

Inhaltsverzeichnis

I ZUSAMMENFASSUNG	1
I SUMMARY	4
II EINLEITUNG	6
1. <i>VIBRIO CHOLERAE</i> UND CHOLERA	6
1.1. <i>Epidemiologie und Überleben in der Umwelt</i>	6
1.1.1. Historie und Epidemiologie der Cholera	6
1.1.2. Umweltvorkommen	7
1.1.3. Überlebensformen und Biofilmbildung	8
1.2. <i>Pathogenese der Cholera</i>	9
1.2.1. Infektionsverlauf.....	9
1.2.2. Wirkungsweise des Cholera-toxins	12
1.3. <i>Kontrolle und Manifestation der Cholera</i>	12
2. VIRULENZASSOZIIERTE GENE UND MOBILE GENETISCHE ELEMENTE VON <i>V. CHOLERAE</i>	13
2.1. <i>Virulenzfaktoren</i>	14
2.1.1. Toxine	14
2.1.2. Kolonisierungsfaktoren.....	15
2.1.3. Weitere Virulenzfaktoren.....	16
2.1.4. Regulation der Expression von Virulenzgenen.....	16
2.2. <i>Mobile genetische Elemente</i>	18
2.2.1. Horizontal übertragbare Elemente	18
2.2.2. IS-Elemente.....	20
2.2.3. Phagen.....	21
2.2.3.1. Der filamentöse Phage CTX Φ	22
2.2.3.2. Der temperente Phage K139.....	23
3. LIPOPOLYSACCHARID	24
3.1. <i>Funktion und Biosynthese des LPS in Gram-negativen Bakterien</i>	24
3.2. <i>V. cholerae LPS</i>	25
4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
III MATERIAL UND METHODEN	28
1. ANTISEREN, BAKTERIOPHAGEN, BAKTERIEN, OLIGONUKLEOTIDE UND PLASMIDE	28
2. GERÄTE UND CHEMIKALIEN	32
3. LÖSUNGEN, MEDIEN, MEDIENZUSÄTZE UND WACHSTUMSBEDINGUNGEN.....	33

4. MIKROBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN	34
4.1. Stammkonstruktionen.....	34
4.2. Konjugation.....	35
4.3. Selektion auf Streptomycinresistenz.....	35
4.4. Bakteriophagen Techniken.....	36
4.4.1. Herstellung von Phagenlysaten.....	36
4.4.2. Ermittlung des Phagentiters	36
4.4.3. Plaqueinhibitions-Studien.....	36
4.4.4. Phagentransduktion.....	37
4.4.5. Isolierung spontan K139.cm9-resistenter Stämme	37
4.5. MHK- und MBK-Bestimmungen	38
5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	39
5.1. Präparation von Plasmid-DNA.....	39
5.2. Präparation chromosomaler DNA.....	39
5.3. Präparation von Phagen DNA.....	39
5.4. Southern-Blot	40
5.5. Restriktionsverdau und Ligation.....	40
5.6. Transformation	41
5.7. PCR	41
5.8. DNA-Sequenzierung.....	41
5.9. Plasmidkonstruktionen.....	42
5.9.1. Expressionsplasmide.....	42
5.9.2. Plasmide zur Konstruktion von chromosomalen Insertionsmutanten.....	43
5.9.3. Plasmide zur Konstruktion von chromosomalen Deletionsmutanten.....	44
6. BIOCHEMISCHE METHODEN	45
6.1. Präparation von LPS	45
6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
6.3. Westernblot	46
6.4. Silberfärbung von LPS in PAA-Gelen.....	46
6.5. Färbung von Proteinen in PAA-Gelen.....	47
6.6. ELISA.....	47
6.7. Präparation von Außenmembranproteinen	48
6.8. Analyse von Proteinen im Kulturüberstand: TCA-Fällung	48
6.9. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	48

7. PHÄNOTYPISCHE TESTS	49
7.1. <i>Motilität</i>	49
7.2. <i>HA-Proteaseaktivität</i>	49
7.3. <i>Serumresistenztest</i>	50
7.4. <i>Überleben in Gegenwart von kurzkettigen organischen Säuren</i>	50
7.5. <i>Biofilmbildung</i>	51
8. TIERVERSUCHE.....	51
9. COMPUTERANALYSEN	52
IV ERGEBNISSE.....	53
1. IDENTIFIZIERUNG DES O1-ANTIGENS ALS REZEPTOR DES PHAGEN K139	53
2. ISOLIERUNG SPONTAN K139.CM9-RESISTENTER O1 EL TOR STÄMME.....	54
3. ENTSTEHUNG VON O1-ANTIGEN NEGATIVEN ISOLATEN DURCH INSERTION EINES IS-ELEMENTS	57
3.1. <i>Identifizierung von IS1004-Insertionen im rfb-Gencluster</i>	57
3.2. <i>Selektion auf O-Antigen positive Revertanten</i>	59
3.3. <i>Charakterisierung der IS1004-Insertionen</i>	60
3.4. <i>Verteilung chromosomaler IS1004-Elemente nach Transposition</i>	61
4. MUTANTEN MIT VERÄNDERTEM O1-ANTIGEN: DEFECT IN DER TETRONATBIOSYNTHESE ? ...	62
5. SPONTAN PHAGENRESISTENTE R-LPS-MUTANTEN UND DAS <i>waa</i> -GENCLUSTER	66
6. LPS-KERNOLIGOSACCHARID-DEFECT UND <i>gal</i> -GENE.....	70
6.1. <i>Identifizierung von spontan phagenresistenten Stämmen mit verändertem Kernoligosaccharid und intaktem O1-Antigen als galU-Mutanten</i>	70
6.2. <i>Konstruktion und Charakterisierung von gal-Mutanten</i>	71
7. VIRULENZEIGENSCHAFTEN VON LPS- UND <i>gal</i> -MUTANTEN.....	73
7.1. <i>Kolonisierung der Mutanten im Dünndarm von neugeborenen Mäusen</i>	74
7.2. <i>Außenmembranintegrität von LPS und gal-Mutanten</i>	75
7.3. <i>Sensitivität gegenüber anionischen hydrophoben Substanzen und organischen Säuren</i>	77
7.4. <i>Überleben in Gegenwart von Komponenten des angeborenen Immunsystems</i>	80
7.5. <i>Zusammenfassung über die Virulenzeigenschaften von LPS- und gal-Mutanten</i>	82
8. OPAKVARIANTEN UND BIOFILMBILDUNG.....	82
8.1. <i>Kolonievarianten bilden Biofilme an abiotischen Oberflächen</i>	82
8.2. <i>GalE und GalU sind an der Biofilmbildung beteiligt</i>	84
8.3. <i>Opakvarianten und K139.cm9 Phageninfektion</i>	85

V DISKUSSION	86
1. ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG SPONTAN PHAGENRESISTENTER MUTANTEN.	86
2. VIRULENZEIGENSCHAFTEN DER <i>V. CHOLERA</i> E LPS- UND <i>gal</i> -MUTANTEN	93
3. PHAGENINFEKTION CONTRA <i>V. CHOLERA</i> E OBERFLÄCHENSTRUKTUREN	99
VI LITERATURVERZEICHNIS	103
ANHANG	A
1. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	A
2. SEQUENZAUSWERTUNGEN.....	C
2.1. <i>Homologieanalysen</i>	C
2.2. <i>Deletion von 546 bp aus dem waa-Gencluster im Stamm P27459res118</i>	E
3. ERKLÄRUNGEN.....	H
4. PUBLIKATIONEN.....	I
5. LEBENSLAUF.....	J

