

## II Einleitung

*V. cholerae* ist ein Gram-negatives, bewegliches Bakterium das zur Familie der Vibrionaceae gehört. Es ist der Erreger der Cholera, einer Krankheit, die gekennzeichnet ist durch Erbrechen und massivem wässrigem Durchfall, der bei schwerer Verlaufsform schließlich reiswasser-ähnlich wird. Das natürliche Habitat von *V. cholerae* sind Oberflächengewässer einschließlich der Ozeane (107). Es sind zur Zeit 193 verschiedene *V. cholerae* Serogruppen bekannt (236), als Erreger von Cholera-Epidemien sind bisher jedoch nur Stämme der nichtbekapselten Serogruppe O1 (Serotypen Inaba und Ogawa) und der bekapselten Serogruppe O139 aufgetreten. Die Serogruppe O1 wird weiterhin in zwei Biotypen (Klassisch und El Tor) eingeteilt, die biochemisch und durch Phagentypisierung voneinander unterschieden werden können. Beide Biotypen waren mit Cholera-Epidemien assoziiert, wobei klassische Stämme häufiger die schwere Form der Cholera verursacht haben (107). *V. cholerae* mit anderen O-Antigen Strukturen als O1 oder O139 sind bisher bei sporadischen, lokal begrenzten Ausbrüchen von Durchfallerkrankungen aufgetreten (10) und können als Komplikation selten auch extra-intestinale Infektionen (z.B. Bakteriämie) verursachen (153, 157).

Auf der anderen Seite lösen nicht alle O1 und O139 Umweltisolate Cholera aus. Genetische Analysen haben gezeigt, daß die meisten aquatischen O1 und O139 Stämme nicht die horizontal übertragbaren genetischen Elemente CTX und VPI (*V. cholerae* „pathogenicity island“) besitzen (56). Das chromosomale CTX-Element ist Teil eines integrierten Genoms des filamentösen Phagen CTX $\Phi$  und kodiert u.a. für das Cholera-toxin, das für das Krankheitsbild der Cholera verantwortlich ist (218). VPI ist eine chromosomal lokalisierte Pathogenitätsinsel, deren Gene u.a. für die Ausbildung der Pili TCP kodieren (109). Diese Pili sind essentiell für die Kolonisierung des menschlichen Dünndarms (90) und stellen gleichzeitig den Rezeptor für den Phagen CTX $\Phi$  dar (218).

### 1. *Vibrio cholerae* und Cholera

#### 1.1. Epidemiologie und Überleben in der Umwelt

##### 1.1.1. Historie und Epidemiologie der Cholera

Die Cholera kommt endemisch in Indien und Bangladesh schon seit mindestens 1000 Jahren vor. Es gibt aber bereits aus dem 3. Jh. v. Chr schriftliche Hinweise auf eine Krankheit in Indien, bei der es sich aufgrund der beschriebenen Symptome um die Cholera handeln könnte. Im 19. Jahrhundert hat sich die Cholera dann weltweit ausgebreitet. Seit dem Beginn der epidemiologischen Aufzeichnungen im Jahr 1817 verzeichnet man sieben Pandemien; die ersten sechs hatten ihren Ursprung in Indien und wurden von Pollitzer folgendermaßen eingeteilt: 1. 1817-1823, 2. 1829-1851, 3. 1852-1859, 4. 1863-1879, 5. 1881-1896, 6. 1899-1923. Die 7. Pandemie hält seit 1961 an. Der Erreger der Cholera wurde 1883 während der 5. Cholera-

Pandemie zum erstenmal von Robert Koch in Ägypten isoliert und als *V. cholerae* bezeichnet. Der Erreger dieser und der folgenden 6. Cholera-Pandemie erhielt die Bezeichnung *V. cholerae* Serogruppe O1, Biotyp Klassisch. In den Jahren 1926 bis 1960 waren bis auf die endemischen Gebiete in Südasien die meisten Teile der Welt cholerafrei und die pandemische Cholera galt als überwunden. 1961 brach dann in Celebes in Indonesien eine Epidemie aus, die wieder durch die Serogruppe O1, diesmal aber durch einen neuen Biotyp verursacht wurde, der die Bezeichnung El Tor erhielt. Dieser Erreger hat sich seither weltweit ausgebreitet, nach Asien erreichte er 1970 Afrika und 1991 Südamerika, einen Kontinent, der über 100 Jahre keine Cholerafälle mehr zu verzeichnen hatte. Diese 7. Pandemie ist die bisher längste, heftigste und geographisch am weitesten verbreitete, was u.a. darauf zurückgeführt wird, daß dieser Biotyp besser in der Umwelt überleben kann, obwohl er seltener die schwere Cholera auslöst (Übersichtsartikel: 22, 37, 56, 107, 235). Zum Beispiel wurden 1999 der WHO weltweit 206 746 Fälle von Cholera gemeldet, ausgelöst durch *V. cholerae* O1 El Tor: 81 % in Afrika, 15 % in Asien und 3 % in Südamerika, dabei starben 8 728 Patienten (233).

1992 brach in Bangladesh und Indien eine Cholera-Epidemie aus, die durch *V. cholerae* einer neuen Serogruppe, O139, verursacht wurde. Dieser Erreger hat sich auch in den Nachbarstaaten ausgebreitet - bisher wurden Cholerafälle aus insgesamt 10 Staaten gemeldet. Seit 1994 wurden aber keine größeren Ausbrüche durch diese Serogruppe mehr verzeichnet (WHO, <http://www.who.int>). In Bangladesh koexistieren seither O1 klassische, O1 El Tor und O139 Stämme als Erreger der Cholera, wobei die meisten Ausbrüche seit 1994 wieder durch O1 El Tor verursacht wurden (56). Ob der Ausbruch der Cholera durch die Serogruppe O139 der Beginn der 8. Pandemie war, wie häufig zu lesen ist, oder ob es sich nur um eine vorübergehende Epidemie handelte, kann bisher noch nicht abgeschätzt werden.

### 1.1.2. Umweltvorkommen

Früher wurde der Mensch als einziges Reservoir für pathogene *V. cholerae* angesehen. Da aber praktisch keine Dauerausscheider bekannt sind, Haustiere wohl nur sehr selten als Träger vorkommen, auf der anderen Seite die Verbreitung des Erregers über das Wasser aber erkannt wurde, wurden verstärkt aquatische Habitate als Reservoir in Erwägung gezogen. Neue Anhaltspunkte ergaben sich vor allem durch die seit über 35 Jahren anhaltenden systematischen Überwachungen der Cholera-Ausbrüche im Endemiegebiet Bangladesh. Charakteristisch ist, daß Cholerafälle in Bangladesh zweimal jährlich immer an mehreren, örtlich oft weit voneinander entfernten Stellen gleichzeitig auftreten und mit klimatischen Ereignissen korrelieren. Die meisten Fälle wurden Jahr für Jahr von September bis Dezember verzeichnet, kurz nach dem Sommermonsun und dem Ende der Regenzeit. Parallel dazu sind in dieser Zeit die Gewässer nährstoffreich und die Wassertemperaturen erhöht, ein Ereignis das zum Blühen des Phytoplanktons und dadurch auch zur Reproduktion des Zooplanktons führt (37, 56, 107, 131).

Es konnte gezeigt werden, daß *V. cholerae* mit Phytoplankton (z.B. dem Cyanobakterium *Anabaena ssp.* oder Grünalgen) und Zooplankton (vor allem Krebse, z.B. Copepoden) assoziiert vorkommt. Vor allem das Vorhandensein von Copepoden und *V. cholerae* der Serogruppe O1 scheint zu korrelieren, ein einzelner Copepod kann dabei bis zu  $10^4$  *V. cholerae* an seiner Oberfläche tragen. Die Assoziation mit Krebsen gewährleistet *V. cholerae* die Versorgung mit Nährstoffen, da es eine Chitinase produzieren und Chitin verstoffwechseln kann, welches den Hauptbestandteil des Exoskelettes der Krebse darstellt (37, 100, 151).

Die Hoffnung ist, daß durch diese Erkenntnisse die Cholera-Ausbrüche in dem Endemiegebiet Bangladesch/Indien mit seinen katastrophalen sanitären Verhältnissen zukünftig vermindert werden können. Dabei soll durch das Einführen von einfachen und kostengünstigen Filtersystemen zumindest das Plankton aus den verunreinigten Gewässern eliminiert werden, das die Menschen als Trinkwasser verwenden (37). In einem Laborversuch konnte gezeigt werden, daß durch Filtration von planktonhaltigem Wasser durch den für die traditionelle Kleidung benutzten Stoff (Sari) das Plankton und damit auch die assoziierten *V. cholerae* beseitigt werden (97). Der Verzehr von ungekochtem oder nicht gar gekochtem Fisch sowie rohen Muscheln war ebenfalls schon häufig die Ursache von Cholera, vermutlich da das Plankton die Nahrung für weitere Meeresbewohner wie Muscheln oder Fische darstellt. Dies ist auch häufig der Übertragungsweg für Durchfallerkrankungen ausgelöst durch nicht-O1/O139-*V. cholerae* (157).

Durch die zunehmende Mobilität der Menschen seit dem letzten Jahrhundert wurde der Erreger von den Endemiegebieten in Indien und Bangladesch weiter verbreitet, so daß er nun weltweit in aquatischen Habitaten persistiert. In vielen Ländern treten sporadisch Fälle von Cholera auf, epidemische Ausbrüche werden heutzutage nur in Gebieten mit unzureichenden sanitären Verhältnissen und fehlender zentraler Trinkwasserversorgung verzeichnet (107). Ein Beispiel dafür ist Afrika, wo die Cholera nun seit über 30 Jahren endemisch mit jährlichen Ausbrüchen vorkommt. Sie hat sich nicht nur an den Küstenregionen ausgebreitet, sondern wurde u.a. auch durch Flüchtlingsströme ins Innere des Kontinents geschleppt (74). Die Umweltreservoirs in diesen für *V. cholerae* eher atypischen Regionen sind bisher noch nicht charakterisiert.

### 1.1.3. Überlebensformen und Biofilmbildung

Freilebende *V. cholerae* konnten weltweit aus Oberflächengewässern isoliert und kultiviert werden, wobei es sich aber überwiegend um Stämme handelte, die nicht der Serogruppe O1 oder O139 angehörten (151). Mit der Einführung neuer Techniken können seit kurzem aquatische Habitate besser untersucht werden. So konnten z.B. mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie *V. cholerae* O1 in Wasserproben nachgewiesen werden, die nicht kultivierbar, aber immer noch lebensfähig waren. In diesem sogenannte VBNC-Stadium („viable but non-culturable“) scheinen pathogene *V. cholerae* längere Zeit in der Umwelt persistieren zu können. Bisher ist allerdings noch nicht geklärt, unter welchen Bedingungen das VBNC-Stadium erreicht wird. Es konnte

aber experimentell gezeigt werden, daß durch Verabreichung von *V.cholerae* O1 im VBNC-Stadium, aus Kaninchen und Menschen teilweise wieder pathogene kultivierbare Zellen gewonnen werden können (Übersichtsartikel: 37, 107).

Neuerdings können auch Proben aus aquatischen Oberflächenmaterialien (Mineralien, Pflanzen, Plankton usw.) besser untersucht werden. Dadurch wurde klar, daß Mikroorganismen in aquatischen Habitaten überwiegend in einem dreidimensionalen Biofilm organisiert sind, und daß der Anteil freischwimmender Bakterien tatsächlich weniger als 0,1 % beträgt. Der Vorteil scheint, daß Mikroorganismen in Biofilmen besser gegen antimikrobielle Agentien geschützt sind und durch wassergefüllte Kanäle mit Nährstoffen versorgt werden können (40). Auch für *V. cholerae* konnte vor kurzem gezeigt werden, daß sie einen dreidimensionalen Biofilm mit Wasserkanälen bilden können (227). Abgesehen von der bereits erwähnten Assoziation von pathogenen *V. cholerae* mit Phyto- und Zooplankton ist die Verbreitung in natürlichen Biofilmen bisher noch nicht geklärt.

Unter Laborbedingungen sind nicht alle *V. cholerae* Stämme zur Bildung eines Biofilms befähigt. Alle bisher untersuchten *V. cholerae* O1 Klassische und einige klinische O1 El Tor und O139 Isolate konnten keinen Biofilm an abiotischen Oberflächen bilden, während andere O1 El Tor und O139 Isolate dazu in der Lage waren (229, 239). Die Biofilmbildung ist dabei ein mehrstufiger, genau regulierter Prozeß. Es wurde gezeigt, daß für die Anhaftung an abiotische Oberflächen (z.B. Silicat) und an Cellulose die Typ IV Pili MSHA und eine funktionstüchtige Flagelle benötigt werden (227, 229). Für die Anhaftung an Chitin scheinen dagegen chitinbindende Proteine eine Rolle zu spielen (207, 229). Nach der Adhäsion bildet *V. cholerae* Mikrokolonien an der Oberfläche aus und synthetisiert anschließend ein Exopolysaccharid (VPS), das für die Stabilisierung des Biofilms essentiell ist (227, 239). Die genaue Regulation dieses komplexen Vorganges ist bisher noch nicht bekannt.

Charakteristisch für *V. cholerae* ist auch, daß im Gegensatz zu O1 klassischen Stämmen alle bisher untersuchten O1 El Tor und O139 Stämme unter Laborbedingungen (mit einer Frequenz von ungefähr  $10^{-4}$ ) Rugose-Kolonievarianten ausbilden können, die konstitutiv das VPS exprimieren (228, 239). Rugose-Kolonievarianten bilden aufgrund des vorhandenen VPS einen Biofilm an abiotischen Oberflächen und umgehen damit die in Wt-Stämmen notwendige Regulationskaskade (217, 239). Experimentell konnte gezeigt werden, daß pathogene O1 El Tor Rugose-Varianten resistent sind gegen hohe Chlor-Konzentrationen und in Menschen Cholera auslösen können (152).

## 1.2. Pathogenese der Cholera

### 1.2.1. Infektionsverlauf

Die Cholera wird durch die orale Aufnahme von *V. cholerae* mit verunreinigtem Wasser oder Nahrungsmitteln ausgelöst (Abb. 1). Die Inkubationszeit beträgt einige Stunden bis zu 5 Tagen

und hängt von der Infektionsdosis ab. Da *V. cholerae* sensitiv gegen Säure ist, wird angenommen, daß nur sehr wenige Erreger die Magenpassage überleben. Dies erklärt auch die relativ hohe experimentelle Dosis von  $10^9 - 10^{11}$  Bakterien, die Freiwilligen appliziert werden muß, damit sich die schwere Form der Cholera manifestiert (31, 225). Menschen, die wenig Magensäure produzieren sind sehr viel anfälliger für Cholera, da eine niedrigere Infektionsdosis ausreicht (156). So reichen z.B. in einer Natriumcarbonat-gepufferten Lösung, die die Magensäure neutralisiert, bereits  $10^3$  bis  $10^4$  Bakterien aus, um in Freiwilligen die Cholera zu induzieren. Nahrungsmittel haben ebenfalls eine Pufferkapazität, die Infektionsdosis liegt dann bei ungefähr  $10^6$  Zellen (107). Auf der anderen Seite besitzt *V. cholerae* induzierbare Mechanismen, um sich zumindest teilweise gegen Säure zu schützen. Im Tiermodell mit neugeborenen Mäusen konnte gezeigt werden, daß *V. cholerae*, die zuvor Bedingungen ausgesetzt waren, in denen sie das ATR-System („acid tolerance response“) induziert hatten, besser kolonisieren konnten (142). Die Infektionsdosis hängt also von mehreren Faktoren ab und kann stark schwanken, je nach Prädisposition des Infizierten und der Physiologie des Bakteriums.

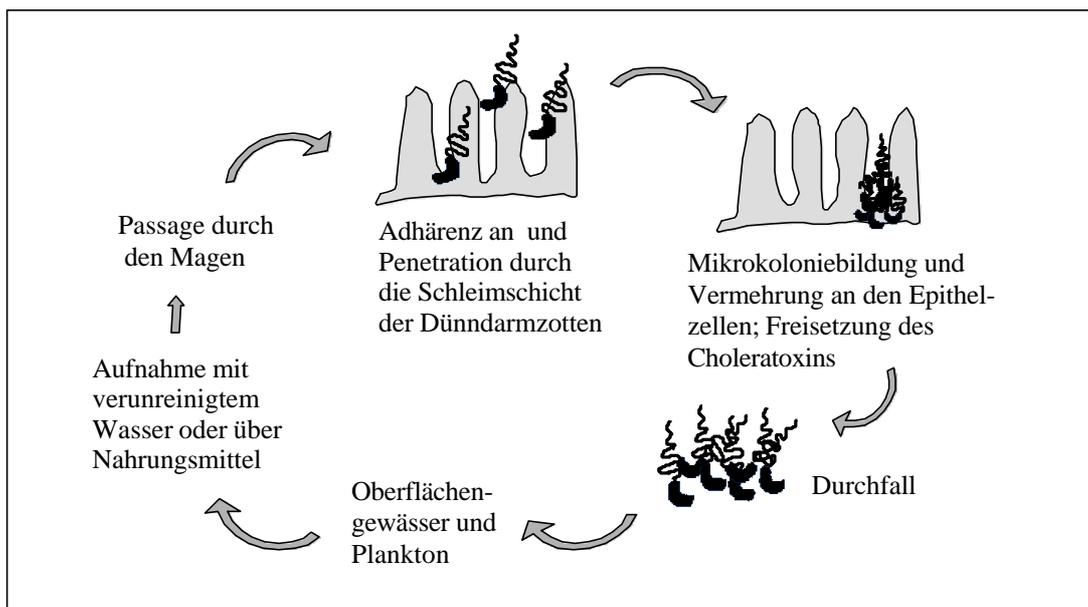


Abb. 1: *V. cholerae*-Infektionszyklus

Nach der Passage durch den Magen gelangt der Erreger in den Dünndarm. In diesem Milieu sind die Bakterien völlig anderen Bedingungen ausgesetzt. Der pH beträgt  $\approx 5,6$  und es sind u.a. auch hohe Konzentrationen an kurzkettigen schwachen organischen Säuren nachzuweisen (42). Durch die einströmende Gallenflüssigkeit ist auch die Konzentration an Gallensäuren hoch. Desweiteren werden Substanzen, die zum angeborenen Immunsystem gezählt werden, im menschlichen Dünndarm zur Abwehr von pathogenen Bakterien produziert. Dazu zählen u.a. Komplementfaktoren, die von den Dünndarm-Epithelzellen sekretiert werden (5), und die kationischen antimikrobiellen Peptide, die von den Paneth Zellen produziert werden (135). Alle

genannten Substanzklassen haben antimikrobielle Wirkung, deshalb können nur *V. cholerae*-Zellen, die sich ausreichend gegen solche Substanzen schützen können, im Dünndarm persistieren.

Die Kolonisierung des Dünndarms durch den Erreger erfolgt an den Zotten des Jejunum. *V. cholerae* der Serogruppe O1 sind nicht-invasive Bakterien, die sich an den Darmepithelzellen extrazellulär vermehren. Bisher konnten jedoch weder spezifische *V. cholerae* Adhärenzfaktoren, noch die Wirtsrezeptoren identifiziert werden. Es gibt Hinweise, daß der Kolonisierungsprozeß von mehreren bakteriellen Faktoren abhängig ist, u.a. sind vermutlich die Pili TCP, die Flagelle, eventuell aber auch das LPS sowie AM-Proteine an diesem Prozeß beteiligt (35, 117, 174, 190). Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, daß *V. cholerae* gut an die gelartige Schleimschicht adhären kann, die hauptsächlich aus Muzinen (Glykoproteine) besteht und das Darmepithel schützt (237). Die Bakterien penetrieren durch die Schleimschicht zu den Epithelzellen der Dünndarmzotten. Dieser Prozeß wird wahrscheinlich durch die Flagellenrotation und durch die Produktion von hydrolytischen Enzymen (z.B. muzinolytische Proteine und Proteasen) erleichtert (62, 107). Mit der „in vivo Expressionstechnik“ konnte gezeigt werden, daß *V. cholerae* erst an den Epithelzellen das Signal erhält, die Pili TCP zu exprimieren (127). Diese Pili sind höchstwahrscheinlich durch Pilus-Pilus-Interaktion für eine Mikrokoloniebildung an der Oberfläche der Epithelzellen verantwortlich (117). Erst nach der Mikrokoloniebildung und der Anhaftung der Aggregate an die Epithelzellen kommt es vermutlich zur Expression und Sekretion des Cholera-toxins. Diese Theorie beruht auf der Beobachtung, daß „in vivo“ (Mausmodell) die Transkription von *ctxA* erst erfolgt, wenn *tcpA* exprimiert wurde (127).

Durch die Freisetzung und Aktivität des Cholera-toxins wird die Sekretion von Chlorid aus den Darmepithelzellen stimuliert und der Transport von Chlorid und Natrium in die Zelle gehemmt. Durch den entstehenden osmotischen Gradient kommt es dann sekundär zum Ausstrom von Wasser aus den Zellen, was letztendlich zur Cholera führt. Die Patienten bekommen heftigen Durchfall, Erbrechen und Magenkrämpfe. Bei Nichtbehandlung wird der Effekt der Dehydrierung immer stärker und der Stuhl nimmt schließlich reiswasserähnliche Formen an, da Darmepithel mit abgestossen wird. Das Stuhlvolumen beträgt dann bis zu 20 l pro Tag. Das Cholera-toxin ist dabei alleine für das Krankheitsbild der Cholera verantwortlich, da dieselben Symptome durch die Applikation von 25 µg Cholera-toxin ausgelöst werden können. Durch den enormen Wasserverlust kommt es sekundär zur Eindickung des Blutes, Blutdruckabfall und Unterkühlung und führt ohne Behandlung bei 50 % der Erwachsenen und bei 90 % der Kinder und alten Leute zum Tod durch Organversagen. Während dieser Entleerungen gelangen pro g Stuhl etwa  $10^7$  bis  $10^8$  *V. cholerae* in die Umwelt und können weitere Menschen infizieren. In Gebieten mit schlechten sanitären Verhältnissen kommt es deshalb recht schnell zur Ausbreitung der Cholera (Übersichtsartikel: 107, 128).

### 1.2.2. Wirkungsweise des Cholera-toxins

Das Cholera-toxin (CT) besteht aus zwei Polypeptid-Untereinheiten. Die A-UE besitzt eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität und interagiert nichtkovalent mit der B-UE. Fünf B-UE bilden ein ringförmiges, nichtkovalent verbundenes Pentamer, das die A-UE umgibt. Die Bindung des CT an die Darmepithelzellen erfolgt über die B-UE an  $G_{MI}$ -Ganglioside, die in den Mikrovilli lokalisiert sind. Nach Aufnahme des CT in die Zelle über retrograden Transport und Translokation der A-UE in das Cytoplasma kann diese eine ADP-Ribose von NAD auf die  $\alpha$ -Einheit des intrazellulär vorliegenden G-Proteins übertragen. Das modifizierte G-Protein aktiviert permanent die Adenylatcyclase, die nun ständig cAMP produziert. cAMP wiederum kann u.a. die Proteinkinase A aktivieren, die ihrerseits nun Proteine phosphorylieren kann. Es wird angenommen, daß es durch diese Kaskade dann zur Aktivierung des Chloridkanals CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein“) und/oder weiterer Chloridkanäle kommt (Übersichtsartikel: 65, 107, 133, 154, 195).

Das CT aktiviert auch die Synthese von Prostaglandinen. Dieser Prozeß erfolgt unabhängig von der ADP-Ribosyltransferaseaktivität der A-UE und wird wahrscheinlich durch die B-UE stimuliert (166). Durch die Verabreichung von Prostaglandinen konnte im Tiermodell (Kaninchen; „ligated rabbit ileal loop model“) der Ausstrom von Wasser induziert werden (167). Weiterhin löst CT auch die Sekretion von Hormonen wie z.B. Serotonin aus, das dann die Freisetzung von VIP („vasoactive intestinal peptide“) induziert. Durch VIP kommt es ebenfalls zur Sekretion von Elektrolyten und Wasser aus den Epithelzellen (107). Bis heute ist noch nicht geklärt, ob die Wirkung des CT auf die Aktivierung der Adenylatcyclase oder auf die Synthese von Hormonen (z.B. Prostaglandinen und VIP) zurückzuführen ist. Eventuell kommt es nur durch die synergistische Wirkung von cAMP, Prostaglandinen und VIP zum enormen Flüssigkeitsverlust.

### 1.3. Kontrolle und Manifestation der Cholera

Die Cholera kann relativ gut durch orale Gabe einer Rehydratisierungs-Salz-Lösung behandelt werden, nur in besonders schweren Fällen ist die intravenöse Infusion einer Rehydratisierungs-Lösung notwendig. Probleme bei der Behandlung entstehen in epidemischen Gebieten, wenn nicht genügend Rehydratisierungslösungen zur Verfügung stehen. Wenn vorhanden, werden häufig zusätzlich Antibiotika, überwiegend Tetracycline, verabreicht. Dadurch wird zum einen die Dauer der Krankheit vermindert und zum anderen werden weniger Erreger ausgeschieden (WHO, 21.5.2000, <http://who.int/inf-fs/en/fact107.html>).

Nicht in allen Personen, die mit *V. cholerae* infiziert wurden, manifestiert sich die schwere Form der Cholera. Es wird angenommen, daß ungefähr 11 % der mit einem O1 klassischen Stamm Infizierten die schwere und 15 % eine abgeschwächte Verlaufsform der Cholera entwickeln, während 15 % eine milde Form von Durchfall bekommen, die nicht unbedingt als

Cholera diagnostiziert wird. Schätzungsweise 59 % der Infizierten sind symptomlos, scheiden aber für kurze Zeit den Erreger aus. Für *V. cholerae* O1 El Tor wird geschätzt, daß 2 % der Infizierten eine schwere, 5 % eine abgeschwächte und 18 % eine milde Verlaufsform der Cholera entwickeln, während über 75 % symptomlos bleiben (107). Für O139 Stämme liegen noch keine Schätzungen vor.

Welche Faktoren für die Manifestierung der schweren Cholera eine Rolle spielen, ist noch nicht endgültig geklärt. Es wurde aber beobachtet, daß in endemischen Cholergebieten wie Bangladesh hauptsächlich Kinder im Alter von 2 – 9 Jahren an O1 Stämmen erkranken, Erwachsene dagegen seltener, vermutlich aufgrund eines Immunschutzes gegen O1 Stämme aus früheren Infektionen. Dagegen waren bei der Epidemie 1992/1993 in Bangladesh, die durch O139 Stämme ausgelöst wurde, hauptsächlich Erwachsene betroffen. Auch in nicht-endemischen Gebieten werden hauptsächlich Erwachsene mit O1 Stämmen infiziert. Neben der Immunität spielt auch, wie schon erwähnt, die Magensäure und offensichtlich auch die Blutgruppe eine Rolle. Menschen mit der Blutgruppe 0 erkranken häufiger an schwerer Cholera, als Menschen einer anderen Blutgruppenzugehörigkeit (Übersichtsartikel: 107, 175). Weiterhin wird vermutet, daß CFTR heterozygote Menschen resistenter gegen Cholera sind, da sie nur ein funktionelles CFTR Gen besitzen und deshalb weniger aktive CFTR-Chloridkanäle synthetisieren können (70).

Der Ernährungszustand scheint ebenfalls eine wichtige Rolle für die Schwere der Erkrankung zu spielen. Die schwere Verlaufsform der Cholera ist in Gebieten, in denen viele Menschen chronisch unternährt sind, sehr viel häufiger (175). Unternährte Menschen haben u.a. auch erniedrigte Konzentrationen an Gallensäuren im Dünndarm. Da Gallensäuren neben der antimikrobiellen Wirkung auf *V. cholerae* auch die Expression und Proteinaktivität regulatorischer *V. cholerae*-Proteine beeinflusst, wird vermutet, daß der Erreger besser kolonisieren und mehr CT freisetzen kann, wenn die Konzentration an Gallensäuren im Dünndarm niedrig ist (185).

## **2. Virulenzassoziierte Gene und mobile genetische Elemente von *V. cholerae***

Die Pathogenese der Cholera ist ein komplexer Prozeß, und es bedarf mehrerer bakterieller Faktoren und einer koordinierten Regulation dieser Faktoren, um den menschlichen Dünndarm zu besiedeln, dort zu persistieren und zu replizieren, bevor es durch die CT-Freisetzung zur klinischen Symptomatik der Cholera kommt. Intensive genetische Analysen in den letzten Jahren haben zum besseren Verständnis dieses Prozesses beigetragen. Charakteristisch für *V. cholerae* ist, daß das Genom aus zwei zirkulären Chromosomen besteht (211). Das Genom des *V. cholerae* O1 El Tor Stammes N16961 wurde sequenziert und die Daten stehen seit kurzer Zeit der Öffentlichkeit zur Verfügung. In diesem Stamm besteht das größere Chromosom aus ungefähr 2,961 Mbp (2770 ORFs) und das kleinere Chromosom aus 1,072 Mbp (1115 ORFs). Der GC-Gehalt beträgt bei beiden Chromosomen etwa 47 % (85). Kontrovers diskutiert wird

momentan, ob es sich bei den beiden Replikons um zwei Chromosome handelt, oder ob das kleinere Replikon ein Megaplasmid darstellt (85, 211). Innerhalb dieser Arbeit wird das kleinere Replikon als Chromosom 2 bezeichnet. Basierend auf der Genomsequenz wird die Untersuchung von Genen, die für Virulenzfaktoren kodieren und die Charakterisierung von Stoffwechselwegen zukünftig vereinfacht. Einige Virulenzfaktoren sind bereits gut charakterisiert und werden im folgenden Kapitel (2.1.) kurz vorgestellt.

Andere *V. cholerae* Isolate können aber durchaus abweichende Genomsequenzen besitzen, das Ausmaß der Vielfältigkeit wurde in den letzten Jahren deutlich. Molekular-epidemiologische Studien haben z.B. gezeigt, daß sich klinische *V. cholerae* Isolate häufig von Umweltisolaten durch das Vorhandensein von zusätzlichen größeren Genbereichen unterscheiden (108, 109). Einige dieser chromosomalen Genbereiche können durch horizontalen Gentransfer übertragen werden und sind essentiell für die Pathogenität oder erhöhen die Fitness von pathogenen Stämmen. Beispiele hierfür sind das Genom des filamentösen Phagen CTX $\Phi$ , der u.a. für das CT kodiert (218); die Pathogenitätsinsel VPI, die u.a. für Kolonisierungsfaktoren kodiert (110); das *rfb*-Gencluster, das für das O-Antigen kodiert (148) oder CONSTIN, ein konjugatives Transposon, das Antibiotikaresistenzgene trägt (94). Die Ursache der Genomplastizität innerhalb von *V. cholerae* Arten kann neben dem Erwerb von Genen durch horizontalen Transfer auch das Rearrangement von Genen innerhalb des Genoms sein. Paradebeispiel für die Genomplastizität innerhalb pathogener Stämme sind die beiden *V. cholerae* O1 Biotypen (Klassisch und El Tor), die evolutiv vermutlich unabhängig voneinander aus apathogenen *V. cholerae* Stämmen entstanden sind (26, 108). Im Kapitel 2.2. werden einige der bisher bekannten mobilen Elemente etwas näher beschrieben.

## 2.1. Virulenzfaktoren

### 2.1.1. Toxine

Die Gene *ctxAB*, die für das Cholera toxin (1.2.2.) kodieren, sind auf dem sogenannten CTX-Element lokalisiert (165), das einem Teil des Genoms des lysogenen filamentösen Phagen CTX $\Phi$  entspricht (vgl. II 2.2.1.). Das CTX-Element liegt in O1 El Tor Stämmen häufig geclustert in mehrfacher Kopie auf Chromosom 1, während es in dem O1 Klassischen Stamm O395 sowohl auf Chromosom 1 als auch auf Chromosom 2 vorkommt (211) und in den meisten Umweltisolaten aller Serogruppen komplett fehlt.

Für zwei weitere Proteine, Zot und Ace die ebenfalls vom CTX-Element kodiert werden, konnte eine toxische Wirkung auf eukaryotische Zellen „in vitro“ nachgewiesen werden. Zot bewirkt eine Aktinpolymerisation und die Auflockerung von „tight junctions“ (59), während Ace die Sekretion von Ionen stimuliert (210). Beide Proteine sind nachweislich an der Morphogenese des filamentösen Phagen CTX $\Phi$  beteiligt (218), deshalb wird eine Virulenzfunktion häufig in Frage gestellt (56). Für eines der Proteine (Zot) wurden aber Hinweise auf eine Doppelfunktion

gefunden. So wird vermutet, daß ein in der äußeren Membran lokalisiertes 33 kDa großes N-terminales Fragment am Zusammenbau des Phagen beteiligt ist, während ein C-terminales Spaltprodukt von Zot freigesetzt wird und an die Darmepithelzellen bindet (213).

Es wurden noch weitere potentielle Toxine beschrieben, die für die Auslösung von Durchfallerkrankungen durch einige *V. cholerae* O1 El Tor-Impfstämme und klinische Isolate der CTX-Element negativen *V. cholerae* aller Serogruppen, verantwortlich gemacht werden. Dazu zählen z.B. das RTX-Toxin, das „in vitro“ cytotoxische Aktivität auf HEp-2 Zellen besitzt. Das Gen *rtxA*, das für das RTX Strukturprotein kodiert, liegt in einem Gencluster mit drei weiteren Genen (*rtxBCD*), die ebenfalls essentiell für die cytotoxische Aktivität sind. O1 Klassische Stämme besitzen eine Deletion innerhalb des Genclusters und können dieses Toxin nicht exprimieren (130). Desweiteren wurde ein Hämolysin (*hlyA*) beschrieben, das wiederum nicht von O1 Klassischen Stämmen, aber auch nicht von allen O1 El Tor-Stämmen exprimiert wird (107) und „in vitro“ die Bildung von Vakuolen in HeLa-Zellen induziert (147). Die Bedeutung für die Pathogenese ist aber bisher unklar, da Impfstämme, in denen *hlyA* zusätzlich zum CTX-Element deletiert wurde, immer noch Durchfallerkrankungen verursachen konnten (107). In einigen *V. cholerae* Stämmen, die nicht der Serogruppe O1 oder O139 angehören, wurde das hitzestabile Toxin ST für Durchfallerkrankungen verantwortlich gemacht (10). Das korrespondierende Gen *sto* ist flankiert von 124 bp „direct repeats“, was die Integration in das Integron (vgl. 2.2.1.) erlaubt (139).

### 2.1.2. Kolonisierungsfaktoren

Der Begriff Kolonisierung beinhaltet die Fähigkeit von *V. cholerae* im Darm überleben, persistieren, replizieren und adhären zu können. Pili-Strukturen sind mögliche Adhärenzfaktoren, die häufig die Bindung pathogener Bakterien an Wirtsrezeptoren ermöglichen (64). In klinischen O1 El Tor Isolaten wurden drei Genregionen (*msh*, *pil*, *tcp*) identifiziert, die potentiell für drei verschiedene Typ IV Pili kodieren. Die Pili Pil (69) und MSHA sind nicht essentiell für die Kolonisierung des Dünndarms neugeborener Mäuse (9). Dagegen können Mutanten, die keine TCP Pili synthetisieren, den menschlichen Darmtrakt nicht kolonisieren und somit auch keine Cholera auslösen (90). Bisher konnte aber noch keine spezifische Bindung der TCP Pili an Wirtsstrukturen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß sie indirekt an der Adhäsion an die Darm-Mukosa beteiligt sind, indem sie die Bildung von *V.cholerae*-Mikrokolonien aufgrund von Pilus-Pilus Interaktionen induzieren. Diese Aggregate könnten unspezifisch an Darmepithelzellen binden, Schutz vor antimikrobiellen Substanzen bieten und dadurch die Persistenz im Dünndarm gewährleisten (117).

Hinweise auf die Beteiligung weiterer Kolonisierungsfaktoren wurden im Mausmodell gefunden. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Mutanten isoliert, die den Dünndarm von neugeborenen Mäusen im direkten Vergleich mit dem parentalen Wt-Stamm nicht effizient besiedeln konnten (118). Die genaue Rolle der Faktoren im Kolonisierungsprozeß ist nicht

immer offensichtlich und teilweise nicht bekannt. Einige Bsp. sind: Das AM-Protein OmpU, dessen Synthese im Darmtrakt stimuliert wird und vermutlich für die Kolonisierung essentiell ist, da es die Resistenz von *V. cholerae* gegenüber Gallensäuren erhöht (169); das AM IrgA, dessen Synthese unter Eisenmangel induziert wird (76); Proteine mit metabolischer Funktion z.B. BioB, das an der Biotinbiosynthese beteiligt ist oder PurH und PurB, die an der Purinbiosynthese beteiligt sind; der  $Mg^{2+}$ -Transporter MgtE (33); das O-Antigen von Stämmen mit der Serogruppe O1 (6, 33, 99, 219) und die Kapsel der *V. cholerae* Serogruppe O139 (219).

### 2.1.3. Weitere Virulenzfaktoren

*V. cholerae* besitzt eine polare Flagelle, die von der AM umhüllt ist. Die Flagelle scheint für die Pathogenese wichtig, da z.B. nicht-motile Impfstämme zwar noch kolonisieren aber kaum noch Durchfallerkrankungen hervorrufen (113). Allerdings ist die exakte Funktion bisher nicht bekannt, einige Hinweise deuten an, daß nicht die Flagellenstruktur sondern die Beweglichkeit ausschlaggebend ist, wahrscheinlich für eine effektive schnelle Durchquerung der Darmschleimschicht (107).

Für die Sekretion des CT ist ein TypII Sekretionssystem verantwortlich, wobei das CT zunächst über den „Sec-Apparat“ in das Periplasma exportiert wird und von dort über den EPS-Proteinkomplex ins extrazelluläre Milieu (181). Das *eps*-Gencluster umfasst 12 Gene (182). Das AM-Protein EpsD, das vermutlich einen Kanal bilden kann, ist auch an der Sekretion des Phagen CTX $\Phi$  (44), der Ausbildung der Flagelle und der Produktion des VPS (2) sowie an der Sekretion der extrazellulären Proteine Chitinase und HA-Protease beteiligt (182). Die HAP ist ebenfalls ein potentieller Virulenzfaktor, die „in vitro“ Fibronectin, Muzine und Lactoferrin sowie die A-UE des CT spalten und damit aktivieren kann (107). Desweiteren inaktiviert HAP den Phagen CTX $\Phi$  über einen bisher nicht genau bekannten Mechanismus (116).

*V. cholerae* besitzt zudem Gene, die unter „in vivo“ Bedingungen exprimiert werden und die Versorgung mit Eisen während der Infektion gewährleisten (186). So wird z.B. die Synthese des Siderophors Vibrobactin und der Aufnahmesysteme für Hämin und Hämoglobin aktiviert (107). Einige der Gene, deren Produkte an der Eisenaufnahme beteiligt sind, sind in doppelter Ausführung auf Chromosom 1 und 2 zu finden (85). Teilweise wurde bereits experimentell gezeigt, daß jeweils beide Genkopien für funktionsfähige Produkte kodieren (162).

### 2.1.4. Regulation der Expression von Virulenzgenen

Die Regulation der Expression einiger Virulenzfaktoren, u.a. auch des TCP und CT, erfolgt koordiniert durch globale Genregulation. Die Expression dieser Faktoren wird dabei durch unterschiedliche Umweltstimuli wie z.B. Temperatur, Osmolarität, pH,  $CO_2$ -Gehalt oder der Anwesenheit von Gallensäuren und Aminosäuren beeinflusst (190). Die momentane Vorstellung, wie die korrespondierenden Gene auf Transkriptionsebene reguliert werden, ist in Abb. 2

dargestellt. Diese Regulationskaskade wird aus historischen Gründen auch als „ToxR-Regulon“ bezeichnet.

Die Transkription des *ctxAB* und *tcpA-F*-Operons wird direkt aktiviert durch ToxT, einem AraC-homologen Regulator. In Anwesenheit von ToxT wird gleichzeitig die Motilität über einen bisher unbekanntem Weg gehemmt (190). Die Transkription von *toxT* selbst wird in Abhängigkeit von Umweltstimuli reguliert, dabei sind zwei Protein-Paare beteiligt, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind: TcpP/TcpH und ToxR/ToxS. ToxR ist ein Transkriptions-Aktivator, der über seine cytoplasmatisch lokalisierte Domäne direkt an spezifische DNA-Sequenzen binden kann. Die Aktivität und Stabilität von ToxR wird durch Interaktion der periplasmatischen Domäne mit ToxS beeinflusst (48). ToxS/ToxR aktiviert auch die Transkription von *ompU* und reprimiert *ompT*. Die Expression der AM-Porine OmpU und OmpT wird dadurch reziprok reguliert (190). Zudem ist ToxS/ToxR an der Resistenz gegenüber schwachen organischen Säuren über einen bisher unbekanntem Weg beteiligt (142). Das zweite in der Cytoplasmamembran lokalisierte Proteinpaar, TcpP/TcpH, aktiviert vermutlich über einen ähnlichen Mechanismus wie ToxR/S ebenfalls die Transkription von *toxT* (84). Eine weitere Komplexität entsteht durch die Regulation der Transkription von *tcpPH*. Dabei aktivieren die beiden cytoplasmatische Proteine AphA und AphB synergistisch die Transkription von *tcpPH* (123).

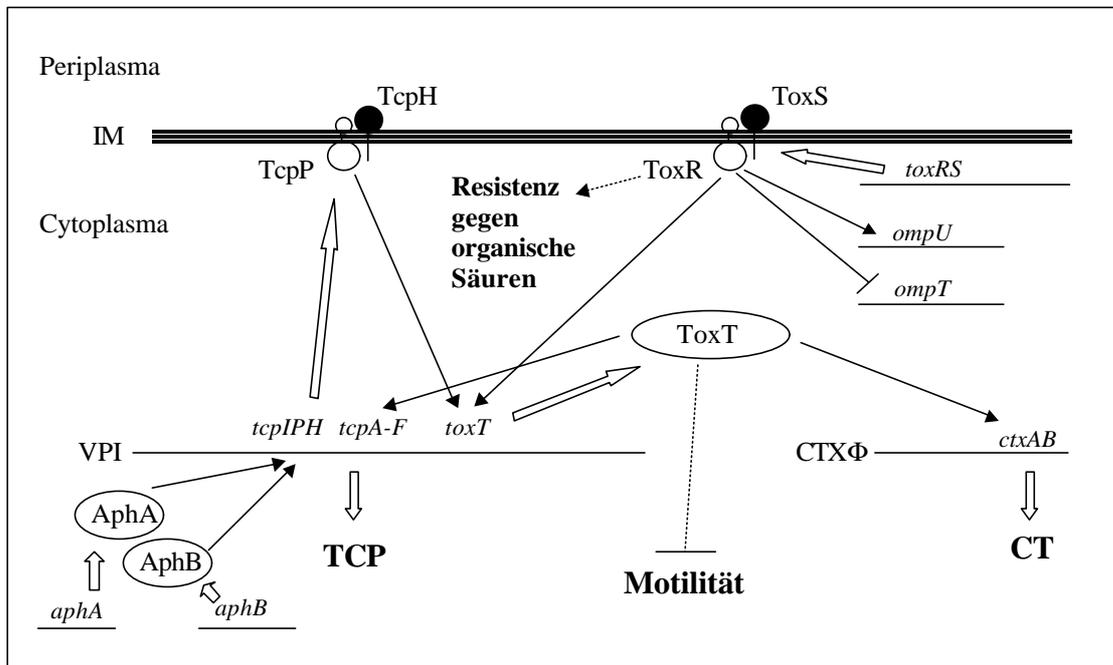


Abb. 2: **Das ToxR Regulon.** Die chromosomalen DNA-Bereiche sind als horizontale Linien im Bereich „Cytoplasma“ dargestellt und deuten an, daß die Gene chromosomal nicht gekoppelt sind. Beteiligte Gene, die entweder auf der Pathogenitätsinsel VPI oder auf dem Genom des Phagen CTXΦ lokalisiert sind, sind gekennzeichnet. Blockpfeile deuten die Synthese des entsprechenden Proteins oder der resultierenden Struktur an. Pfeile kennzeichnen die Aktivierung der Transkription durch das entsprechende Regulatorprotein, während —| eine Repression andeutet. Gestrichelte Linien deuten einen positiven oder negativen Effekt auf ein Phänotyp an, wobei der genaue Weg und die beteiligten Proteine noch unbekannt sind. Weitere Erklärungen auch im Text.

Dieses komplexe Regulationssystem der Transkription der Virulenzgene *tcpA* und *ctxAB*, erlaubt *V. cholerae* auf verschiedene Umweltsignale zu reagieren und gewährleistet die Transkription unter verschiedenen Bedingungen. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß „in vivo“ der Ausfall von ToxR oder TcpPH kompensiert werden kann und die Expression von *tcpA* gewährleistet ist, während in Abwesenheit beider Regulatoren die TCP-Pili nicht mehr exprimiert werden (127). Eine weitere Feinregulation der Expression der Virulenzgene wird erreicht durch: (I) Modulation der ToxT-Aktivität durch Umweltsignale (z.B. Temperatur oder Gallensäuren) (185), (II) Repression der Transkription durch cAMP/CRP über einen unbekanntes Weg (191), (III) Repression der Transkription von *toxT*, *tcpA* und *ctxAB* durch H-NS, einem histonähnlichen Protein (160).

Die Expression der Virulenzfaktoren unterscheidet sich in klassischen und El Tor Stämmen „in vitro“. In klassischen Stämmen werden CT und TCP z.B. gut exprimiert bei 30° C in LB-Medium pH 6,6, während die Expression in El Tor Stämmen unter diesen Bedingungen reprimiert ist (72). In El Tor Stämmen konnten bisher keine optimalen „in vitro“ Bedingungen gefunden werden, eine Expression von CT und TCP ist aber bei 37° C in AKI-Medium möglich (140). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß der Unterschied hauptsächlich auf eine Punktmutation im Promotorbereich von *tcpPH* zurückzuführen ist, El Tor-Stämme können deshalb nicht effektiv durch AphB aktiviert werden (123; vgl. Abb. 2).

## 2.2. Mobile genetische Elemente

### 2.2.1. Horizontal übertragbare Elemente

#### *Pathogenitätsinsel*

Als VPI wird ein 39,5 kb großer chromosomaler Bereich auf Chromosom 1 bezeichnet, der durch horizontalen Gentransfer übertragen werden kann (109, 110). Es gibt zudem Hinweise, daß es sich bei dieser Pathogenitätsinsel um das Genom eines filamentösen Phagen handeln könnte (110). Charakteristisch für die VPI sind ein GC-Gehalt von 35 %, die Begrenzung durch „att-sites“ sowie das Vorhandensein von ORFs, die für eine putative Integrase und zwei bisher nicht charakterisierte putative Transposasen kodieren (85, 109). Die VPI kodiert weiterhin für den Pilus TCP und die regulatorischen Proteine ToxT, TcpP und TcpH; Faktoren, die für die *V. cholerae*-Pathogenese essentiell sind (vgl. 2.1.). Daneben ist das ACF-Gencluster auf der VPI lokalisiert, dessen Proteinprodukte an der Kolonisierung beteiligt sind (164). Die von der VPI exprimierten Proteine AldA (Aldehyd Dehydrogenase) und TagA (ein Lipoprotein) scheinen dagegen an metabolischen Prozessen beteiligt zu sein und für weitere putative ORFs ist die Funktion bisher unbekannt (109). Der Erwerb der VPI und die damit verbundene Synthese der Pili TCP ist für die Entstehung pathogener *V. cholerae* von großer Bedeutung, da die Pili sowohl die Kolonisierung des Darms, als auch den effizienten Erwerb des CT-kodierenden Phagen CTX $\Phi$  ermöglichen.

### *rfb*-Gencluster

Bisher wurden für *V. cholerae* 193 verschiedene Serogruppen beschrieben. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß viele Serogruppen Teile des O-Antigen-Biosynthese-Genclusters (*rfb*) gemeinsam haben, andere dagegen nicht verwandt sind (19, 238). Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß das *rfb*-Gencluster horizontal übertragen werden kann und Hybridstrukturen durch Rekombinationsereignisse entstehen können. Der Mechanismus des Gentransfers, evtl. auch zwischen verschiedenen Familien, ist bisher nicht geklärt, theoretisch aber über generell transduzierende Phagen (vgl. 2.2.3.) oder konjugative Plasmide/Transposons (vgl. Abschnitt weiter unten) erklärbar. Die homologe Rekombination innerhalb *V. cholerae* kann einerseits über flankierende Bereiche des *rfb*-Genclusters erfolgen, die in bisher allen untersuchten Serogruppen identisch waren (194). Andererseits aber auch über homologe interne DNA-Bereiche, dazu zählen z.B. auch IS-Elemente, die häufig mit der *rfb*-Genregion assoziiert sind. Können auf diese Weise neu entstandene *rfb*-Gencluster ein O-Antigen synthetisieren, besitzt die neue Serogruppe eventuell einen Selektionsvorteil. Beispiele hierfür sind pathogene *V. cholerae* der Serogruppe O139, die nahe verwandt sind mit *V. cholerae* O1 El Tor-Stämmen und in Indien/Bangladesh Epidemien auslösen konnten - einem Gebiet in dem viele Menschen immun sind gegen O1-Stämme. Ein weiteres Beispiel könnte ein klinisches Isolat der Serogruppe O37 sein, das 1968 für einen größeren Ausbruch an choleraähnlichen Durchfallerkrankungen im Sudan verantwortlich war. Dieses Isolat exprimiert sowohl die Pili TCP als auch das CT und könnte laut genetischen Analysen aus pathogenen O1 klassischen Stämmen entstanden sein (148).

### *Integron*

Das Integron-System ist ein Beispiel dafür wie horizontal übertragene Gene in das *V. cholerae*-Chromosom integriert werden können. Das 125,3 kb große Integron des O1 El Tor Stammes N16961 ist auf Chromosom 2 lokalisiert und umfaßt 216 ORFs (85). Das Integron besteht dabei aus mehreren Genkassetten, die von einer 123-126 bp langen sich wiederholenden Region (VCR = „*V. cholerae* repeat“) flankiert sind. Im 5'-Bereich des Integrons ist eine Integrase (IntI4) und eine „attI-site“ lokalisiert, die die Rekombination der Genkassetten über die VCR in das Integron erlauben (139). Innerhalb des Integrons des Stammes N16961 befinden sich u.a. die Gene *mrhAB*, die für ein an der Kolonisierung beteiligtes Hemagglutinin (MFRHA) kodieren (67) und Gene, deren Produkte Antibiotikaresistenz vermitteln (85). Die Funktion der meisten ORFs ist jedoch unbekannt. In einigen Nicht-O1/O139 Stämmen wurde auf dem Integron das Gen *sto* nachgewiesen, das für das Toxin ST kodiert (vgl. 2.1.) (10). Das Integron-System ist innerhalb verschiedener *Vibrio* Spezies weit verbreitet und wurde z.B. auch in einem *V. metschnikovii* Isolat von 1888 nachgewiesen (139). Der Mechanismus des Transfers der Genkassetten ist noch nicht geklärt.

### Plasmide

Ein 4,7 kb großes kryptisches Plasmid wurde kürzlich beschrieben, daß in allen pathogenen Stämmen vorhanden ist und in das Chromosom integrieren kann. Das Plasmid kodiert u.a. für ein Protein, das aufgrund von Homologien zu bekannten Proteinen an der Replikation von filamentösen Phagen beteiligt sein könnte. Die Autoren vermuten, daß es eventuell eine Funktion für die Verbreitung des Phagen CTX $\Phi$  haben könnte (180). Weiterhin wurden konjugative Plasmide für *V. cholerae* beschrieben. Das P-Plasmid kann z.B. chromosomale Gene mobilisieren, wird aber selten in pathogenen Stämmen gefunden, da es die Pathogenität supprimiert (11). Die großen selbstmobilisierbaren R-Plasmide (110-170 kb) sind innerhalb von *V. cholerae* Isolaten aller Serogruppen weit verbreitet. Diese Plasmide tragen hauptsächlich Antibiotikaresistenzgene und besitzen teilweise ein Klasse I Integron, das ihnen die Aufnahme weiterer Gene erlaubt (43).

### Konjugative Transposons

Innerhalb von klinischen *V. cholerae* O139 Isolaten ist das 62 kb große konjugative Transposon CONSTIN weit verbreitet, das u.a. die genetische Information zur Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika trägt und site-spezifisch in das Chromosom integriert. Dieses selbstmobilisierbare Element kodiert u.a. für eine Integrase, die an der spezifischen Integration und Exzision in das chromosomale Gen *prfC* beteiligt ist (94). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß dieses Element in *E.coli* in der Lage ist, zu *prfC*-benachbarte Genbereiche (500 kbp 3' von *prfC*) horizontal zu übertragen (93).

### 2.2.2. IS-Elemente

IS-Elemente tragen ebenfalls zur Genomplastizität bei. Diese relativ kleinen Elemente besitzen normalerweise nur die Information, die sie für ihre Translokation benötigen. Durch die Transposition in entsprechende DNA-Bereiche entstehen häufig Mutationen. Sind mehrere Kopien eines IS-Elementes im Chromosom vorhanden, können sie ein Substrat für homologe Rekombinationsprozesse sein und zu DNA-Rearrangements wie Deletionen, Inversionen, Fusionen oder Duplikationen beitragen (134). Für *V. cholerae* O1 wurden bisher keine aktiven IS-Elemente beschrieben, zwei verschiedene IS-Elemente wurden aber etwas näher charakterisiert, die im folgenden kurz beschrieben werden. Im Genom des sequenzierten O1 El Tor Stammes N16961 wurden noch weitere potentielle, bisher aber nicht charakterisierte IS-Elemente gefunden, die teilweise in mehrfacher Kopie vorliegen.

Das 1326 bp lange IS1358 mit 16 bp „inverted repeats“ und einem ORF kommt nur in einfacher Kopienzahl im *rfb*-Gencluster von O1 Isolaten vor. Es ist inaktiv aufgrund von zwei Stopcodons innerhalb des Gens, das für die putative Transposase kodiert (200). In Isolaten anderer Serogruppe wurden entweder keine oder mehrfache Kopien an IS1358 nachgewiesen, z.B. eine Kopie im *rfb*-Gencluster der Serogruppe O139 (19, 51). Aus O22 wurde kürzlich ein funktionsfähiges IS1358 kloniert und „in vitro“ gezeigt, daß die Transposition direkt

(nichtreplikativ) mit einer Frequenz von ca.  $10^{-8}$  erfolgt und an der Insertionsstelle 10 bp dupliziert werden (51). Dieses Element wurde häufig in Zusammenhang gebracht mit dem beobachteten Serogruppenwechsel von pathogenen O1 El Tor zu pathogenen O139-Stämmen, da es in den *rfb*-Genclustern beider Serogruppen lokalisiert ist (19, 199).

Bei IS1004 handelt es sich dagegen um ein 628 bp großes Element, das in mehrfacher Kopie in O1 Stämmen gefunden wurde. In O1 El Tor und O139 Stämmen wurden vier bis fünf und in O1 Klassischen Stämmen sechs bis sieben Kopien nachgewiesen. In Isolaten anderer Serogruppen wurden entweder keine oder bis zu acht IS1004 detektiert, ihr *HpaII*-Fingerprint ist jedoch deutlich von den klinischen Isolaten der Serogruppen O1 und O139 zu unterscheiden. Da dieses IS-Element als relativ stabil angesehen wird, wird es als Marker für die Identifikation epidemischer Stämme vorgeschlagen (20).

### 2.2.3. Phagen

Bakteriophagen wurden 1915 durch Frederick Twort und 1917 durch Felix d'Herelle unabhängig voneinander entdeckt. 1926 wurde von d'Herelle der erste *Vibrio*-Phage beschrieben und bereits 1927 setzte er lytische *Vibrio*-Phagen therapeutisch in Indien gegen die Cholera ein (204). Seit dieser Zeit wurden viele verschiedene *Vibrio*-Phagen beschrieben, die teilweise auch aus Oberflächengewässern und Stuhlproben Infizierter isoliert werden konnten. Einige dieser Phagen wurden genauer charakterisiert und werden bis heute zur Typisierung von *V. cholerae* Stämmen eingesetzt (179). Ein Beispiel dafür sind die temperenten Phagen der Kappa Familie, die durch folgende Kriterien definiert wurde: Morphologie des Phagen (Bradley Gruppe A) und Wirtsspezifität (*V. cholerae* O1 El Tor) (1, 28, 205, 206). In einer groß angelegten Studie konnte gezeigt werden, daß von 43 000 klinischen *V. cholerae* O1 El Tor Isolaten 56 % Phagen dieser Familie tragen (7). Ein direkter Zusammenhang zwischen *V. cholerae* Pathogenese und Kappa-Phagen Lysogenie konnte jedoch nicht hergestellt werden. Als nachgewiesen wurde, daß auch klinische Isolate der Serogruppe O139 Kappa-Phagen enthalten, wurde dies als zusätzliches Indiz gewertet, daß die Serogruppe O139 aus pathogenen O1 El Tor Stämmen entstanden war (91). Der Phage K139, der aus einem klinischen O139 Stamm isoliert wurde, zählt zur Familie der Kappa-Phagen und wurde auch molekularbiologisch untersucht (vgl. 2.2.3.2.).

Andere *Vibrio*-Phagen wurden für genetische Analysen eingesetzt, so z.B. die Phagen VcA-1, VcA-2 und VcA-3, die zufällig in das Chromosom integrieren (Mutatorphagen) und deshalb früher zur Erzeugung von Mutanten verwendet wurden. Es wurden auch *Vibrio*-Phagen beschrieben, die zur generalisierten Transduktion befähigt sind und damit ebenfalls zum horizontalen Gentransfer zwischen *V. cholerae* Stämmen beitragen können (79). Dazu zählt z.B. der lytische *Vibrio*-Phage CP-T1, der an das O-Antigen der Serogruppe O1 bindet und O1 Klassische, O1 El Tor und O37-Isolate infizieren kann (27, 78). „In vitro“ konnte gezeigt werden, daß über CP-T1 z.B. die CT-kodierenden Gene *ctxAB* effektiv transduziert werden können (27). Die CT-kodierenden Gene werden aber vor allem über den filamentösen Phagen

CTX $\Phi$  transduziert. Dieser Phage ist der bisher am besten charakterisierte *Vibrio*-Phage und wird anschließend kurz vorgestellt.

### 2.2.3.1. Der filamentöse Phage CTXF

Der filamentöse (+) einzelsträngige DNA-Phage CTX $\Phi$  kann entweder „site-spezifisch“ ins Chromosom integrieren oder in Abwesenheit einer chromosomalen „att-site“ als Plasmid replizieren (218). Liegt das Phagengenom als Plasmid vor (RF-Form), so wird das CT konstitutiv in geringen Mengen exprimiert, kann aber zusätzlich durch das ToxR-Regulon induziert werden (2.1.4.) (126). Die Infektion des Phagen CTX $\Phi$  beginnt mit der Bindung an den bakteriellen Rezeptor, die Pili TCP (218). Der weitere Infektionsweg hängt von der Anwesenheit der bakteriellen Proteine TolaQR ab (86). „In vitro“ kann mit einer sehr geringen Frequenz CTX $\Phi$  TCP-unabhängig transduziert werden (57, 86).

Das Phagengenom besteht aus dem RS2-Element und dem CTX-Element, das in pathogenen Stämmen immer CT positiv ist - nicht alle CTX $\Phi$  kodieren für das Cholera toxin und es bisher nicht klar, woher die Gene *ctxAB* ursprünglich stammen (26). In den meisten Stämmen ist das CTX-Element zusätzlich von einem oder mehreren RS1-Elementen flankiert (Abb. 3). Das RS-Element kodiert für CTX $\Phi$ -spezifische Funktionen, u.a. für einen Repressor (*rstR*), der die Transkription von *rstAB* reguliert. Bisher wurden drei verschiedene Repressortypen gefunden (45), die jeweils die Neuinfektion von CTX $\Phi$  des gleichen Repressortyps verhindern (115). Weiterhin wird von dem RS-Element eine Integrase (*rstB*) kodiert und ein Protein, das für die Replikation der RF-Form essentiell ist (*rstA*). Das RS1-Element besitzt zusätzlich *rstC*, dessen Funktion bisher unbekannt ist (222). Das CTX-Element kodiert neben dem CT für fünf Proteine (Psh, Cep, OrfU, Ace, Zot), die für die Phagenmorphogenese benötigt werden. Psh, Cep, OrfU und Ace sind vermutlich Hüllproteine, während Zot am Phagenzusammenbau beteiligt ist (26, 218).

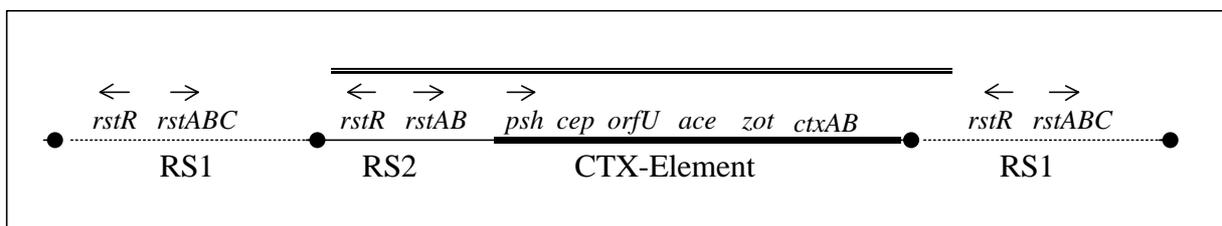


Abb. 3: Chromosomale Anordnung um das CTX-Element im *V. cholerae* O1 El Tor Stamm P27459 (26, 218). Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung, ausgefüllte Kreise die chromosomale att-site. Mit einer Doppellinie ist angedeutet, aus welchen chromosomalen Bereichen das Genom eines neu synthetisierten Phagen besteht (45).

Die meisten lysogenen O1 El Tor und O139 Stämme bilden im Gegensatz zu O1 klassischen Isolaten CTX $\Phi$  Phagen-Partikel (45). Die Phagenkonzentration ist in Anwesenheit externer Stimuli, „in vitro“ z.B. Mitomycin C oder UV-Licht (218) und „in vivo“ Sonnenlicht (58), stark

erhöht. Dabei wird CTX $\Phi$  ins extrazelluläre Milieu über das AM-Protein EpsD (vgl. 2.1.) sekretiert ohne die Zellen zu lysieren (44). Die Synthese neuer Phagenpartikel erfolgt vermutlich über die RF-Form, wobei es aber nicht zur Exzision des chromosomalen RS2- und CTX-Elements über die att-sites kommt, sondern vermutlich zur Replikation des chromosomalen Bereiches. Interessanterweise erfolgt die DNA-Synthese über 2 RS-Elemente (Abb. 3). Das Vorhandensein einer zweiten RS-Site 3' vom CTX-Element ist deshalb zwingend für die Synthese von CTX $\Phi$  (45).

### 2.2.3.2. Der temperente Phage K139

Der temperente Phage K139 (Abb. 4) wurde ursprünglich aus einem Isolat der *V. cholerae* Serogruppe O139 isoliert (173). Dieser Phage, der Ähnlichkeiten zu Phagen der Kappa Familie besitzt, ist innerhalb von klinischen O139 und O1 El Tor Isolaten weit verbreitet und kommt in O1 Klassischen Stämmen als defekter Prophage vor (158, 173). Charakteristisch ist, daß im Gegensatz zu den meisten nichtlysoenen O1 Stämmen keine O139 Stämme mit K139 infiziert werden können. Diese Serogruppenspezifität deutet an, daß das LPS der Rezeptor sein könnte (173). Die Integration von K139 erfolgt spezifisch über eine 24 bp lange „att-site“ in eine nicht-kodierende Region zwischen den Flagellengen *flaA* und *flaC* (158).



Abb. 4: **Elektronenmikroskopische Aufnahme des Phagen K139.** Die Abbildung wurde entnommen aus (173).

Das K139-Genom besteht aus einem ungefähr 35 kb großen doppelsträngigen, linearen DNA-Molekül, das terminal redundante Enden besitzt (173). 5 kb der Kontrollregion des Phagen K139 wurden sequenziert und die Sequenzauswertung ergab Homologien zu Phagen der P2-Familie. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten der Proteine und der Anordnung der ORFs und Promotoren könnte ein ähnlicher Regulationsmechanismus bei der Etablierung der Lysogenie und der Kontrolle der Lyse erfolgen, wie bei den beiden relativ gut charakterisierten Phagen HP1 (*Haemophilus influenzae*) und 186 (*E. coli*) der P2-Familie möglich sein (158).

In der Kontrollregion des Phagen K139 sind zwischen *cI* (kodiert für den vermutlichen Repressor der lytische Gene) und *int* (kodiert für die potentielle Integrase) zwei weitere ORFs lokalisiert, die während der Lysogenie transkribiert werden: Orf2 und *glo*. *glo* kodiert für ein periplasmatisches Protein, das die Reinfektion von K139 in eine bereits lysogene Zelle herabsetzt („superinfection exclusion“) (158). Eine Mutation in *glo* in einem K139-lysogenen O1 El Tor Stamm verminderte die Virulenzfähigkeit (LD<sub>50</sub>) dieses Stammes in neugeborenen Mäusen (173). Der Grund für diese Beobachtung ist noch nicht geklärt. Für eine direkte Beteiligung des Proteins Glo an der Pathogenität fehlen bisher gezielte Hinweise, deshalb ist momentan auch nicht auszuschließen, daß der beobachtete Effekt auf eine verstärkte Lyse durch reinfizierenden Phagen zurückzuführen ist (158).

### 3. Lipopolysaccharid

#### 3.1. Funktion und Biosynthese des LPS in Gram-negativen Bakterien

Das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien ist der Hauptbestandteil der AM und besteht aus funktionell drei distinkten Regionen: das Lipid A, das Kernoligosaccharid und das O-Antigen. Das Lipid A ist der Lipid-Anker des LPS und ist hochkonserviert innerhalb Gram-negativer Bakterien. Es ist essentiell für die Lebensfähigkeit fast aller Gram-negativen Bakterien, einzige bekannte Ausnahme ist *Neisseria meningitidis*, das ohne LPS eine AM bilden kann (196). Der Lipid A-Anteil ist gleichzeitig eine toxische Komponente und wird auch als Endotoxin bezeichnet, da er Makrophagen/Monozyten aktivieren und eine Entzündungsreaktion auslösen kann. Erfolgt dies in der Blutbahn, kann es unter Umständen zur Sepsis kommen.

Das Kernoligosaccharid besitzt eine wichtige Funktion für die Integrität der AM Gram-negativer Bakterien und ist an der Ausbildung einer Barriere gegenüber hydrophoben Substanzen beteiligt. Die Struktur des Kernoligosaccharides ist innerhalb einer Familie relativ konserviert. In *E. coli* sind z.B. insgesamt nur fünf verschiedene Strukturen bekannt, die sich in der Zusammensetzung des äußeren Kernoligosaccharides minimal unterscheiden. Interessanterweise besitzen die meisten pathogenen *E. coli*, die extraintestinale Erkrankungen verursachen, denselben Kerntyp (R1). Ob diese Beobachtung jedoch in Zusammenhang mit einem möglichen Persistenzvorteil steht, ist bisher noch nicht geklärt (4).

Das O-Antigen ist die variabelste Komponente innerhalb einer Art. Wie schon erwähnt wurden z.B. für *V. cholerae* bisher 193 verschiedene O-Antigene beschrieben (236). Das O-Antigen bildet meistens eine hydrophile Oberfläche und interagiert mit der Umgebung, u.a. mit Komponenten des Immunsystems, und ist deshalb ein gutes Immunogen. Auf der anderen Seite erhöht das O-Antigen häufig die Virulenz eines pathogenen Bakteriums, indem es z.B. Serumresistenz oder Schutz vor Phagozytose vermittelt. Weiterhin wurde gezeigt, daß es auch an der Adhäsion an Wirtsstrukturen beteiligt sein kann, so bindet z.B. die Lewis X-Struktur des O-Antigens von *Helicobacter pylori* an die Mukosa des Magens (53).

Die Biosynthese von LPS Gram-negativer Bakterien erfolgt über mehrere Stufen. An der cytoplasmatischen Seite der Innenmembran werden das O-Antigen (an einem Fettsäureanker, dem C55-Carrier) und das Lipid A-Kernoligosaccharid zunächst getrennt synthetisiert. Nach Transport über die Innenmembran erfolgt die Ligation des O-Antigens an das Lipid A-Kernoligosaccharid an der periplasmatischen Seite der Innenmembran. Der Prozeß des Transportes der LPS-Moleküle durch das Periplasma und der der Einlagerung des LPS in die AM ist noch weitgehend ungeklärt. Die Gene/Operone für die Biosynthese des Kernoligosaccharides (*waa*) und die des O-Antigens (*rfb*) liegen häufig geclustert auf dem Chromosom. Diese Gene kodieren u.a. für Enzyme, die die Synthese aktivierter Kohlenhydrate katalysieren und für spezifische Transferasen, die die Übertragung der aktivierten Kohlenhydrate auf spezifische Strukturen ermöglichen. Einige aktivierte Kohlenhydrate, wie z.B. UDP-Glukose und UDP-Galaktose,

können an der Biosynthese mehrerer Oligo-/Polysaccharide (u.a. LPS, Kapsel, Exopolysaccharide) beteiligt sein. Speziell diese beiden aktivierten Kohlenhydrate sind zudem am Galaktoseabbau beteiligt. UDP-Glukose wird von der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (kodiert von *galU*) und UDP-Galaktose von der UDP-Glukose-Epimerase (kodiert von *galE*) synthetisiert (Übersichtsartikel zu 3.1.: 88, 103, 129, 159, 170, 232, 234).

### 3.2. *V. cholerae* LPS

Einige *V. cholerae* Serogruppen synthetisieren zusätzlich zum LPS ein Kapselpolysaccharid, so z.B. auch O139 Isolate. Das O-Antigen der Serogruppe O139 besteht aus einer Einheit aus 6 Kohlenhydraten und diese Einheit bildet auch das Kapselpolysaccharid (121). Die Ausbildung der Kapsel ist essentiell zur Besiedelung des Dünndarms durch O139 Stämme (219). Die Serogruppe O1 ist dagegen nicht bekapselt, damit ist das O-Antigen in der Serogruppe O1 vermutlich die äußerste Kohlenhydratstruktur während der Infektion. O1-Antigen negative Stämme kolonisieren in verschiedenen Tiermodellen wesentlich schlechter (12, 33, 137). Die exakte Rolle des O1 Antigen ist aber noch nicht geklärt, es gibt Hinweise auf Schutz vor dem angeborenen Immunsystem (219) und auf eine Beteiligung an der Adhärenz an die Darmmukosa (15, 35). Wie schon erwähnt, können sowohl O139 als auch O1 El Tor Stämme zusätzlich ein Exopolysaccharid (VPS) bilden, das für die Biofilmbildung essentiell ist (227, 239). Es ist aber eher unwahrscheinlich, daß das VPS bei der Pathogenese eine Rolle spielt, da z.B. Klassische Stämme unter bisher getesteten Bedingungen kein VPS exprimieren, aber Cholera verursachen (107, 226). O1 El Tor Stämme, die dieses VPS konstitutiv exprimieren sind aber weiterhin pathogen (152).

Die Struktur des LPS der *V. cholerae* Serogruppe O1 wurde aufgeklärt (Abb. 5). Das Kernoligosaccharid kann nicht wie bei den Enterobacteriaceae in einen äußeren und inneren Bereich eingeteilt werden (216) und ist nahezu identisch mit der Struktur des Kernoligosaccharides der Serogruppe O139 (121). Strukturdaten für weitere Serogruppen liegen nicht vor, so daß keine Aussage gemacht werden kann, ob alle *V. cholerae* Serogruppen dieselbe Kernoligosaccharid-Struktur besitzen, oder ob sich je nach ökologischer Nische z.B. Isolate aus der Umwelt und der Klinik unterscheiden. Die Biosynthese des Kernoligosaccharides wurde bisher weder genetisch noch biochemisch charakterisiert.

Das O-Antigen der Serogruppe O1 besteht aus einem linearen Homopolymer aus 16-18 Perosamin-UE, die mit Tetronat verestert sind (Abb. 5), und dem Kohlenhydrat Quinovosamin, dessen Bindungsort bisher unbekannt ist (200). Die Serogruppe O1 wird weiterhin in zwei Serotypen, Ogawa und Inaba, eingeteilt, die jeweils zum anderen Serotyp konvertieren können (137). Strukturell unterscheiden sich Inaba und Ogawa in der Methylierung des terminalen Perosamins (Abb. 5) (101). Die genetische Ursache für die Serotypkonversion wurde aufgeklärt. Inaba Stämme besitzen Punktmutationen in *wbeT* und können deshalb das Protein WbeT nicht mehr exprimieren, das die Methylierung katalysiert (203). Aufgrund des Mechanismus ist die

Frequenz der Serotypkonversion nicht hoch und sehr viel häufiger von Ogawa nach Inaba. Die Konversion zu einem anderen Serotyp kann aber während einer Epidemie stattfinden, dabei schützt die natürliche Immunität gegen Inaba vor Reinfektion mit Inaba und Ogawa, während eine natürliche Immunität gegen Ogawa meistens nicht vor einer Reinfektion mit Inaba schützt (137).

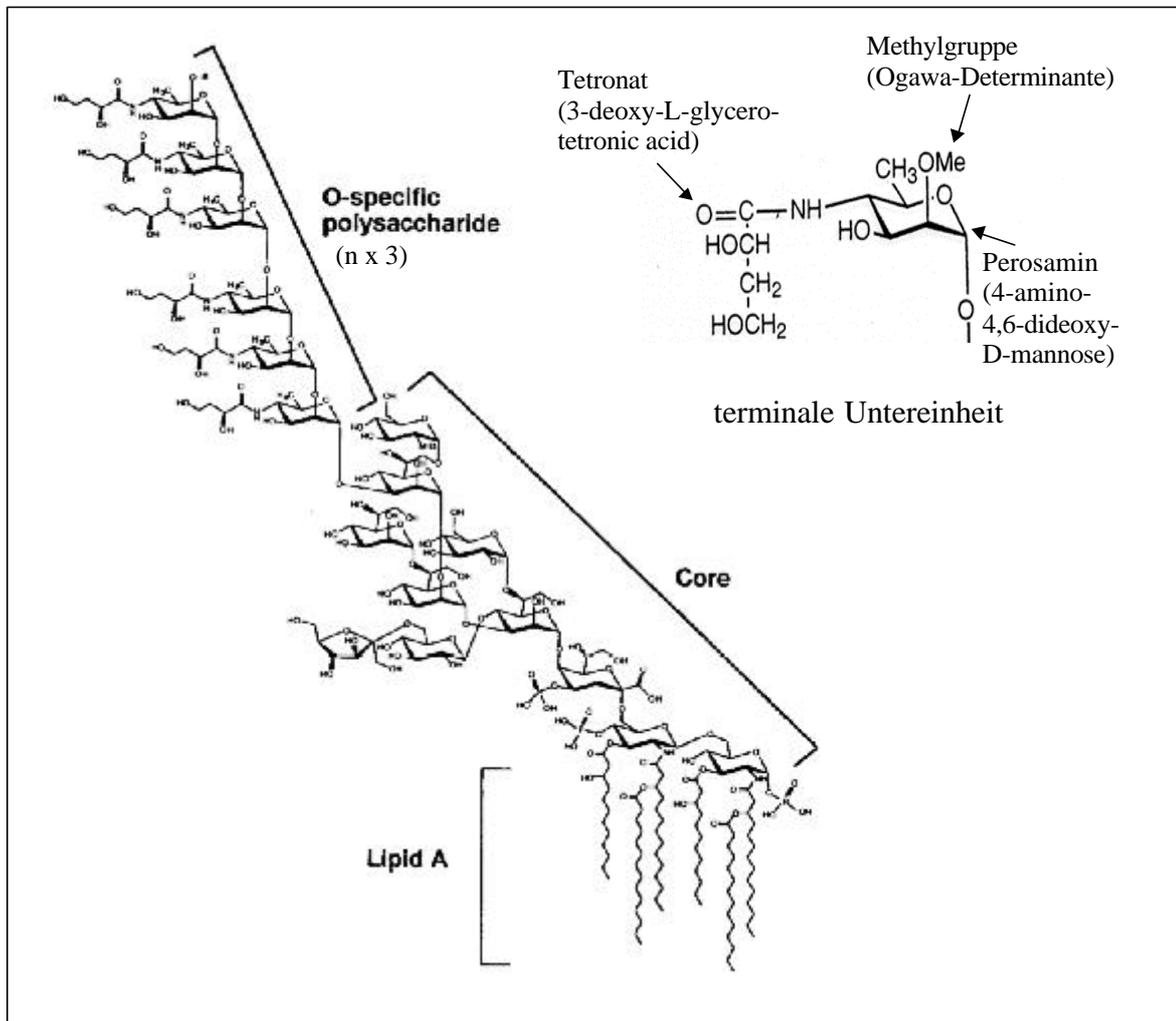


Abb. 5: **Struktur des *V. cholerae* LPS der Serogruppe O1.** Das Lipid A besteht aus dem Disaccharid P-GlcN( $\beta$  1-6)GlcN-1-PP-Etn das mit verschiedenen Fettsäuren verestert ist (137). Die Struktur des Kernligosaccharides ist in Abb. 19 B dargestellt. Das O-Antigen besteht aus einem Homopolymer von ungefähr 18 linear (1 $\rightarrow$ 2) verknüpften 4-(3-deoxy-L-glycero-tetramido)-4,6-Dideoxy-D-Mannose (112, 171) – vereinfacht: Perosamin verestert mit Tetronat. Zusätzlich ist noch Quinovosamin vorhanden, dessen Bindungsstelle aber bisher unbekannt ist und das hier nicht berücksichtigt ist (200). Die terminale Perosamin-Tetronat-Untereinheit kann entweder methyliert (Serotyp Ogawa) oder demethyliert (Serotyp Inaba) vorliegen. Die Abbildung wurde entnommen aus (215).

Das Biosynthese Gencluster (*rfb*) des O1-Antigens wurde bereits recht gut charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß diese Genregion für alle notwendigen Proteine kodiert, um die Synthese des O1-Antigens in *E. coli* zu ermöglichen. Die Funktion der einzelnen Proteine in der

Biosynthese wurde aufgrund von Homologievergleichsanalysen vorhergesagt aber biochemisch noch nicht untersucht (137, 200).

#### 4. Zielsetzung der Arbeit

Der Phage K139 ist innerhalb von pathogenen *V. cholerae* O1 Isolaten weit verbreitet, deshalb sollte überprüft werden, ob K139 an das O-Antigen der Serogruppe O1 bindet. Dazu wurden einerseits Plaqueinhibitions-Studien mit gereinigtem LPS durchgeführt und andererseits mit Hilfe eines lytischen K139-Derivat spontan phagenresistente Mutanten des transluzenten klinischen O1 El Tor Inaba Isolates P27459 isoliert und charakterisiert. Die spontan phagenresistenten Isolate besaßen vielfältige Veränderungen in Oberflächenstrukturen, u.a. vier verschiedenen LPS-Mutanten-Klassen, die teilweise für *V. cholerae* noch nicht beschrieben worden waren. Mutanten mit einer auffälligen opaken Kolonimorphologie besaßen keinen LPS-Defekt, konnten aber im Gegensatz zum transluzenten Wt einen Biofilm an abiotischen Oberflächen ausbilden.

Nach dieser phänotypischen Charakterisierung war das weitere Ziel dieser Arbeit möglichst die genetische Natur einiger Isolate der verschiedenen LPS-Mutanten-Klassen zu ermitteln und deren Beteiligung innerhalb infektionsrelevanter Vorgänge zu untersuchen. Da eine der Mutanten sowohl in der LPS Struktur als auch im Gal-Stoffwechsel beeinträchtigt war, wurde es notwendig die Beteiligung weiterer Gal-Gene in diese Fragestellungen miteinzubeziehen. *galE*, *galK* und *galU* wurden deshalb durch genetische Manipulation inaktiviert. Die spontan phagenresistenten LPS-Mutanten sowie die Gal-Mutanten wurden in neugeborenen Mäusen auf ihre Kolonisierungsfähigkeit getestet und unter „in vitro“-Bedingungen in weiteren infektiologisch relevanten Eigenschaften mit dem Wt verglichen. Für die Gal-Mutanten ergab sich zusätzlich die Möglichkeit den Einfluß auf die Biofilmbildung in Opakvarianten zu untersuchen.

