.

Obwohl die Auflösung des Elektronenmikroskops nicht ausreichte, um die genaue Lokalisation der detektierten O139 Antigen-Einheiten an der CM zu bestimmen, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mit der putativen O Antigen-Flippase WbfK tatsächlich das O Antigen-Transportsystem von O139 identifiziert wurde. Allgemein sind die Goldpartikel mit 6 nm Durchmesser schwer vom Hintergrund im Cytoplasma zu unterscheiden. Daher soll in Kürze die Immunlokalisation nochmals mit größeren Goldpartikeln durchgeführt werden. In diese Analyse wird unter Verwendung eines O1-Antiserums auch die Mutante P27459*wzm* einbezogen, wobei Wt P27459-S als Positiv- und P27459Δ*rfb* als Negativkontrolle dienen sollen. Dennoch lassen die Ergebnisse vermuten, dass mit dem putativen ABC-Transporter Wzm/ Wzz das O Antigen-Transportsystem von O1 aufgedeckt wurde.

### **Versuch eines Austausches der *wa*\*- bzw. *wbe*-Gencluster bei *V. cholerae* O1**

Durch eine neue Variante der Deletionstechnik mit pKEK229 konnten im Zuge dieser Arbeit die Mutanten P27459Δ*wbe*, mit einer Deletion von 16 kb, und P27459Δ*wav*, mit zwei Deletionen von 5 bzw. 8 kb, konstruiert werden. Es erwies sich im weiteren Verlauf als äußerst schwierig die großen Expressionsplasmide (meist über 8 kb) mit den diversen *wa*\*- bzw. *wb*\*-Genclustern per Elektroporation in *V. cholerae* zu transformieren. Als Alternative wurde eine Dreifach-Konjugation über den Helferstamm MM294 etabliert, wodurch man allerdings auf wenige kompatible Plasmidtypen beschränkt war.

Die Konstruktion von pBRO1core mit Bereichen des *wa*\*-Genclusters von *V. cholerae* war schwierig. Zum einen mussten große PCR-Fragmente mit geringer Fehlerrate erzeugt werden, zum anderen bestand durch die vorübergehende Etablierung der Plasmide in *E. coli* die Gefahr, dass die Wav-Genprodukte von *V. cholerae* in die Biosynthese des LPS von *E. coli* eingreifen und somit ab einer gewissen Gendosis toxisch wirken könnten. Eine Komplementation einzelner *wa*\*-Gene wie z. B. *wavL* in P27459Δ*wavL* mit pBRO1core war



durchaus möglich. Komplementationsversuche der Deletionsmutanten P27459 $\Delta$ wavI-L und P27459 $\Delta$ wavI-L führten dagegen, nach den Ergebnissen der LPS-Analyse durch SDS-PAGE zu urteilen, nur zur Restauration des Lipid A/ Kern OS-Komplexes, ohne eine O Antigen-Anheftung zu erlauben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Wav-Genprodukte durch ihre Expression in trans nur einen Teil der ursprünglichen Aktivität im Vergleich zum Wt besaßen. Dies könnte zum Ausbleiben einzelner Reaktionen, insbesondere der letzten Schritte, in der Kern OS-Biosynthese führen. Die weitgehend korrekte Synthese des Kern OS ist aber für die O Antigen-Anheftung essentiell. Das Phänomen der unvollständigen Wiederherstellung des wildtypischen Zustands konnte in dieser Arbeit gelegentlich beobachtet werden. So deutet beispielsweise die intensiv gefärbte Lipid A/ Kern OS-Bande der Mutante P27359 $\Delta$ 1wavL, welche WavL in trans exprimiert (Abb. IV.7, Spur 3), darauf hin, dass ein Teil der Lipid A/ Kern OS-Komplexe weiterhin kein O Antigen besitzt.

Durch Einbringen des *wbf*-Genclusters von O139 in P27459 $\Delta$ wbe konnte die Synthese und die Anheftung des O139 Antigens beobachtet werden. Obwohl auch eine Komplementation durch Expression des eigenen *wbe*-Genclusters in trans möglich war, wurde jedoch keines der zahlreichen O Antigene aus anderen Gram<sup>-</sup> Bakterien (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. anguillarum*, *S. enterica* sv. Borreze und *Y. enterocolitica*) in P27459 $\Delta$ wbe an das LPS angeheftet. Dagegen können diese O Antigene in *E. coli* exprimiert und auf den Lipid A/ Kern OS-Komplex transferiert werden (4, 8, 21, 103, 132, 276). Alle drei bisher bekannten Biosynthese-/ Transportsysteme für O Antigene waren durch diese O Antigen-Gencluster vertreten. So ist beispielsweise das O Antigen von *Y. enterocolitica* O:8 Wzy-abhängig (21), während die O Antigene von *K. pneumoniae* O1 und *V. anguillarum* O2 zu den ABC-Transporter-abhängigen gerechnet werden (38, 247). Wie in der Einleitung bereits erwähnt stellt das O:54 Antigen von *S. enterica* sv. Borreze bisher den einzigen Vertreter des Synthase-abhängigen Systems dar (132, 215). *E. coli* ist in der Lage, alle drei Transportsysteme zu exprimieren. Daher können hier problemlos fremde O Antigene durch Einbringen und Expression des entsprechenden O Antigen-Biosynthesegenclusters in den periplasmatischen Raum transportiert werden. In einigen Fällen könnten die fehlgeschlagenen Versuche O Antigene aus anderen Bakterien in *V. cholerae* zu exprimieren auf den ausbleibenden Transport des fremden O Antigens in *V. cholerae* zurückzuführen sein. Allerdings wurde für einzelne Systeme bereits gezeigt, dass die Transporter ebenfalls in den O Antigen-Biosynthesegenclustern kodiert sind und dadurch auf den klonierten Bereichen in den verwendeten Expressionsplasmiden liegen (8, 132, 247). Ein Transportproblem dieser O

Antigene in *V. cholerae* ist somit eher auszuschließen. Möglicherweise fehlen *V. cholerae* die notwendigen Zuckervorläufer für die Biosynthese der verschiedenen O Antigene. In der Tat sind bei den in ihrer Struktur bekannten O Antigenen diverse ungewöhnliche Zucker zu finden. Es ist nach bisherigem Erkenntnisstand nicht abzuleiten, ob die Enzyme für die vollständige Synthese und Aktivierung dieser Zucker in den einzelnen *wb\**-Genclustern kodiert sind. Jedoch bleibt festzuhalten, dass *E. coli* all diese O Antigene synthetisieren und damit auch die aktivierten Zuckervorläufer bereitstellen kann. Eine weitere Schwierigkeit könnte sich durch die Startreaktion der O Antigen-Biosynthese ergeben. Sie wird über WecA bzw. WbaP oder ein entsprechendes Enzym katalysiert (215). Dabei kodieren diese Enzyme meist nicht im *wb\**-Gencluster, sondern in anderen Bereichen des Chromosoms, wie in *E. coli* und *S. enterica* sv. Typhimurium gezeigt (13, 227, 230). Bei *V. cholerae* konnte bislang weder ein WecA bzw. WbaP-Homolog, noch ein anderes Enzym, welches die Synthese am Und-P startet, identifiziert werden. WecA von *E. coli* scheint nicht sehr spezifisch zu sein, da es z. B. auch die Polymerisation des O:8 Antigens von *Y. enterocolitica* initiieren kann (284). Diese unspezifische Eigenschaft von *wecA* könnte die problemlose Expression diverser O Antigene in *E. coli* erklären. Durch eine zusätzliche Expression von WecA aus *E. coli* in *V. cholerae* würde es zur Konkurrenz um den Carrier Und-P durch WecA und das entsprechende Enzym von *V. cholerae* kommen. Es erscheint daher sinnvoll, bei einem erneuten Versuch eines O Antigen-Austausches zunächst das Enzym der Startreaktion in *V. cholerae* zu deletieren. Dies ist aber erst möglich, wenn die Startreaktion der O Antigen-Synthese von *V. cholerae* im Detail aufgeklärt worden ist.

### **Das Zwei-Komponentensystem OsmRK**

Bakterien sind in ihrer Umwelt laufend Schwankungen in Temperatur, pH, Feuchtigkeit, Nahrungsangebot und anderen Parametern ausgesetzt. Gleiches gilt zudem für fakultativ pathogene Erreger beim Beginn der Infektion. Als natürliche Bewohner aquatischer Ökosysteme kommen *V. cholerae* Stämme in der Umwelt vor allem in den Mündungsgebieten von Flüssen vor. Diese Gebiete zeichnen sich u. a. durch ihren sich ständig ändernden Salzgehalt aus. Dadurch ist *V. cholerae* häufig Schwankungen in der Osmolarität ausgesetzt. Bislang ist jedoch über die physiologischen Anpassungen, mögliche Adaptationsmechanismen und Regulationssysteme von *V. cholerae* nur wenig bekannt.

Durch das in dieser Arbeit konstruierte Transposonsystem und die Etablierung einer Transposonmutagenese konnten 3600 stabile Transposonmutanten generiert werden, wobei

die Mehrzahl nur eine Transposoninsertion aufwies. Durch die Verwendung einer promotorlosen Resistenzkassette als Selektionsmarker wurden gezielt Mutanten erzeugt, bei denen das Transposon durch Insertion ins Chromosom unter die Kontrolle eines aktiven Promotors gelangt war. Die Suche nach Mutanten mit einem Wachstumsdefekt bei hoher Osmolarität führte zur Identifizierung von P27459*osmK::TncatpirkanR*. Dabei kodiert *osmK* eine putative Sensor-Histidinkinase und stellt wahrscheinlich mit dem im gleichen Operon kodierten putativen Regulator OsmR ein Zwei-Komponentensystem dar.

Der osmosensitive Phänotyp konnte sowohl für *osmK*- als auch für *osmR*-Mutanten in einer Wachstumskurve bestätigt werden. Da für die Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* im Vergleich zum Wt keine vermehrte Lyse unter erhöhten Salzkonzentrationen beobachtet wurde, handelt es sich um einen echten Wachstumsdefekt und nicht etwa um ein erhöhtes Absterben der Mutanten. Eine von A. Halscheidt durchgeführte Transkriptomanalyse von *osmR/ K*-Mutanten im Vergleich zum Wt P27459-S unter iso- und hypertonen Bedingungen identifizierte eine Reihe von deregulierten Genen (Daten nicht gezeigt). Allerdings stehen nach bisherigem Erkenntnisstand keine dieser Gene in direktem Zusammenhang mit Osmoadaptation oder Salzstress. Die Analysen lassen zwar vermuten, dass OsmRK teilweise in das ToxR-Regulon eingreift, wie beispielsweise für OmpU im Folgenden noch diskutiert wird, jedoch war weder für die *ompU*- noch für die *toxR*-Mutante ein Wachstumsdefekt bei hoher Osmolarität festzustellen.

In Anwesenheit von Betain und hoher Salzkonzentrationen konnte bei der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* im Vergleich zum Wt ein verzögertes Wachstum beobachtet werden. Womöglich ist die Aufnahme von Betain in der Mutante beeinträchtigt. Ein Zusammenhang mit der veränderten Expression von OmpU in *osmR/ K*-Mutanten ist jedoch auszuschließen, da eine Wachstumsverzögerung weder bei der *ompU*-, noch bei der *toxR*-Mutante auftrat (Daten nicht gezeigt). Es bleibt festzuhalten, dass P27459*osmK::TncatpirkanR* einerseits Ectoin endogen synthetisieren, andererseits exogenes Betain aufnehmen kann. Damit sind die beiden wichtigsten Adaptationsmechanismen gegenüber hypertonen Bedingungen in *V. cholerae* noch intakt (210). Die Grundlage des Wachstumsdefekts von *osmR/ K*-Mutanten unter hypertonen Bedingungen ist also nach wie vor unklar.

Bioinformatische Analysen deckten die Homologie des Zwei-Komponentensystems OsmRK zu EnvZ/ OmpR auf. Das EnvZ/ OmpR-System reguliert beispielsweise in Abhängigkeit der Osmolarität die Expression der Porine OmpC und OmpF in *E. coli* (65), kontrolliert aber auch

die Expression von Virulenzfaktoren in *S. flexneri* und *S. typhimurium* (26, 74). Die Transkriptomanalysen von A. Halscheidt wiesen auf eine Deregulation von OmpU in den *osmR/ K*-Mutanten unter hypertonen Bedingungen hin. Die Repression von OmpU in den *osmR/ K*-Mutanten konnte sowohl durch eine Analyse der AM-Proteine als auch über eine Messung der PhoA-Aktivitäten von chromosomalen *ompU-phoA*-Fusionen bestätigt werden. Da ein Einfluss von OsmRK auf die Expression von OmpU in der Gegenwart von Protamin, welches eine andere Art von Membranstress verkörpert, nicht beobachtet werden konnte, scheint es sich dabei um eine spezifische Antwort auf hypertone Bedingungen zu handeln. Eine Regulation der AM-Proteine durch das bereits als EnvZ/ OmpR annotierte Zwei-Komponentensystem von *V. cholerae* war hingegen unter keiner der untersuchten Stressbedingungen festzustellen. Ebenso verhielt es sich mit dem auf Proteinebene zu OsmRK sehr ähnlichen Zwei-Komponentensystem VCA0257/ VCA0256. Mutationen in den Genen *envZ* und VCA0257, welche für die jeweiligen Sensor-Histidinkinasen der Systeme kodieren, führten zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums unter hypertonen Bedingungen. Daher haben diese Zwei-Komponentensysteme keine Funktion in der Osmoadaptation, noch wirken sie unter diesen Bedingungen regulatorisch auf die Proteine der AM.

Bislang ist ToxR als einziger Regulator zur Expression von OmpU bekannt (177). Das integrale Transmembranprotein ToxR enthält sowohl die Sensor- als auch die Regulatordomänen eines typischen Zwei-Komponentensystems und vereinigt somit beide Funktionen in einem Protein (71, 177). Dabei reguliert ToxR ähnlich zum EnvZ/ OmpR-System in *E. coli* die abundanten Porine der AM von *V. cholerae* invers. Während die Transkription von *ompU* durch ToxR aktiviert wird, reprimiert ToxR die Expression von OmpT (64, 152, 241). Analog zu dem Zwei-Komponentensystem EnvZ/ OmpR reagiert ToxR dabei nicht nur auf Änderungen in der Osmolarität, sondern auch auf andere Umweltsignale wie Temperatur und pH (66, 237). Diese und andere Arbeiten konnten demonstrieren, dass *toxR*-Mutanten u. a. nicht mehr in der Lage sind OmpU zu exprimieren (177). ToxS, welches mit ToxR in einem Operon kodiert, schützt ToxR vor Proteolyse und ist daher für dessen Stabilität verantwortlich (71, 209). Aufgrund der Topologie des membranständigen ToxS interagieren die beiden Proteine wahrscheinlich über ihre periplasmatischen Domänen. Punktmutationen im periplasmatischen Bereich von ToxS können zu einer vermehrten Proteolyse von ToxR führen (209). Allerdings zeigen *toxS*-Deletionsmutanten unter normalen Bedingungen keine erhöhte Proteolyse von ToxR (20). Ein ähnliches Phänomen kann für das TcpPH-System von *V. cholerae* beobachtet werden. Dieses Regulationssystem ist wie ToxRS

aus integralen Membranproteinen aufgebaut. Dabei schützt TcpH den Transkriptionsaktivator TcpP vor Proteolyse. Im Gegensatz zu ToxRS wird durch Deletion von TcpH der Regulator TcpP bereits unter normalen Bedingungen instabil (20).

Durch Einbeziehung einer *toxS*-Mutante in die Analysen der AM-Proteine wurde nachgewiesen, dass unter hypertonen Bedingungen eine Reduktion der OmpU-Bande im Vergleich zum Wt auftritt. Damit zeigten die *osmR/ K*- und *toxS*-Mutanten einen ähnlichen Phänotyp hinsichtlich OmpU. Allerdings war der Einfluss von ToxS auf OmpU nicht auf eine bestimmte Stressbedingung beschränkt. So war P27459 $\Delta$ *toxS* auch in Gegenwart von Protamin nicht in der Lage, ein wildtypisches Niveau von OmpU zu exprimieren. Daraus kann gefolgert werden, dass ToxS unter beiden untersuchten Bedingungen, möglicherweise sogar generell unter Stress, wichtig für die Stabilität von ToxR ist.

Unter Berücksichtigung aller bisherigen Analysen des *ompU*-Promotors (64) erscheint es unwahrscheinlich, dass neben ToxR ein weiterer Transkriptionsfaktor auf DNA-Ebene die Expression von OmpU aktiviert. Ferner zeigten Transkriptomanalysen im Vergleich zum Wt unter keiner Bedingung eine Veränderung in der Transkription von *toxR* oder *toxS* in den *osmR/ K*-Mutanten. Möglicherweise nimmt daher OsmRK über posttranslationale Regulation, ähnlich wie ToxS, Einfluss auf die Stabilität von ToxR und damit auch auf die Expression von OmpU. In *osmR/ K*-Mutanten würde dann unter hypertonen Bedingungen eine vermehrte Degradation von ToxR erfolgen, wodurch die Expression von OmpU und anderer ToxR-abhängiger Gene reduziert wird. Um diese These zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ToxR mit N-terminaler His-Tag Fusion exprimiert und aufgereinigt. Das gereinigte Protein wurde zur Produktion von Antikörpern gegen ToxR verwendet. Erste Western Blot-Analysen deuten tatsächlich darauf hin, dass ToxR in P27459*osmK::TncatpirkanR* ebenso wie in P27459 $\Delta$ *toxS* unter hypertonen Bedingungen degradiert wird, während es im Wt stabil bleibt (Daten nicht gezeigt). OsmRK könnte einerseits in seiner Funktion als Zwei-Komponentensystem ein Protein aktivieren, welches ToxR unter hypertonen Bedingungen schützt. Andererseits ist auch eine durch OsmRK vermittelte Repression der Protease denkbar, welche ToxR degradiert. In den Transkriptomanalysen konnten in der Tat durch OsmRK signifikant reprimierte putative Proteasen ermittelt werden. Dazu zählen die ATP-abhängigen Proteasen Clp (VC1922) und Lon (VC1920), die Protease II PtrB (VCA0063), PrtV (VCA0223) und eine putative Protease (VC0652). Da nach dem Modell die Proteolyse von ToxR auf der periplasmatischen Seite der CM erfolgt, ist eine Beteiligung der Proteasen Clp und Lon, die wie für *E. coli* gezeigt im

Cytoplasma lokalisiert sind (174), unwahrscheinlich. Dagegen besitzen nach bioinformatischen Analysen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) zufolge PtrB und PtrV putative Signalsequenzen, die einen Transport ins Periplasma ermöglichen könnten.

Eine erhöhte Proteasekonzentration könnte auch zur Degradation anderer Membranproteine und dadurch zur Destabilisierung der CM führen. Dies könnte eine Erklärung für den osmosensitiven Phänotyp der *osmR/ K*-Mutanten liefern. Weitere Experimente sind notwendig, um den Zusammenhang zwischen OsmRK und ToxR, sowie dem Wachstumsdefekt von *osmR/ K*-Mutanten unter hypertonen Bedingungen aufzuklären. Derzeit wird versucht OsmR mit His-Tag-Fusion zu exprimieren, um Bindestudien an den Zielpromotoren durchzuführen und so einen Einblick in das OsmRK-Regulon zu erhalten.

### **Degradation von HutA**

Bei dem Vergleich der AM-Profile von *V. cholerae* P27459-S und verschiedener Mutanten konnte eine Proteinbande von ca. 55kDa nur unter hypertonen Bedingungen detektiert werden, welche durch Sequenzierung als C-terminal verkürztes HutA identifiziert wurde. Die Sequenzanalysen und das Laufverhalten im PAA-Gel deuteten auf den Verlust von ca. 200 AS hin. Tatsächlich war diese Bande im AM-Profil der Mutante P27459 $\Delta$ *hutA* unter hypertonen Bedingungen nicht mehr nachzuweisen. HutA wurde bereits als Häm-Transporter charakterisiert und spielt somit bei der Eisenaufnahme eine wichtige Rolle (109). Durch eine chromosomale *hutA-phoA*-Fusion konnte demonstriert werden, dass die Transkription von *hutA* bei Erhöhung der Osmolarität des Mediums eher gesteigert wird. Weiterhin konnte durch die nahe dem 3'-Ende gelegene *phoA*-Fusion bewiesen werden, dass die kürzere Form von HutA nicht durch ein verkürztes Transkript infolge eines alternativen Terminators zustande kommt. Daher scheint HutA unter hypertonen Bedingungen proteolytisch prozessiert zu werden. Diese Prozessierung findet in allen untersuchten Mutanten (*osmR/ K*, *toxR/ S*, *envZ*, VCA0257) statt und ist daher von den in dieser Arbeit untersuchten Systemen unabhängig. Da ansonsten keine signifikanten Veränderungen im AM-Profil auftraten, kann von einer spezifischen Prozessierung von HutA ausgegangen werden. Nimmt man eine Lokalisation des C-terminalen Endes von HutA im Periplasma an, könnten dafür einige periplasmatische Proteasen verantwortlich sein: In *V. cholerae* sind mit DegS (VC0565) und HtrA (VC0566) Mitglieder der HtrA-Familie (204), benannt nach dem bekanntesten Vertreter HtrA (auch als DegP oder Do bezeichnet) aus *E. coli*, bereits annotiert worden. Mutationen in *htrA* führen in *E. coli* zu temperatursensitiven Mutanten (154, 246).

Dabei wird HtrA eine Funktion beim Abbau von denaturierten periplasmatischen Proteinen zugesprochen (245, 246). Das aus mehreren Monomeren aufgebaute native Enzym wird aufgrund seiner Größe von bis zu 500 kDa durch einen osmotischen Schock nicht freigesetzt (252). Daher könnte es durchaus an einer zellulären Antwort auf erhöhte Salzkonzentrationen beteiligt sein. In *E. coli* führt Membranstress über die Degradation des integralen Membranproteins der CM RseA durch DegS zur Freisetzung des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^E$ , welcher zuvor auf der cytoplasmatischen Seite an RseA gebunden vorliegt (1). Die Freisetzung von  $\sigma^E$  erlaubt die Aktivierung des RpoE-Regulons, was eine zelluläre Antwort auf Membranstress darstellt. Zu diesem Regulon gehört u. a. auch die Protease HtrA (155). Für *Listeria monocytogenes* wurde kürzlich gezeigt, dass eine Mutation in *htrA* u. a. zu einem Wachstumsdefekt unter hypertonen Bedingungen führt (278). Eine weitere periplasmatische Protease (VC1496) von *V. cholerae* wurde als Prc-Homolog annotiert. Diese Protease wird auch als „tail-specific protease“ Tsp bezeichnet, da sie viele Proteine am C-terminalen Ende degradiert (102, 174, 234). Auch dieser Protease wird eine Funktion bei osmotischem und thermalem Stress zugesprochen, da *prc*-Mutanten in *E. coli* Wachstumsstörungen unter diesen Stressbedingungen zeigen (102). Möglicherweise wird der C-terminale Bereich von ToxR im Periplasma ebenfalls von einer dieser Protease degradiert, obwohl die Microarray-Analysen keine Deregelation der Transkription von *prc* oder *degS* in *osmR*/*K*-Mutanten aufzeigten. Interessant ist, dass sich unter den in dieser Arbeit sequenzierten Transposonmutanten, welche einen Wachstumsdefekt auf LB-Agarplatten mit 900 mM NaCl aufwiesen, sowohl eine *prc*- als auch eine *hutA*-Mutante befand. Der Wachstumsdefekt konnte jedoch für P27459 $\Delta$ *hutA* in einer Wachstumskurve in M9-Medium unter hypertonen Bedingungen nicht bestätigt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion dieser Proteine, insbesondere in Bezug auf osmotischen Stress, besser zu verstehen. Bei der Erforschung der zellulären Antwort auf osmotische Veränderungen stehen wir bei *V. cholerae* noch am Anfang.

## VI Literaturverzeichnis

1. **Ades, S. E., L. E. Connolly, B. M. Alba, and C. A. Gross.** 1999. The *Escherichia coli*  $\sigma^E$ -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- $\sigma$ -factor. *Genes Dev.* **13**:2449-2461.
2. **Albert, J. B., A. K. Siddique, M. S. Islam, A. S. G. Faruque, M. Anzarzaman, S. M. Faruque, and R. Sack.** 1993. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* **341**:704.
3. **Aldova, E., K. Laznickova, E. Stepankova, and J. Lietava.** 1968. Isolation of nonagglutinable vibrios from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. *J. Infect. Dis.* **118**:25-31.
4. **al-Hendy, A., P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1991. Expression cloning of *Yersinia enterocolitica* O:3 *rfb* gene cluster in *Escherichia coli* K12. *Micob. Pathog.* **10**:47-59.
5. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. J., Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
6. **Amann, E., B. Ochs, and K. J. Abel.** 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301-315.
7. **Amor, K., D. Heinrichs, E. Fridrich, K. Ziebell, R. Johnson, and C. Whitfield.** 2000. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**:1116-1124.
8. **Amor, P. A., and L. M. Mutharia.** 1995. Cloning and expression of *rfb* genes from *Vibrio anguillarum* serotype O2 in *Escherichia coli*: evidence for cross-reactive epitopes. *Infect. Immun.* **63**:3537-3542.
9. **Andoh, A., Y. Fujiyama, H. Sakumoto, H. Uchihara, T. Kimura, S. Koyama, and T. Bamba.** 1998. Detection of complement C3 and factor B gene expression in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Clin. Exp. Immunol.* **111**:477-83.
10. **Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, and R. Ramphal.** 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar Cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**:1000-1007.
11. **Attridge, S. R., A. Fazeli, P. A. Manning, and U. H. Stroehrer.** 2001. Isolation and characterization of bacteriophage-resistant mutants of *Vibrio cholerae* O139. *Microb. Pathog.* **30**:237-46.
12. **Attridge, S. R., P. A. Manning, J. Holmgren, and G. Jonson.** 1996. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infect. Immun.* **64**:3369-3373.
13. **Bachmann, B. J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
14. **Banwell, J. G., N. F. Pierce, R. C. Mitra, G. J. Brigham, G. J. Caranasos, R. J. Keimowitz, D. S. Fedson, J. Thomas, S. L. Gorbach, R. B. Sack, and A. Mondal.** 1970. Intestinal fluid and electrolyte transport in human cholera. *J. Clin. Invest.* **49**:183-195.
15. **Barondess, J. J., and J. Beckwith.** 1995. *bor* gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J. Bacteriol.* **177**:1247-53.
16. **Barua, D.** 1991. History of cholera, p. 1-35. *In* D. Barua and W. B. Greenough III (ed.), *Cholera*. Plenum Medical Book Company, New York.
17. **Bashkaran, K.** 1959. A study of antigenic variation in *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* **23**:47-54.
18. **Bauer, M. E., and R. A. Welch.** 1997. Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **65**:2218-2224.
19. **Bayer, M. E.** 1979. The fusion sites between outer and cytoplasmic membrane of bacteria : their role in membrane assembly and virus infection.,p. 167-202. *In* M. Inouye (ed.), *Bacterial outer membranes*. John Wiley and Sons Inc., New York.
20. **Beck, N. A., E. S. Krukonis, and V. J. DiRita.** 2004. TcpH influences virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by inhibiting degradation of the transcription activator TcpP. *J. Bacteriol.* **186**:8309-8316.
21. **Bengochea, J. A., E. Pinta, T. Slamien, C. Oertelt, O. Holst, J. Radziejewska-Lebrecht, Z. Piotrowska-Seget, R. Venho, and M. Skurnik.** 2002. Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O Antigen-olymerease of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J. Bacteriol.* **184**:4277-4287.
22. **Benitez, J. A., R. G. Spelbrink, A. Silva, T. E. Phillips, C. M. Stanley, M. Boesman-Finkelstein, and R. A. Finkelstein.** 1997. Adherence of *Vibrio cholerae* to cultured differentiated human intestinal cells: an in vitro colonization model. *Infect. Immun.* **65**:3474-3477.
23. **Bennish, M. L.** 1994. Cholera: pathophysiology, clinical features, and treatment, p. 229-255. *In* K. I. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsik (ed.), *Vibrio cholerae* and Cholera: molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D.C.



24. **Benz, R., and K. Bauer.** 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of Gram-negative bacteria. review on bacterial porins. *Eur. Biol. Chem.* **176**:1-19.
25. **Berche, P., C. Poyart, E. Abachin, H. Lelievre, J. Vandepitte, A. Dodin, and J. M. Fournier.** 1994. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **170**:701-704.
26. **Bernadini, M. L., A. Fontaine, and P. J. Sansonetti.** 1990. The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**:6274-6281.
27. **Bik, E. M., A. E. Bunschoten, R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1995. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.* **14**:209-216.
28. **Bik, E. M., A. E. Bunschoten, R. J. Willems, A. C. Chang, and F. R. Mooi.** 1996. Genetic organization and functional analysis of the *otn* DNA essential for cell-wall polysaccharide synthesis in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* **20**:799-811.
29. **Bik, E. M., R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1996. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1453-1461.
30. **Bina, J., J. Zhu, M. Dziejman, S. Faruque, S. Calderwood, and J. J. Mekalanos.** 2003. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**:2801-2806.
31. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
32. **Blake, P. A.** 1983. *Vibrios* on the half-shell: What the walrus and carpenter didn't know. *Ann. Intern. Med.* **99**:558-559.
33. **Blake, P. A., R. E. Weaver, and D. G. Hollis.** 1980. Disease of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:341-367.
34. **Bos, M. P., B. Tefsen, J. Guertsen, and J. Tommassen.** 2004. Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:9417-9422.
35. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
36. **Braun, V., and H. Wolff.** 1970. The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **14**:387-391.
37. **Broadly, K. N., E. T. Rietschel, and O. Lüderitz.** 1981. The chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae*. *Eur. J. Biochem.* **115**:463-468.
38. **Bronner, D., B. R. Clarke, and C. Whitfield.** 1994. Identification of an ATP-binding cassette transport system required for translocation of lipopolysaccharide O-antigen side-chains across the cytoplasmic membrane of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *Mol. Microbiol.* **14**:505-519.
39. **Brown, A. D.** 1986. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**:803-840.
40. **Calamita, G., W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino, and P. Agre.** 1985. Molecular cloning and characterization of a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:29063-29066.
41. **Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**:2796-2801.
42. **Carlone, A. C. Y., L. T. Myrtle, H. S. Rumschlag, and F. O. Sottner.** 1986. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus*-species. *J. Clin. Microbiol.* **24**:330-332.
43. **Carroll, P. A., K. T. Tashima, M. B. Rogers, V. J. DiRita, and S. B. Calderwood.** 1997. Phase variation in *tcpH* modulates expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **25**:1099-1111.
44. **Cash, R. A., S. I. Music, J. P. Libonati, M. J. Snyder, R. P. Wenzel, and R. B. Hornick.** 1974. Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum. *J. Infect. Dis.* **129**:45-52.
45. **Chakrabarti, S. R., K. Chaudhuri, K. Sen, and J. Das.** 1996. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and Characterization of OmpU. *J. Bacteriol.* **178**:524-530.
46. **Champion, G. A., M. N. Neely, M. A. Brennan, and V. J. DiRita.** 1997. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol. Microbiol.* **23**:323-331.
47. **Chatterjee, A. N., and K. Chaudhuri.** 2003. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* II. Genetics of biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1690**:93-109.
48. **Chatterjee, S. N., and K. Chaudhuri.** 2003. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1639**:65-79.
49. **Chiang, S. L., and J. J. Mekalanos.** 1999. *rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. *Infect. Immun.* **67**:976-980.

50. **Chiavelli, D. A., J. W. Marsh, and R. K. Taylor.** 2001. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3220-3225.
51. **Chongsa-nguan, M., W. Chaicumpa, P. Moolasart, P. Kandhasingha, T. Shimada, H. Kurazono, and Y. Takeda.** 1993. *Vibrio cholerae* O139 in Bangkok. *Lancet* **342**:430-431.
52. **Colwell, R. R.** 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* **274**:2025-2031.
53. **Colwell, R. R., J. Kaper, and S. W. Joseph.** 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* **198**:394-396.
54. **Comstock, L. E., J. A. Johnson, J. M. Michalski, J. G. Morris, and J. B. Kaper.** 1996. Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1. *Mol. Microbiol.* **19**:815-826.
55. **Connell, T. D., D. J. Metzger, J. Lynch, and J. P. Folster.** 1998. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**:5591-5600.
56. **Control, C. f. D.** 1991. Cholera associated with imported frozen coconut milk-Maryland, 1991. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **40**:844-845.
57. **Control, C. o. D.** 1993. Imported cholera associated with a newly described toxigenic O139 strain. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **42**:501-503.
58. **Correa, N. E., C. M. Lauriano, R. McGee, and K. E. Klose.** 2000. Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. *Mol. Microbiol.* **35**:743-755.
59. **Coutinho, P. M., E. Deleury, G. J. Davies, and B. Henrissat.** 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**:307-317.
60. **Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. K. Ghosh, R. A. Paupit, J. N. Jansonius, and J. P. Rosenbusch.** 1992. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature* **358**:727-733.
61. **Cox, A. D., J. R. Brisson, P. Thibault, and M. B. Perry.** 1997. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* serotype O22. *Carbohydr. Res.* **304**:191-208.
62. **Cox, A. D., J. R. Brisson, V. Varma, and M. B. Perry.** 1996. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* O139. *Carbohydr. Res.* **290**:43-58.
63. **Cox, A. D., and M. B. Perry.** 1996. Structural analysis of the O-antigen-core region of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* O139. *Carbohydr. Res.* **290**:59-65.
64. **Crawford, J. A., J. B. Kaper, and V. J. DiRita.** 1998. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **29**:235-246.
65. **Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress. *Micrbiol. Rev.* **53**:121-147.
66. **Csonka, L. N., and A. D. Hanson.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:569-606.
67. **Dalsgaard, A., O. Serichantalergs, A. Forslund, W. Lin, J. Mekalanos, E. Mintz, T. Shimada, and J. G. Wells.** 2001. Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the CTX phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4086-92.
68. **Daniels, C., C. Vindurampulle, and R. Morona.** 1998. Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). *Mol. Microbiol.* **28**:1211-1222.
69. **Datensko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640-6645.
70. **de Cock, H., and J. Tommassen.** 1996. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**:5567-5573.
71. **DiRita, V. J., and J. J. Mekalanos.** 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* **64**:29-37.
72. **DiRita, V. J., M. Neely, R. K. Taylor, and P. M. Bruss.** 1996. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7991-7995.
73. **Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper.** 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* **59**:4310-4317.
74. **Dorman, C. J., S. Chatfield, C. F. Higgins, C. Hayward, and G. Dougan.** 1989. characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella thyphimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **57**:2136-2140.
75. **Dziejman, M., and J. J. Mekalanos.** 1994. Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage lambda repressor. *Mol. Microbiol.* **13**:485-494.

76. **Echeverria, P., B. A. Harrison, C. Tirapat, and A. McFarland.** 1983. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:32-6.
77. **Elliott, T., and J. R. Roth.** 1988. Characterization of Tn10d-Cam : A transposition-defective Tn10 specifying chloramphenicol resistance. *Mol. Gen. Genet.* **213**:332-338.
78. **Epstein, P. R.** 1993. Algae blooms in the spread and persistence of cholera. *Biosystems* **31**:209-221.
79. **Epstein, W.** 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**:73-78.
80. **Ernst, R. K., T. Guine, and S. I. Miller.** 1999. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J. Infect. Dis.* **179**:326-30.
81. **Faruque, M. S., N. Chowdhury, M. Kamruzzaman, Q. S. Ahmad, A. S. Faruque, M. A. Salam, T. Ramamurthy, G. B. Nair, A. Weintraub, and D. A. Sack.** 2003. Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. *Emerging Infect. Dis.* **9**:1116-1122.
82. **Faruque, S. M., M. J. Albert, and J. J. Mekalanos.** 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **62**:1301-1314.
83. **Favre, D., C. J. Stanley, and J.-F. Viret.** 1996. Construction and Characterization of a potential Live Oral Vaccine against *Vibrio cholerae* O139. *Infect. Immun.* **64**:3565-3570.
84. **Favre-Bonte, S., B. Joly, and C. Forestier.** 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:554-561.
85. **Finkelstein, R. A., M. Boesman-Finkelstein, and P. Holt.** 1983. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibronectin and ovomucin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1092-1095.
86. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **61**:136-169.
87. **Franzon, V. F., A. Baker, and P. A. Manning.** 1993. Nucleotide sequence and construction of a mutant in the mannose-fucose-resistant hemagglutinin (MFRHA) of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* **61**:3032-3037.
88. **Fullner, K. J., and J. J. Mekalanos.** 1999. Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor Biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **67**:1393-1404.
89. **Galinski, E. A., and H. G. Trüper.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microb. Lett.* **15**:95-108.
90. **Gardener, A. D., and K. V. Ventatraman.** 1935. The antigens of the cholera group of vibrios. *J. Hyg.* **25**:262-282.
91. **Genevrois, S., L. Steeghs, P. Roholl, J. J. Letesson, and P. van der Ley.** 2003. The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J.* **22**:1780-1789.
92. **Goldberg, M. B., S. A. Boyko, and S. B. Calderwood.** 1991. Transcriptional regulation of an iron-regulated virulence gene in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1125-1129.
93. **Griffiths, G. L., S. P. Sigel, S. M. Payne, and J. B. Neilands.** 1984. Vibrobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* **259**:383-385.
94. **Grimberg, J., S. Maguire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *Escherichia coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:8893.
95. **Guerinot, M. L.** 1994. Microbial iron transport. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**:743-772.
96. **Guidolin, A., G. Morelli, M. Kamke, and P. A. Manning.** 1984. *Vibrio cholerae* bacteriophage CP-T1: characterization of bacteriophage DNA and restriction analysis. *J. Virol.* **51**:163-169.
97. **Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**:1171-1182.
98. **Guzman, L.-M., D. Beblin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-4130.
99. **Haas, R., and M. Hensel.** 2000. Defensive Pathogenitätsfaktoren, p. 71-81. In J. Hacker and J. Heesemann (ed.), *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
100. **Hall, R. H., F. M. Khambaty, M. Kothary, and S. P. Keasler.** 1993. Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Lancet* 1993 **342**:430.
101. **Hanahan, D.** 1993. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-80.
102. **Hara, H., Y. Yamamoto, A. Higashitani, H. Suzuki, and Y. Nishimura.** 1991. Cloning, mapping and characterization of the *Escherichia coli* *prc* gene, which is involved in C-terminal processing of the penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* **173**:4799-4813.
103. **Haraguchi, G. E., U. Zahringer, B. Jann, K. Jann, R. A. Hull, and S. I. Hull.** 1991. Genetic characterization of the O4 polysaccharide gene cluster from *Escherichia coli*. *Micob. Pathog.* **10**:351-361.

104. Häse, C. C., and J. J. Mekalanos. 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:730-734.
105. Hayashi, S., and H. Wu. 1990. Lipoproteins in bacteria. J. Bioenerg. Biomembr. **22**:451-471.
106. Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, e. K. Hickey, J. D. Peterson, U. L., S. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, d. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishman, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature **406**:477-483.
107. Heinrichs, D. E., M. A. Monteiro, M. B. Perry, and C. Whitfield. 1998. The assembly system for the lipopolysaccharide R2 core-type of *Escherichia coli* is a hybrid of those found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*. J. Biol. Chem. **273**:8849-8859.
108. Heinrichs, D. E., J. A. Yethon, and C. Whitfield. 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Mol. Microbiol. **30**:221-232.
109. Henderson, D. P., and S. M. Payne. 1994. Characterization of the *Vibrio cholerae* outer membrane heme transport protein HutA: sequence of the gene, regulation of expression, and homology to the family of TonB-dependent proteins. J. Bacteriol. **176**:3269-3277.
110. Herrington, D. A., R. H. Hall, G. Losonsky, J. J. Mekalanos, R. K. Taylor, and M. M. Levine. 1988. Toxin, toxin-coregulated pili and the *toxR* regulation are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. J. Exp. Med. **168**:1487-1492.
111. Higa, N., Y. Honma, J. M. Albert, and M. Iwanaga. 1993. Characterization of *Vibrio cholerae* O139 synonym bengal isolated from patients with cholera-like disease in Bangladesh. Microbiol. Immunol. **37**:971-974.
112. Higgins, D. E., and V. J. DiRita. 1994. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. **14**:17-29.
113. Hirota, Y., H. Suzuki, Y. Nishimura, and S. Yasuda. 1977. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. Proc. Acad. Nat. Sci. USA **74**:1417-1420.
114. Hofmann, A. F. 1998. Bile secretion and the enterohepatic circulation of bile acids., p. 937-948. In M. Feldman, B. F. Scharschmidt, and M. H. Sleisenger (ed.), Gastrointestinal and liver disease. Saunders Co., W.B., Philadelphia, Pa.
115. Huq, A., R. R. Colwell, R. Rahmann, A. Ali, M. A. R. Chowdhury, S. Parveen, D. A. Sack, and R. Russek-Chohen. 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2370-2373.
116. Isenberg, H. D. 1988. Pathogenicity and virulence: another view. Clin. Microbiol. Rev. **1**:40-53.
117. Islam, M. S., B. S. Drasar, and R. B. Sack. 1994. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. J. Diarrhoel. Dis. **12**:87-96.
118. Ito, T., T. Higuchi, M. Hirobe, K. Hiramatsu, and T. Yokota. 1994. Identification of a novel sugar, 4-amino-4,6-dideoxy-2-O-methylmannose in the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. Carbohydr. Res. **256**:113-128.
119. Iwanaga, M., K. Yamamoto, N. Higa, Y. Ichinose, N. Nakasone, and M. Tanabe. 1986. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. **30**:1075-1083.
120. Johnson, J. A., C. A. Salles, P. Panigrahi, M. J. Albert, A. Wright, R. J. Johnson, and J. G. J. Morris. 1994. *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. Infect. Immun. **62**:2108-2110.
121. Joiner, K. A. 1985. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing and the mechanism of action of bactericidal antibody. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **121**:99 - 133.
122. Joseph, S. W., R. R. Colwell, and J. B. Kaper. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. Crit. Rev. Microbiol. **10**:77-110.
123. Kamio, Y., and H. Nikaido. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. Biochemistry **15**:2561-2570.
124. Kaniuk, N. A., E. Vinogradov, and C. Whitfield. 2004. Investigation on the structural requirements in the lipopolysaccharide core acceptor for ligation of O antigens in the genus *Salmonella*: WaaL "ligase" is not the sole determinant of acceptor specificity. J. Biol. Chem. **279**:36470-36480.
125. Kaper, J. B., A. Fasano, and M. Trucksis. 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*., p. 145-176. In K. Wachsmuth, P. A. Blake, and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and Cholera. ASM Press, Washington DC 20005.
126. Kaper, J. B., J. G. Morris Jr., and M. M. Levine. 1995. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. **8**:48-86.

127. **Kapfhammer, D., A. Kraiss, S. Evers, and J. Reidl.** 2002. The complete nucleotide sequence of bacteriophage K139 of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **184**:6592-6601.
128. **Karaolis, D. K., J. A. Johnson, C. C. Bailey, E. C. Boedeker, J. B. Kaper, and P. R. Reeves.** 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3134-9.
129. **Karaolis, D. K., R. Lan, and P. R. Reeves.** 1994. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *Vibrio cholerae* isolates. *J. Bacteriol.* **176**:6199-6206.
130. **Karaolis, D. K., R. Lan, and P. R. Reeves.** 1995. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxicogenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **177**:3191-3198.
131. **Kay, B. A., A. B. Cheryl, and J. G. Wells.** 1994. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens., p. 3-25. *In* K. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and Cholera. ASM Press, Washington, D.C.
132. **Keenleyside, W. J., and C. Whitfield.** 1996. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Biol. Chem.* **271**:28581-28592.
133. **Kempf, B., and E. Bremer.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**:319-330.
134. **Kenne, L., B. Lindberg, P. Unger, B. Gustafsson, and T. Holme.** 1982. Structural studies of the *Vibrio cholerae* O-antigen. *Carbohydr. Res.* **100**:341-349.
135. **Kirn, T. J., M. J. Lafferty, C. M. P. Sandoe, and R. K. Taylor.** 2000. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **35**:896-910.
136. **Klose, K. E., and J. J. Mekalanos.** 1998. Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol. Microbiol.* **28**:501-520.
137. **Knirel, Y. A., L. Paredes, P.-E. Jansson, A. Weintraub, G. Widmalm, and M. J. Albert.** 1995. Structure of the capsular polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal containing D-galactose-4,6-cyclophosphate. *Eur. J. Biochem.* **232**:391-396.
138. **Knirel, Y. A., S. N. Senchenkova, P. E. Jansson, and A. Weintraub.** 1998. More on the structure of *Vibrio cholerae* O22 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **310**:117-9.
139. **Knirel, Y. A., G. Widmalm, S. N. Senchenkova, P.-E. Jansson, and A. Weintraub.** 1997. Structural studies on the short-chain lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *Eur. J. Biochem.* **247**:402-410.
140. **Koch, R.** 1884. An address on cholera and its bacillus. *Br. Med. J.* **2**:403-407.
141. **Kolter, R., M. Inuzuka, and D. R. Helinski.** 1978. Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell* **15**:1199-1208.
142. **Kovach, M. E., M. D. Shaffer, and K. M. Peterson.** 1996. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **142**:2165-2174.
143. **Kovacikova, G., and K. Skorupski.** 2001. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* *tcpPH* promoter. *Mol. Microbiol.* **41**:393-407.
144. **Kovacikova, G., and K. Skorupski.** 2002. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter. *Mol. Microbiol.* **46**:1135-1147.
145. **Kovacikova, G., and K. Skorupski.** 1999. A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the *tcpPH* Promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *J. Bacteriol.* **181**:4250-4256.
146. **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-32.
147. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
148. **Lee, A. K., C. S. Detweiler, and S. Falkow.** 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **182**:771-781.
149. **Lee, S. H., D. L. Hava, M. K. Waldor, and A. Camilli.** 1999. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell* **99**:625-634.
150. **Lesuffleur, T. A., A. Barbat, E. Dussaulx, and A. Zweibaum.** 1990. Growth adaptation to methotrexate of HT-29-MTX human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* **50**:6334-6343.
151. **Levina, N., S. Töttemeyer, N. R. Stokes, P. Louis, and M. A. Jones.** 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J.* **19**:1730-1737.
152. **Li, C. C., J. A. Crawford, V. J. DiRita, and J. B. Kaper.** 2000. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **35**:189-203.

153. **Lin, M. C., W. H. Stein, and S. Moore.** 1968. Further studies on the alkylation of the histidine residues at the active site of pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **10**:6167-6170.
154. **Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird, and C. Georgopoulos.** 1989. Identification, characterization and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose gene product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **171**:1574-1584.
155. **Lipinska, B., S. Sharma, and C. Georgopoulos.** 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* **16**:10053-10067.
156. **Mäkelä, P. H., and A. D. Stocker.** 1984. Genetics of lipopolysaccharide, p. 59-137. *In* R. E. D. (ed.), *Handbook of Endotoxin*, Vol. I. Chemistry of Endotoxin. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
157. **Mallow, E. B., A. Harris, N. Salzman, J. P. Russell, R. J. DeBerardinis, E. Ruchelli, and C. L. Bevins.** 1996. Human enteric defensins. *J. Biol. Chem.* **271**:4038-4045.
158. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
159. **Manning, P. A., U. H. Stroehrer, L. E. Karageorgos, and J. K. Morona.** 1995. Putative O-antigen transport genes within the *rfb* region of *Vibrio cholerae* O1 are homologues to those of capsule transport. *Gene* **158**:1-7.
160. **Manning, P. A., U. H. Stroehrer, and R. Morona.** 1994. Molecular basis for O-Antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba switching., p. 77-94. *In* K. I. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and Cholera: molecular to global perspectives. ASM, Washington D.C.
161. **Manoil, C.** 1991. Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and  $\beta$ -galactosidase gene fusion. *Meth. Cell. Biol.* **34**:61-75.
162. **Manoil, C., N. Sinha, and B. Alberts.** 1977. Intracellular DNA-protein complexes from bacteriophage T4-infected cells isolated by a rapid two-step procedure. Characterization and identification of the protein components. *J. Biol. Chem.* **252**:2734-41.
163. **Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, A. R. Panchenko, B. S. Rao, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin, and S. H. Bryant.** 2003. "CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments". *Nucleic Acids Res.* **31**:383-387.
164. **Mathur, J., and M. K. Waldor.** 2004. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers to antimicrobial resistance. *Infect. Immun.* **72**:3577-3583.
165. **Matsuyama, S., T. Mizuno, and S. Mizushima.** 1986. Interaction between two regulatory proteins in osmoregulatory expression of *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*: a novel *ompR* mutation suppresses pleiotropic defects caused by an *envZ* mutation. *J. Bacteriol.* **168**:1309-1314.
166. **Medrano, A. I., V. J. DiRita, G. Castillo, and J. Sanchez.** 1999. Transient transcriptional activation of the *Vibrio cholerae* El Tor virulence regulator ToxT in response to culture conditions. *Infect. Immun.* **67**:2178-2183.
167. **Meibom, K. L., X. B. Li, A. T. Nielsen, C. Y. Wu, S. Roseman, and G. K. Schoolnik.** 2004. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:2524-2529.
168. **Meier-Dieter, U., K. Barr, R. Starman, I. Hatch, and P. D. Rick.** 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli rfe* gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the *rfe-rff* gene cluster. *J. Biol. Chem.* **167**:746-753.
169. **Meighen, E. A.** 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* **55**:123-124.
170. **Mekalanos, J. J., D. J. Swartz, G. D. Pearson, N. Harford, F. Groyne, and M. deWilde.** 1983. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**:551-557.
171. **Merrell, D. S., S. M. Butler, F. Qadri, A. Dolganov, A. Alam, M. B. Cohen, S. B. Calderwood, G. K. Schoolnik, and A. Camilli.** 2002. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* **417**:642-645.
172. **Mey, A. R., and S. M. Payne.** 2001. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol. Microbiol.* **42**:835-849.
173. **Michel, G., G. Ball, J. B. Goldberg, and A. Lazdunski.** 2000. Alteration of the lipopolysaccharide structure affects the functioning of the Xcp secretory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:696-703.
174. **Miller, C. G.** 1996. Protein degradation and proteolytic modification., p. 938-954. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C.
175. **Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

176. **Miller, K. J., E. P. Kennedy, and V. N. Reinhold.** 1986. Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**:48-51.
177. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-83.
178. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1984. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc. Acad. Nat. Sci. USA* **81**:3471-5.
179. **Morona, R., M. H. Brown, J. Yeadon, M. W. Heuzenroeder, and P. A. Manning.** 1991. Effect of lipopolysaccharide core synthesis mutations on the production of *Vibrio cholerae* O-antigen in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microb. Lett.* **82**:279-286.
180. **Morona, R., M. Mavris, A. Fallarino, and P. A. Manning.** 1994. Characterization of the *rfc* region of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **176**:733-747.
181. **Morris, J. G.** 1990. Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol. Rev.* **12**:179-91.
182. **Mukhopadhyay, A. K., S. Chakraborty, Y. Takeda, G. B. Nair, and D. E. Berg.** 2001. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **183**:4737-46.
183. **Mulford, C. A., and M. J. Osborn.** 1983. An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1159-1163.
184. **Mullis, K. B., and F. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**:335-340.
185. **Murley, Y. M., J. Behari, R. Griffin, and S. B. Calderwood.** 2000. Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* differ in timing of transcription of *tcpPH* during growth in inducing conditions. *Infect. Immun.* **68**:3010-3014.
186. **Nakae, T.** 1976. Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J. Biol. Chem.* **251**:2176-2178.
187. **Nalin, D. R.** 1976. Cholera, copepods, and chitinase. *Lancet* **7992**:958.
188. **Nesper, J.** 2000. Charakterisierung von spontan phagenresistenten *V. cholerae* O1 El Tor Mutanten: LPS-Struktur, Gal-Stoffwechsel, Virulenzeigenschaften und Biofilmbildung. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
189. **Nesper, J., J. Blaß, M. Fountouloakis, and J. Reidl.** 1999. Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion and integration. *J. Bacteriol.* **181**:2902-2913.
190. **Nesper, J., D. Kapfhammer, K. E. Klose, H. Merkert, and J. Reidl.** 2000. Characterization of *Vibrio cholerae* O1-antigen as bacteriophage K139 receptor, and identification of *IS1004* insertions aborting O1-antigen biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**:5097-5104.
191. **Nesper, J., A. Kraiss, S. Schild, J. Blass, K. E. Klose, J. Bockemühl, and J. Reidl.** 2002. Comparative and genetic analysis of the putative *Vibrio cholerae* LPS core oligosaccharide biosynthesis (*wav*) gene cluster. *Infect. Immun.* **70**:2419-2433.
192. **Nesper, J., C. M. Lauriano, K. E. Klose, D. Kapfhammer, A. Kraiß, and J. Reidl.** 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide, colonization and biofilm-formation. *Infect. Immun.* **69**:435-445.
193. **Nesper, J., C. M. Lauriano, K. E. Klose, D. Kapfhammer, A. Kraiss, and J. Reidl.** 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**:435-445.
194. **Nesper, J., S. Schild, C. M. Lauriano, A. Kraiß, K. E. Klose, and J. Reidl.** 2002. Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **70**:5990-5996.
195. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **67**:593-656.
196. **Nikaido, H.** 1996. Outer Membrane, p. 29-47. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, second ed. ASM, Washington, D.C.
197. **Nikaido, H., P. Bavoil, and Y. Hirota.** 1977. Outer membrane of gram-negative bacteria. XV. Transmembrane diffusion rates in lipoprotein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **132**:1045-1047.
198. **Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
199. **Nobechi, K.** 1923. Immunological studies upon types of *Vibrio cholerae*. *Sci. Rep. Inst. Infect. Dis. Tokyo Univ.* **2**:43.
200. **Norioka, S., G. Ramakrishnan, K. Ikenaka, and M. Inouye.** 1986. Interaction of a transcriptional activator, *OmpR*, with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC*, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **36**:17113-17119.

201. **Ölschläger, T., and J. Hacker.** 2000. Proteinsekretionssysteme, p. 91-96. In J. Hacker and J. Heesemann (ed.), *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
202. **Olsthorn, M. M., B. O. Petersen, S. Schlecht, J. Havenkamp, and K. Bock.** 1998. Identification of a novel core type in *Salmonella* lipopolysaccharide. Complete structural analysis of the core region of the lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* sv. Arizonae O62. *J. Biol. Chem.* **273**:3817-3829.
203. **Organization, W. H.** 1995. Meeting on the potential role of new cholera vaccines in the revention and control of cholera outbreaks during acute emergencies. Document CDR/GPV/95.1. WHO. Geneva. Switzerland.
204. **Pallen, M. J., and B. W. Wren.** 1997. The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* **26**:209-221.
205. **Paul, S., K. Chaudhuri, N. Chatterjee, and J. Das.** 1992. Presence of exposed phospholipids in the outer membrane of *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:755-761.
206. **Pearson, G. D. N., A. Woods, S. L. Chiang, and J. J. Mekalanos.** 1993. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3750-3754.
207. **Peterson, J. W., and L. G. Ochoa.** 1989. Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science* **245**:857-859.
208. **Peterson, K. M., and J. J. Mekalanos.** 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **56**:2822-2829.
209. **Pfau, J. D., and R. K. Taylor.** 1998. Mutations in *toxR* and *toxS* that separate transcriptional activation from DNA binding at the cholera toxin gene promoter. *J. Bacteriol.* **180**:4724-4733.
210. **Pflughoeft, K. J., K. Kierek, and P. Watnick.** 2003. Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl. Env. Microbiol.* **69**:5919-5927.
211. **Pollizer, R.** 1959. Cholera, Monograph Series, No 43. Geneva, World Health Organization.
212. **Provenzano, D., and K. E. Klose.** 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:10220-10224.
213. **Provenzano, D., C. M. Lauriano, and K. E. Klose.** 2001. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* **183**:3652-3662.
214. **Provenzano, D., D. A. Schuhmacher, J. L. Barker, and K. E. Klose.** 2000. The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect. Immun.* **68**:1491-1497.
215. **Raetz, C. R., and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:635-700.
216. **Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles., p. 1035-1063. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C.
217. **Ramamurthy, T., S. Grag, and R. Sharma.** 1993. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* **341**:703-704.
218. **Reidl, J., and J. J. Mekalanos.** 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139 and use of a novel mini transposon to identify a phage-encoded virulence factor. *Mol. Microbiol.* **18**:685-701.
219. **Richards, F. M., and H. Wyckoff.** 1971. Bovine pancreatic ribonuclease, p. 647-806. In P. D. e. Boyer (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 4. Academic Press.
220. **Richardson, K.** 1991. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: Analysis of motility mutants in three animal models. *Infect. Immun.* **59**:2727-2736.
221. **Rick, P. D., G. L. Hubbard, and K. Barr.** 1994. Role of the *rfe* gene in the synthesis of the O8 antigen in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**:2877-2884.
222. **Rietschel, E. T., L. Brade, O. Holst, V. A. Kulshin, B. Lindner, A. P. Moran, U. Schade, U. Zähringer, and H. Brade.** 1990. Molecular structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity, p. 15-32. In A. Nowtny, J. J. Spitzer, and E. J. Ziegler (ed.), *Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
223. **Roeßler, M., and V. Müller.** 2001. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.* **3**:743-754.
224. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**:356.
225. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**:355.
226. **Rubin, E. J., W. Lin, J. J. Mekalanos, and M. K. Waldor.** 1998. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol. Microbiol.* **28**:1247-1254.
227. **Sanderson, K. E., and J. R. Roth.** 1988. Linkage map of *Salmonella thyphimurium*. Edition 7. *Microbiol. Rev.* **52**:485-532.
228. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.



229. **Schild, S.** 2002. Analysen zu LPS-Kernbiosynthese-Genprodukten bei *Vibrio cholerae*. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
230. **Schnaitman, C. A., and J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.
231. **Schuhmacher, D. A., and K. E. Klose.** 1999. Environmental signals modulate ToxT-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **181**:1508-1514.
232. **Service, P. H. L.** 1993. *Vibrio cholerae* O139 and epidemic cholera. *Commun. Dis. Rep. Weekly* **3**:173.
233. **Shukla, S. D., C. Green, and J. M. Turner.** 1980. Phosphatidylethanolamine distribution and fluidity in outer and inner membranes of the gram-negative bacterium *Erwinia carotova*. *Biochem. J.* **188**:133-135.
234. **Silber, K. R., C. K. Keiler, and R. T. Sauer.** 1992. Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:295-299.
235. **Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist.** 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory.
236. **Simonet, V. C., A. Basle, K. E. Klose, and A. H. Delcour.** 2003. The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties. *J. Biol. Chem.* **278**:17539-17545.
237. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **25**:1003-1009.
238. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1999. A new level in the *Vibrio cholerae* ToxR virulence cascade: AphA is required for transcriptional activation of the *tcpPH* operon. *Mol. Microbiol.* **31**:763-771.
239. **Sleator, R. D., and C. Hill.** 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microb. Lett.* **26**:49-71.
240. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **51**:503-517.
241. **Sperandio, V., J. A. Bailey, J. A. Giron, V. J. DiRita, W. D. Silveira, A. L. Vettore, and J. B. Kaper.** 1996. Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **64**:5406-5409.
242. **Staudenbauer, W.** 1975. Novobiocin-a specific inhibitor of semiconservative DNA replication in permeabilized *Escherichia coli* cells. *J. Mol. Biol.* **96**:201-205.
243. **Steinberg, D. A., M. A. Hurst, C. A. Fujii, A. H. Kung, J. F. Ho, F.-C. Cheng, D. J. Loury, and J. C. Fiddes.** 1997. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1738-1742.
244. **Stoebner, J. A., J. R. Butterton, B. Calderwood, and S. M. Payne.** 1992. Identification of the vibrobactin receptor of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **174**.
245. **Strauch, K. L., and J. Beckwith.** 1988. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**:1576-1580.
246. **Strauch, K. L., K. Johnson, and J. Beckwith.** 1989. Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperatures. *J. Bacteriol.* **171**:2689-2696.
247. **Stroher, U. H., K. E. Jedani, and P. A. Manning.** 1998. Genetic organization of the regions associated with surface polysaccharide synthesis in *Vibrio cholerae* O1, O139 and *Vibrio anguillarum* O1 and O2: a review. *Gene* **223**:269-282.
248. **Stroher, U. H., L. E. Karageorgos, M. H. Brown, R. Morona, and P. A. Manning.** 1995. A putative pathway for perosamine biosynthesis is the first function encoded within the *rfb* region of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* **166**:33-42.
249. **Stroher, U. H., L. E. Karageorgos, R. Morona, and P. A. Manning.** 1992. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:2566-2570.
250. **Sukharev, S. I., P. Blount, B. Martinac, and C. Kung.** 1997. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein and activities. *Annu. Rev. Physiol.* **59**:633-657.
251. **Susskind, M., L. Brade, H. Brade, and O. Holst.** 1998. Identification of a novel heptoglycan of alpha1->2-linked D-glycero-D-manno-heptopyranose. Chemical and antigenic structure of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* rough strain R20 (O1:K20-). *J. Biol. Chem.* **73**:7006-7017.
252. **Swamy, K. H., and A. L. Goldberg.** 1981. Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **149**:1027-1033.
253. **Swrdlow, D. L., and A. A. Ries.** 1993. *Vibrio cholerae* non-O1-the eighth pandemic? *Lancet* **342**:382-383.
254. **Tarsi, R., and C. Pruzzo.** 1999. Role of surface proteins in *Vibrio cholerae* attachment to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1348-1351.

255. **Tauxe, R., L. Seminario, R. Tapita, and M. Libel.** 1994. The latin american epidemic, p. 321-344. In K. I. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsik (ed.), *Vibrio cholerae* and Cholera: molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D.C.
256. **Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong, and J. J. Mekalanos.** 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:2833-2837.
257. **Tefsen, B., J. Geurtsen, F. Beckers, J. Tommassen, and H. de Cock.** 2005. Lipopolysaccharide transport to the bacterial outer membrane in spheroplasts. J. Biol. Chem. **280**:4504-4509.
258. **Terrak, M., T. K. Ghosh, J. van Heijenoort, J. Van Beeumen, M. Lampilas, J. Aszodi, J. A. Ayala, J. M. Ghuysen, and M. Nguyen-Disteche.** 1999. The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **34**:350-364.
259. **Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:4350-4354.
260. **Tsai, C. M., and C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **119**:115-119.
261. **Vaara, M.** 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. **56**:395-411.
262. **Vaara, M.** 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:2255-2260.
263. **Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**.
264. **Vinogradov, E. V., K. Bock, O. Holst, and H. Brade.** 1995. The structure of the lipid A-core region of the lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae* O1 smooth strain 569B (Inaba) and rough mutant strain 95R (Ogawa). Eur. J. Biochem. **233**:152 - 158.
265. **Vinogradov, E. V., R. Stuike-Prill, K. Bock, O. Holst, and H. Brade.** 1993. The structure of the carbohydrate backbone of the core-lipid-A region of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* strain H11 (non-O1). Eur. J. Biochem. **218**:543- 554.
266. **Wachsmuth, I. K., G. M. Evins, P. I. Fields, O. Olsvik, T. Popvic, C. A. Bopp, J. G. Wells, C. Carrillo, and P. A. Blake.** 1993. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. J. Infect. Dis. **167**:621-626.
267. **Wachsmuth, K. I., P. A. Blake, and Ø. Olsvik.** 1994. *Vibrio cholerae* and Cholera, molecular to global perspectives. ASM, Washington, DC.
268. **Waldor, K. W., and J. J. Mekalanos.** 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science **272**:1910-1914.
269. **Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos.** 1994. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. Infect. Immun. **62**:72-78.
270. **Wandersman, C., and S. Letoffe.** 1993. Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin and *Erwinia chrysanthemi* proteases. Mol. Microbiol. **7**:141-150.
271. **Wang, L., D. Liu, and P. R. Reeves.** 1996. C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. J. Bacteriol. **178**:2598-2604.
272. **Wang, R. F., and K. S. R.** 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. Gene **100**:195-199.
273. **Watnick, P., and R. Kolter.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol. Microbiol. **34**:586-595.
274. **Watnick, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter.** 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol. Microbiol. **39**:223-235.
275. **Watson, N.** 1988. A new revision of the sequence of plasmid pBR322. Gene **70**:399-403.
276. **Whitfield, C., P. A. Amor, and R. Köplin.** 1997. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. Mol. Microbiol. **23**:629-638.
277. **Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **31**:1307-19.
278. **Wonderling, L. D., B. J. Wilkinson, and D. O. Bayles.** 2004. The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. Appl. Environ. Microbiol. **70**:1935-1943.
279. **Yamaichi, Y., T. Iida, K. S. Park, K. Yamamoto, and T. Honda.** 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of the two chromosomes in *Vibrio* species. Mol. Microbiol. **31**:1513-1521.

- 
280. **Yamamoto, K., Y. Takeda, T. Miwatani, and J. P. Craig.** 1983. Purification and some properties of a non-O1 *Vibrio cholerae* enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin. *Infect. Immun.* **39**:1128-1135.
281. **Yamasaki, S., T. Shimizu, K. Hoshini, S.-T. Ho, T. Shimada, G. B. Nair, and Y. Takeda.** 1999. The genes responsible for O-antigen synthesis of *Vibrio cholerae* O139 are closely related to those of *Vibrio cholerae* O22. *Gene* **237**:321-332.
282. **Yethon, J. A., J. S. Gunn, R. K. Ernst, S. I. Miller, L. Laroche, D. Malo, and C. Whitfield.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium *waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence In vivo. *Infect. Immun.* **68**:4485-4491.
283. **Yildiz, F. H., and G. K. Schoolnik.** 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:4028-4033.
284. **Zhang, L., J. Radziejewska-Lebrecht, D. Krajewska-Pietrasik, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1997. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Mol. Microbiol.* **23**:63-76.
285. **Zhu, J., M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler, and J. J. Mekalanos** 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:3129-3134.

## VII Anhang

### 1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ACF	„accessory colonization factors“
Aminosäuren	gemäß des 1- bzw. 3-Buchstaben Code
AM	Außenmembran
Ap <sup>r/s</sup>	Ampicillin resistent/ sensitiv
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
Bla	β-Lactamase
<i>bla</i>	β-Lactamase-Gen
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAZy	„Carbohydrate-Active Enzymes“
ChiRP	„Chitin regulierten Pilus“
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane regulator“
CM	Cytoplasmamembran
Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol resistent
CT	Choleratoxin
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus pACYC184
CFU	„colony forming units“
CI	„competitive index“
Δ	Deletion
dNTP	desoxy Nucleosid- (Adenosin-, Cytosin-, Thymidin-, Guanosin-) triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

---

EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
Fru <sub>f</sub>	Fructofuranose
g	Gramm
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcN	Glucosamin
h	Stunde
Hep	L-Glycero-D-Manno-Heptose
IL	Interleukin
IgG	Immunglobulin G
IM	Innenmembran
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
<i>kanR</i>	Kanamycin-Resistenz-Gen aus pACYC177
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KDO	3-Deoxy-D-Manno-Oktulosonsäure
Kern OS	Kernoligosaccharid
Km <sup>r/s</sup>	Kanamycin resistent/ sensitiv
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MBK	Minimale bakteriozide Konzentration
MCS	„multiple cloning site“
MFRAH	Mannose/ Fucose resistentes Hämagglutinin
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
ml	Milliliter
μl	Mikroter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
min	Minuten

MHK	Minimale Hemmkonzentration
MSHA	„mannose sensitive hemagglutinin“, ein Typ IV Pilus
Nal	Nalidixinsäure
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge "x" (nm)
oNPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	„open reading frame“ (Offenes Leseraster)
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion/ „polymerase-chain-reaction“
pI	isoelektrischer Punkt
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PP	Pyrophosphat
PEtn	Phosphoethanolamin
RBS	Ribosomenbindestelle
<i>wb</i> *	Gene, deren kodierte Genprodukte an der Biosynthese des O Antigens beteiligt sind
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
R-LPS	„rough“ LPS – dieser Begriff wurde in dieser Arbeit verwendet für Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid ohne O Antigen. Zur besseren Abgrenzung wurden Mutanten mit intaktem Kernoligosaccharid ohne O Antigen als O Antigen negative Stämme bezeichnet.
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sedf	Sedoheptofuranose
Sm <sup>r</sup> /s	Streptomycin resistant/ sensitiv
sv.	Serovar
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TB	Tryptone Broth

---

Tc <sup>r</sup>	Tetracyclin resistent
TCBS	„thiosulfate citrate bile sucrose“
TCP	„toxin-coregulated pilus“
TCS	„thiosulfate citrate sucrose“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
Und	Undecaprenol
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur/ en
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VIP	„vasoactive intestinal peptide“
VPI	„ <i>V. cholerae</i> pathogenicity island“; Pathogenitätsinsel
VPS	„ <i>Vibrio polysaccharide</i> “ (Bezeichnung für das von <i>V. cholerae</i> O1 El Tor und O139 Stämmen synthetisierte Exopolysaccharid)
<i>wa</i> *	Gene, deren kodierte Produkte an der Biosynthese des Kernoligosaccharides beteiligt sind
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
X	beliebige Aminosäure
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
X-Phos	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz

2. Abbildungen

**Schleife PI**

---

```

1 -----MNNK--I---TKTSIFLTISLLITPG--FSVVAVGLLTLYSSVKLIKGNLNLN-KFDI IPLITLSAYFLSNLPITI
2 -----MNIK--NKFISKLEEFFFLSPLIVLLIFIFNIADTKYILSRLLPIV I IYALIKYRNAIKENLHSQIRLFLACGLLVV
3 -----MMINLMSLSLIYFMPISLLFSLGFSKAG--INIGITSIL I I F IYQLTRHSKLLKKSFGIIEKLSISLFLTGLIVSIL
4 MLTSPKHLHSLKPYTLKSSMILE I I T Y I L C F F S M I I A F V D N T F S I K I Y N I T A I V C L L S L I L R G R Q E N Y N I K N L L P L S I F L I G L L D L I W Y S A
5 -----MLTTSLTLNKEKWKPTWNKALVFLFVATYFLDGI TRYKHLIVILMI I T A I Y Q V S R S P K N F S H L F K N S V F Y S V A A L S L I L V Y S V L
6 -----MLTTSLTLNKEKWKPIWNKALVFLFVATYFLDGI TRYKHL I I I L M V I T A I Y Q V S R S P K S F P P L F K N S V F Y S V A V L S L I L V Y S I L
      : : : : :
    
```

**Schleife PI, fortgesetzt**

```

1 IDGDTLRYLDAGIRALLCIPMYFF- IKNEISKGANLDNTLCTSTILASFGALAF- AFYQFFILNMPRVDGFLFSINFG----YLAALAIL
2 VTFSLYHFIRDDEFSLPRTL IASL-AYLIFVPWKRINPQMVY I I I A I A I V C G L N A F Y E R V V L N I Y R V G I A T N P I P Y A ---LYVSFLVLSLSC
3 TNFDIGEMFN---FLKKG I F L L P P T I T H L A R S N V K L N I S L F Y F G I L A A I C Y S L S L W F D I G I N N W N G E R I G S F W D I G R W G E I L A Y S I I F T
4 FKVDNSPFRATYHSYLNTAK I F I F G S F I V F L T L T S Q L K S K K E S V L Y T L Y S L S F L I A G Y A M Y I N S I H E N D R I S F G V G T A T G - A A Y S T M L I G I
5 ISPDMKESFKEFENTVLEGFLLYT-LLIPVLLKDETKETVAKIVLFSFLTSLGLRALVEIVLYIQDYSRGVSFTNYDH--RHISDSMVFL
6 ISPDMKESFKEFENTVLEGFLLYT-LLIPVLLKDETKETVAKIVLFSFLTSLGLRALVEIVLYIQDYSRGVSFTNYDH--RHISDSMVFL
      . : : : :
    
```

**Schleife PII**

**Schleife PIII**

```

1 SFGLS----FTQTRFKYYLYLSVVAATVATILTI TRGAILTLLFVFIILFVIVNVRKIKFKQTLVFTLISFLLVSVSYQFSPRIQERVDFTI
2 IYLLLN---SQSKVLKLLASIGGVLSLAAIIMTD VRGVILFLPVVI IYLVITTIKLRWKYYVALTLSVTVLSGVFYATFQSDINARIAQTQ
3 LPFLDR--DSSKLFKLLF I L F I S S V I C L I L S G S SRAPILAIVISSFILILFT--RPKVLLFSFFSLCCLFSLQKTFDGT AQNRLESIT
4 VSGVAIL--YTKKNHPFLFLNNSCAVLYVLALTC TRATLLFPIICVAAL IAYYKSPKFTSSIVLLIAILASIVIIFNKP IQNRYNEAL
5 FPALLNIWLFRTKLSKLAFALSAYVLFMLGTI SRGAWLAVLVGVVWAILN-RQWKL MG I G A A I L V I A G A L V I T Q Q I H K P N Q D R L L Y K L
6 FPALLNIWLFPRKNAIKLVFLVLSAIYLFILGTI SRGAWLAVLVGVVWAILN-RQWKL I G V G A I L L A I I G A L V I T Q H N N K P D P E H L L Y K L
      : . . : * . . :
    
```

**Schleife PIV**

**Schleife PIV, fortgesetzt**

```

1 FEISSIASNNIHAASSGGRLQLWYAAVEAF----KHNP---IWGTTYSERESLNIELFKEGKVDEWTSTVPRG----- HHSQYFEAIA
2 DEIALIKQGD--LSSSIGIRLDLWMHGVEI I ---AQNP---LFGVGDS-----GLQGSISKMTNPGAAMQP----- HLHNQYLDFLA
3 NTTSDASN-----IS---RITMWQSGLEFFKFKFNHQPED I L G S G L L H F N - D E F Y K F M S E N Y D I E E I K L K T M N N F S F S D SHNSYIDMLN
4 NDLNSYTNAN--SVTSLGARLAMY E I G L N I F ---IKSP---FFRSAESRAESMNL LVAEHNRLR- GALEFSNV----- HLHNEIIEAGS
5 QQTDSYR-----YTNGTQGTAWILIQE-----NP---FKGYGYSNEVYDSIYNKRVDYPTWTFKESIG-----P- HNTILYIWF
6 QQTDSYR-----YTNGTQGTAWILIQE-----NP---IKGYGNDVYDGVYNKRVDYPTWTFKESIG-----P- HNTILYIWF
      : : : : : * :
    
```

**Schleife PIV, fortgesetzt**

**Schleife PV**

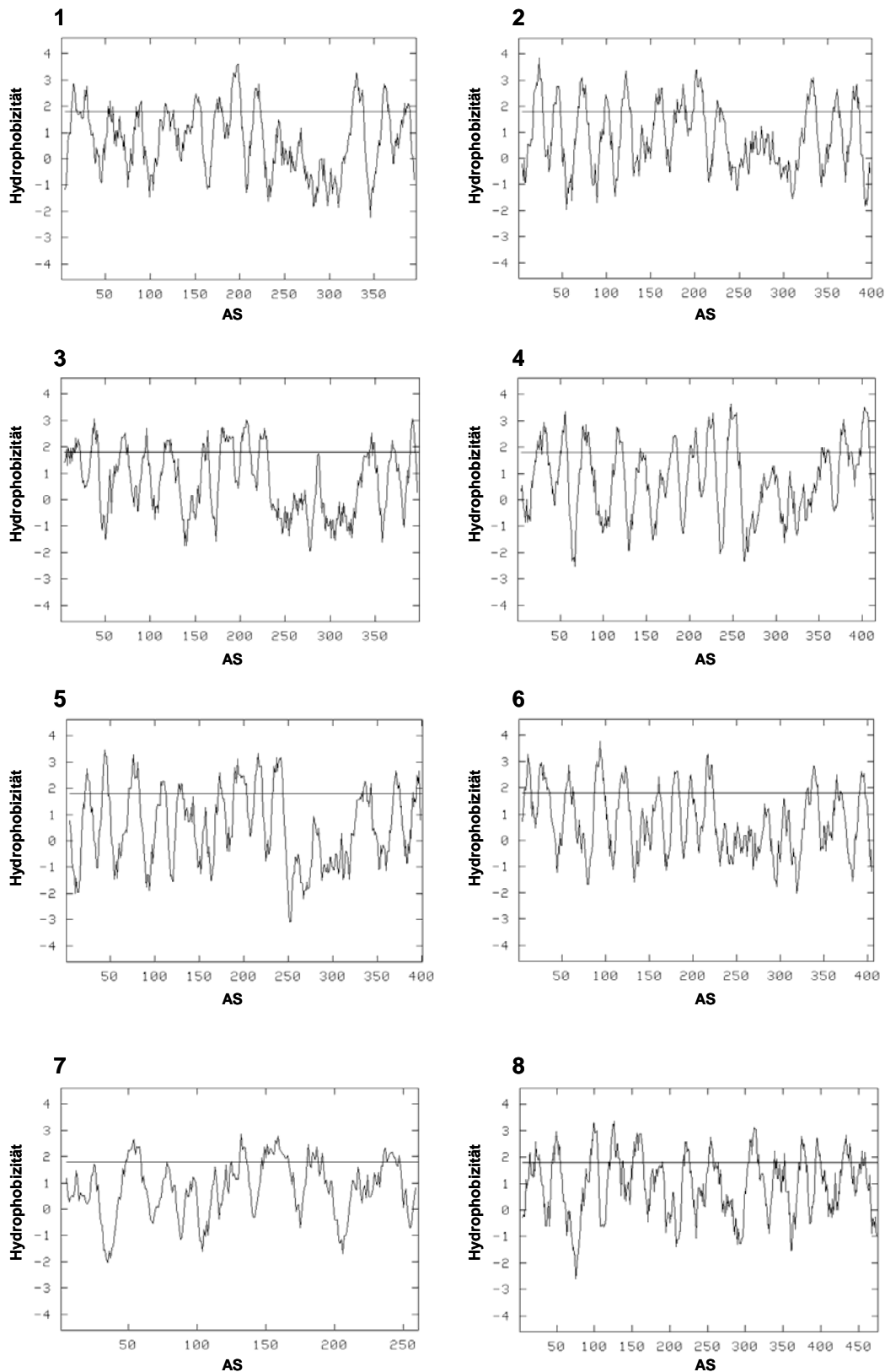
```

1 SNGTLGILAI FAML-ILPFGVFLNDYRKTGSPISQTGYLFAFGFIIFCLTEAPLQANLIGTFYGFMVAFIYAYIAAKRAKNZ-----
2 RYGI VGT M V M F L F C L A L F L N L N S G F E Y I G N P L V N S - M L M M L I F A G - L T D V P L H H T H L I Y L L T I L C G L L I R F S E R G M N K N I H L F K C
3 KLGLFYLSYISLL----TSIILHLLKEAPTPWTQAGISLILTHLIMSFFYTSYLEYQTI-----VLFSLALCLSKRKV-----
4 LKGIMGIFSTFLY---FSLFYIAYKKRALGL---LILTLGIVGIGLSDV I I W A R S I P -- I I I I S A I V L L L V I N N R N N T I N ---
5 SAGILGLASLAYLYGAI IRETASSTFKKVEI SPYNAHLLLLSFI GFYIVRGNFEQVDID-----QIGIITGFL LALRNKZ-----
6 SAGILGLASLVLYGAI IRETASSTLRKVEI SPYNAHLLLLS FVGFYIVRGNFEQVDIA-----QIGIITGFL LALRN-----
      * : : : :
    
```

**Abbildung VII.1: Gegenüberstellung verschiedener WaaLs.** Gezeigt sind die Proteinsequenzen unterschiedlicher O Antigen-Ligasen (Identität unter 30%) aus verschiedenen Gram<sup>-</sup> Bakterien, die durch das Computerprogramm ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) einander zugeordnet wurden: Nummer 1: *V. cholerae* P27459 (AAL76923); 2: *V. cholerae* V194 (AAL77359); 3: *V. cholerae* V192 (AAL77364); 4: *E. coli* K-12 (NP\_418079); 5: *S. enterica* sv. Arizonae IIIA (SARC6, AY533856); 6: *S. enterica* sv. Typhimurium (SARC1, NP\_462613). Die Lage der periplasmatischen Schleifen PI bis PV, festgelegt anhand der Topologieanalyse von WaaL<sup>P27459</sup>, ist durch schwarze Linien markiert. Punkte weisen auf schwach konservierte, Doppelpunkte auf konservierte und Sterne auf identische AS hin. Die konservierten Motive R(X<sub>3</sub>)L und H(X<sub>10</sub>)G sind rot hervorgehoben.







**Abbildung VII.3: Hydrophobizitätsdiagramme verschiedener Proteine nach Kyte und Doolittle (146).** Erstellt durch ein im Internet verfügbares Programm ([http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc\\_mcampbell\\_genomics\\_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm](http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm)). Nummer 1 bis 5: siehe Abbildung VII.1; 6: Wzy von *S. flexneri* (68); 7: Wzm von *V. cholerae* O1 (VC0246); 8: WbfK von *V. cholerae* O139 (BAA33599); Werte über 1,8 deuten putative Transmembrandomänen an.

**Tabelle VII.1: Transposonmutanten mit eingeschränktem Wachstum unter hoher Osmolarität.** Angegeben ist der Insertionsort des Transposons *TncatpirkanR* und dessen Annotierung in der Tigr-Datenbank.

Mutante	Insertionsort von <i>TncatpirkanR</i>	Genprodukt/ putative Funktion
Osm2	VC2030	Rne, Ribonuklease E
Osm6	VCA0565	Sensor-Histidinkinase
Osm14	VC2156	NlpB, Lipoprotein -34
Osm15	VC0894	ThiI, Thiamin-Biosyntheseprotein
Osm26	VC1043	FadL-2, Fettsäure-Transportprotein
Osm28	VC2662	konserviertes hypothetisches Protein
Osm31	VCA0576	HutA, Häm-Transportprotein in der AM
Osm39	VC0257	WbeN, Tetronat-Biosyntheseprotein des O1 Antigens
Osm43	VC0659	PrfC, „peptide chain release factor 3“
Osm46	VC2133	FliF, Bestandteil des M-Rings der Flagelle
Osm68	VC0845	konserviertes hypothetisches Protein
Osm65	VC1496	Prc, periplasmatische Protease

### **3. Erklärungen**

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade (neben dem Diplom in Biologie) erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, März 2005

Stefan Schild

#### 4. Publikationsliste

**Schild, S., A.-K. Lamprecht, and J. Reidl.** Molecular and functional characterization of O antigen transfer in *Vibrio cholerae*. eingereicht bei J. Biol. Chem.

**Schild, S., A.-K. Lamprecht, M. Fourestier, C. M. Lauriano, K. E. Klose, and J. Reidl.** Characterizing LPS core lipid A mutant O1 and O139 *Vibrio cholerae* strains for mucus attachment and virulence. eingereicht bei Int. J. Med. Microbiol.

**Schild, S. and J. Reidl.** 2003. *Vibrio cholerae*: Ursache und Wirkung. BIOSpektrum **4**:360-361.

**Nesper\*, J., S. Schild\* , C. M. Lauriano\*, K. E. Klose, and J. Reidl.** 2002. Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. Infect. Immun. **70**:5990-5996.

\* Diese Autoren sind gleichberechtigt

**Nesper, J., A. Kraiss, S. Schild, J. Blass, K. E. Klose, J. Bockemühl, and J. Reidl.** 2002. Comparative and genetic analysis of the putative *Vibrio cholerae* LPS core oligosaccharide biosynthesis (*wav*) gene cluster. Infect. Immun. **70**:2419-2433.

## 5. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Stefan Schild
Geburtsdatum	16. April 1976
Geburtsort	Ingolstadt

### Wissenschaftliche Anstellung

seit Jan. 2001	Dissertation zum Thema: “Bedeutung der Lipopolysaccharidstrukturen bei pathogenen <i>Vibrio cholerae</i> Stämmen für die Ausbildung von Cholera und Abgrenzung zu Umweltisolaten“ am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. J. Reidl
----------------	---

### Studium

Okt. 1996 - Jan. 2002	Studium der Biologie an der Universität Würzburg Studienschwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie und Biochemie Diplomarbeit (Mai 2001 – Jan. 2002) zum Thema: “Analysen zu LPS-Kernbiosynthese-Genprodukten bei <i>Vibrio cholerae</i> “ am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg bei Herrn Prof. J. Hacker in der Arbeitsgruppe von PD J. Reidl
-----------------------	---

### Wehrdienst

Juli 95 -April 96	Luftwaffensanitätsstaffel - FlaRakGrp 23 - Manching
-------------------	---

### Schulbildung

Sept. 82 - Juni 95	Grundschule Ingolstadt-Ringsee bis 1986 Christoph-Scheiner-Gymnasium bis 1995 Abschluss: Abitur
--------------------	---