

## V Diskussion

Mit dem Ziel, die Natur der Wechselbeziehung zwischen Phagen und *V. cholerae* zu untersuchen, wurde ein klassischer genetischer Ansatz gewählt, der zur Isolierung von *V. cholerae* O1 El Tor Mutanten mit vielseitig veränderten Oberflächenstrukturen führte. Darunter befanden sich Isolate mit transluzenter Koloniemorphologie und intaktem LPS, deren Mutation nicht weiter charakterisiert wurde. Diese Mutanten könnten aber Aufschluß über den Prozess der Phagen-DNA-Injektion liefern (vgl. V 3.). Weiterhin konnten Opakvarianten isoliert werden, die vermutlich phagenresistent sind aufgrund der Synthese eines Exopolysaccharides und die in der Lage waren einen Biofilm an abiotischen Oberflächen zu bilden (vgl. V 3.). Da der Phage, wie gezeigt wurde, das O-Antigen des LPS als Rezeptor zur Bindung an Stämme der Serogruppe O1 nutzt (vgl. V 3.), befanden sich unter den spontan phagenresistenten Isolaten hauptsächlich LPS-Mutanten. Innerhalb der LPS-Mutanten, deren isoliertes LPS im PAA-Gel unterschiedliches Laufverhalten zeigte, konnten vier verschiedene Gruppen beobachtet werden: (a) O-Antigen negative Mutanten; (b) Mutanten mit verändertem O-Antigen; (c) Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid und fehlendem O-Antigen (R-LPS-Mutanten); (d) Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid aber vorhandenem O-Antigen. Diese Kombination diverser LPS-Mutanten, die teilweise für *V. cholerae* noch nicht beschrieben worden waren, ermöglichten Untersuchungen zur Beteiligung des LPS an der von *V. cholerae* ausgeübten Pathogenese (vgl. V 2.).

### 1. Isolierung und Charakterisierung spontan phagenresistenter Mutanten

#### *Isolierung spontan phagenresistenter Mutanten*

Um spontan phagenresistente Mutanten zu isolieren, wurde der nicht-K139-lysogene transluzente klinische O1 El Tor Inaba Stamm P27459 mit dem lytischen Phagen K139.cm9 in Topagar infiziert. Diese Experimente wurden mit zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt, von denen jeweils Aliquots aus unterschiedlichen Wachstumsphasen eingesetzt wurden. Nach Inkubation über Nacht waren vor allem an der Oberfläche des Topagars aber auch im Topagar Kolonien zu erkennen. Nach 2 Tagen waren zusätzlich sehr viele kleine Kolonien tief im Topagar vorhanden. Auf eine Analyse dieser spät erschienenen Kolonien wurde jedoch verzichtet, da es möglich ist, daß diese Zellen anaeroben Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren und deshalb phagenresistent sind. Bisher ist für diesen Phagen noch nicht geklärt welche Wachstumsbedingungen für die Infektion wichtig sind. Vorläufige Ergebnisse deuten jedoch an, daß unter optimalen Wachstumsbedingungen (37° C, LB, aerob) der Phage K139.cm9 *V. cholerae* effektiv lysiert, während unter Bedingungen eines langsamen Bakterienwachstums (M9-Glycerin, anaerob) die Lyserate herabgesetzt ist, und es zur Koloniebildung in Gegenwart des lytischen

Phagen kommen kann (Daten nicht gezeigt). Diese Art Abhängigkeit von Phageninfektion und Wachstumsbedingungen wurde auch für andere Phagen beschrieben (29).

Aus den genannten Gründen wurde auf eine Frequenzbestimmung der Entstehung phagen-resistenter Spontanmutanten verzichtet. Für die weiterführenden Analysen wurden Kolonien von verschiedenen Platten wahllos gepickt und mehrfach auf LB-Platten gereinigt. Die Phagen-resistenz wurde anschließend in Kreuzstrichanalysen unter optimalen Wachstumsbedingungen verifiziert. Southernblotanalysen bestätigten, daß es sich bei den Mutanten überwiegend um nicht-lysogene Stämme handelte und nur in drei von 120 untersuchten Stämmen konnte Phagen-DNA nachgewiesen werden.

Aufgrund des LPS-Laufverhaltens in PAA-Gelen und der Koloniemorphologie konnte eine Einteilung der 120 Isolate in 6 Kategorien erfolgen. Als weiteres Ziel stand die Ermittlung der genetischen Ursache einzelner Isolate aus vier verschiedenen LPS-Mutanten-Typen im Vordergrund. Diese Untersuchungen wurden durch die mittlerweile zur Verfügung gestellte *V. cholerae* Genomsequenz und die Daten über die LPS-Biosynthese anderer Gram-negativer Bakterien erleichtert. Mutanten innerhalb der verschiedenen LPS-Typen wurden überwiegend nicht weiter genetisch analysiert. Es ist aber aufgrund der Isolationsmethode zu erwarten, daß identische Mutanten vorhanden sind. Dies ist vor allem der Fall, wenn eine Mutation in einer frühen Phase des Wachstums erfolgt war, eine Mutation bereits in der Vorkultur existierte oder DNA-Bereiche betroffen waren, die mit einer hohen Frequenz mutieren (hot spot-Mutationen). Wie aus verschiedenen Grundlagenarbeiten bekannt ist, können die genetischen Mechanismen, die zur Entstehung von Spontanmutanten führen, vielfältiger Natur sein und schließen u.a. Punktmutationen, Leserastermutationen, DNA-Inversionen oder veränderte DNA-Methylierungsmuster mit ein (89, 184). Nur für O-Antigen negative Mutanten, die mit etwa 60 % den größten Anteil der isolierten Spontanmutanten stellten, wurde die Möglichkeit genutzt, das bereits gut charakterisierte *rfb*-Gencluster mittels Southernblot-Analysen auf größere DNA-Veränderungen wie Rearrangements, Deletionen oder Insertionen zu untersuchen.

#### *Entstehung O-Antigen negativer Stämme durch Insertion von IS1004*

Die gezielte Untersuchung des *rfb*-Genclusters von einigen P27459-Spontanmutanten sowie von phagenresistenten MAK757-Isolaten ergab, daß O-Antigen negative Stämme durch Insertion des IS-Elementes *IS1004* in *rfb*-Gene entstehen können. Im Stamm MAK757res3 war die Insertion in *manB* erfolgt, dessen kodiertes Protein an der Perosaminsynthese beteiligt ist (201). Der Stamm P27459res30 war durch eine *IS1004*-Insertion in *wbeW* mutiert. Die genaue Funktion von WbeW ist bisher nicht bekannt, könnte aber laut Homologievergleichsanalysen eine Glykosyltransferase sein (55). Komplementationsstudien zeigten, daß die Expression der von *manB* stromabwärtsliegenden Gene durch die Insertion nicht beeinträchtigt wurde. Laut Sequenzanalysen könnte im 3' Bereich des *IS1004*-Elementes ein Promotor lokalisiert sein, der

die Transkription gewährleistet. Allerdings muß der experimentelle Nachweis, daß dieser Promotor aktiv ist, noch erbracht werden.

IS1004, das zu den kleinsten bekannten IS-Elementen gehört, wird als relativ stabiles chromosomales Element angesehen und deshalb als Marker benutzt, um epidemische Stämme zu typisieren (20). In dieser Arbeit konnte zum erstenmal gezeigt werden, daß IS1004 in O1 El Tor Stämmen aktiv ist und Insertionen reversibel verlaufen können. Die Frequenz der Deletion bzw. Exzision dieses IS-Elementes aus *wbeW* kann nur abgeschätzt werden und lag bei  $<10^{-7}$ . Über die Transpositionsfrequenz kann keine Aussage gemacht werden. Um Hinweise auf den Transpositionsmechanismus und die chromosomale Insertionsstelle zu erhalten, wurde der Wt-Stamm, eine Insertions-Mutante und eine Revertante in Southernblot-Analysen verglichen und PCR-Produkte des entsprechenden Bereiches sequenziert. Diese Analysen ergaben, daß das IS1004-Element 620 bp umfasst, die Insertion präferentiell in eine AT-reiche Region nach der Sequenzfolge 5'TT(T/C)AT erfolgt und bei der Insertion die bp AT verdoppelt werden. Zu diesen neuen Aspekten kommt hinzu, daß IS1004 nicht von „inverted repeats“ flankiert ist, und die von diesem Element kodierte Transposase Homologien zu der Transposase von IS200 (40,6 % Identität auf AS-Ebene) besitzt (20). IS1004 wurde daher in die Gruppe der IS200-Elemente eingeordnet, die wiederum zur IS605-Familie zählt (134). Bisher umfaßt diese Familie 16 IS-Elemente aus verschiedenen Bakterienarten (134).

Das 707 bp große IS200 aus *S. typhimurium* wurde bereits recht gut charakterisiert und zeigt sowohl in der Struktur als auch im Transpositionsverhalten Ähnlichkeiten zu IS1004. IS200 besitzt ebenfalls keine „terminalen inverted repeats“ und verdoppelt 2 bp bei der Insertion (125, 161). Die Insertion von IS200 scheint nach einer variablen Folge von 5 bp zu erfolgen, die aus A und T besteht (17). Bei Mutanten, die durch IS200-Insertion entstanden waren, war die Anzahl der nachweisbaren IS200-Elemente im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöht (125, 161). Dies wurde in dieser Arbeit auch für IS1004 beobachtet, was andeutet, daß bei beiden IS-Elementen eine Replikation bei der Transposition erfolgen kann. Der Transpositions-Mechanismus (einfach oder replikativ) ist aber bisher für IS200 noch nicht bekannt, da die Untersuchungen „in vitro“ aufgrund der extrem niedrigen Transpositionsfrequenz erschwert sind. Es konnte nachgewiesen werden, daß dies ursächlich auf die schwachen Expression der Transposase zurückzuführen ist, die sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene reguliert wird (18). Eventuell könnte der Transpositions-Mechanismus von IS1004 „in vitro“ besser untersucht werden, falls die Transposaseaktivität höher ist als bei IS200.

In *V. cholerae* O1-Isolaten ist ein unvollständiges IS1004-Element im *rfb*-Gencluster neben einem defekten IS1358 lokalisiert (19). Solch eine Anordnung aus zwei Transposons wird für IS200-ähnliche Elemente häufig beobachtet (134). In manchen Fällen scheint sich daraus ein Hybridelement mit zwei verschiedenen, nichtverwandten Transposasen entwickelt zu haben, das als Hybrid aktiv ist. Paradebeispiel hierfür ist das IS605-Element aus *Helicobacter pylori* (134). Die Insertion von IS605, das ebenfalls keine „terminalen inverted repeats“ besitzt, erfolgt

präferentiell in eine AT-reiche Region, bevorzugt nach 5' TTTAA(C), allerdings ohne dabei bp zu verdoppeln. Weiterhin erfolgt die Transposition „in vitro“ über einen einfachen nichtreplikativen Transpositions-Mechanismus mit einer Frequenz von  $10^{-8}$ . Es wird vermutet, daß beide Transposasen an der Transposition des Hybridelementes beteiligt sind, was aber noch nicht experimentell untersucht wurde (114). Deshalb können nicht unbedingt Rückschlüsse auf den Transpositions-Mechanismus von *IS1004* gezogen werden, da *IS1004* lediglich eine zu *IS200* ähnliche Transposase besitzt.

Der Transpositionsvorgang der verwandten Elemente *IS1004*, *IS200* und *IS605* zeigt viele Gemeinsamkeiten und unterscheidet sich von anderen IS-Elementen, indem z.B. keine „terminalen inverted repeats“ zur Bindung für die Transposase vorhanden sind, dafür aber eine gewisse „target site“-Spezifität gegeben ist. Wie die Transposition durch die Familie der *IS200* Transposasen katalysiert wird, ist noch nicht endgültig geklärt (134). Da das *IS1004* zumindest in zwei untersuchten O1 El Tor Stämmen aktiv ist, kann es potentiell zur Genomplastizität dieser Stämme, nicht nur durch Rekombinationsereignisse, sondern auch durch aktive Transposition beitragen.

#### *R-LPS-Mutanten und das waa-Gencluster*

Eine Klasse von Mutanten war vertreten durch R-LPS-Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid ohne O-Antigen. Hier wurden insgesamt 8 Isolate erhalten, darunter mindestens 2 verschiedene Typen. Diese Mutanten könnten in Genen des *waa*-Genclusters mutiert sein. *waa*-Gencluster ist die Bezeichnung für eine DNA-Region, die Gene und Operone einschließt, deren Produkte an der Biosynthese des Kernoligosaccharides beteiligt sind (172). Wie in bisher allen untersuchten Gram-negativen Bakterien sind auch im Kernoligosaccharid des *V. cholerae*-LPS der Serogruppe O1 die konservierten Kohlenhydrate Kdo (3-deoxy-D-manno-oculosonic acid) und Heptose nachgewiesen worden (216). Aus diesem Grund konnte in der *V. cholerae* Genomdatenbank gezielt nach *E. coli*-Homologen von Heptosyl- und Kdo-Transferasen gesucht werden. Aus den erhaltenen Computerdaten wurde klar, daß die Gene, die für Heptosyltransferasen kodieren, sich über einen chromosomalen Bereich von ca. 20 kbp erstrecken. Laut Homologieanalysen sind in diesem DNA-Bereich Gene lokalisiert, deren Produkte ebenfalls potentiell an der Biosynthese des Kernoligosaccharides beteiligt sein könnten (Abb. 19 und Tab. 14 im Anhang). Diese Genregion ist direkt stromaufwärts des *rfb*-Genclusters lokalisiert und wird im weiteren als *waa*-Gencluster bezeichnet.

Für zwei der spontan phagenresistenten R-LPS-Mutanten gab es Anhaltspunkte, daß die Mutation in der Heptosyltransferase II (*WaaF*) zu suchen ist. Um *waaF* zu charakterisieren wurde dieses Gen durch Insertion eines Suizidplasmides inaktiviert. Das LPS dieser konstruierten *waaF*-Mutante zeigte dasselbe Migrationsverhalten in PAA-Gelen, wie die spontan phagenresistenten Mutanten. Allerdings wurde in Anwesenheit eines *waaF*-Komplementations-

Plasmides nur in der *waaF*-Mutante ein komplettes LPS synthetisiert, während in beiden Spontanmutanten zwar das Kernoligosaccharid nicht aber das O-Antigen wiederhergestellt wurde. Für ein Isolat (P27459res118) konnte die molekulare Ursache dafür ermittelt werden. Es wurde gezeigt, daß eine Deletion von 546 bp erfolgt war, die *waaF* und ein weiteres hypothetisches Gen betraf. Da diese Mutante nach Komplementation mit *waaF* in trans weiterhin O-Antigen negativ war, ist eine attraktive Hypothese, daß es sich bei diesem zweiten Gen um die kodierende Sequenz der O-Antigen-Ligase (WaaL) handelt. Eine vorläufige Charakterisierung durch Homologieanalysen unterstützt diese Theorie.

Die Mutationen der weiteren 6 R-LPS-Mutanten konnten noch nicht lokalisiert werden, teilweise könnte dabei die Heptosyltransferase-III (WaaQ) betroffen sein. R-LPS-Mutanten, die zum Teil das O-Antigen noch synthetisierten wie P27459res46 könnten hypothetisch auch strukturelle Veränderungen in einem Seitenzweig des Kernoligosaccharides aufweisen und z.B. kein  $\alpha$ -GlcN oder  $\alpha$ -HepIV mehr besitzen (vgl. Abb. 19), was eine ineffektive Interaktion des Lipid A-Kernoligosaccharides mit der O-Antigen-Ligase zur Folge haben könnte.

#### *Spontanmutanten mit Defekten in galU und Inaktivierung weiterer gal-Gene*

Eine andere Klasse von Spontanmutanten zeichnete sich durch eine veränderte LPS-Kernstruktur mit intaktem O-Antigen aus. Unter den 120 spontan phagenresistenten P27459 Isolaten besaßen insgesamt 7 Mutanten, isoliert aus zwei verschiedenen Ansätzen, diese veränderte LPS-Struktur. Da alle 7 Stämme nicht auf Minimalmedium mit Galaktose wachsen konnten, ergab sich der Verdacht, daß diese Isolate in *galU* mutiert sein könnten. In der *V. cholerae* Datenbank konnte aufgrund hoher Ähnlichkeiten zu GalU von *E.coli* das kodierende Gen lokalisiert werden. Komplementationsstudien mit einem plasmidkodierten *galU* im Stamm P27459res29 bestätigten, daß es sich tatsächlich um eine *galU*-Mutante handelt. Eine PCR-Analyse des chromosomalen *galU* dieser Mutanten ergab, daß die Mutationen nicht auf Deletion oder Insertion größerer DNA-Bereiche innerhalb von *galU* zurückzuführen waren (Daten nicht gezeigt) sondern deuten auf Punktmutationen hin.

Das von *galU* kodierte Enzym katalysiert die Synthese von UDP-Glukose. Dieses aktivierte Kohlenhydrat ist ein Substrat für Glykosyltransferasen und damit für die Synthese von glukosehaltigen Oberflächenstrukturen essentiell (129). Laut Strukturdaten sind im Kernoligosaccharid des *V. cholerae* LPS zwei Glukosereste ( $\alpha$ -Glc und  $\beta$ -Glc, vgl. Abb. 19 B) an den Heptosyl-I-Rest gebunden. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß in einer *galU*-Mutante den beiden spezifischen Transferasen, die diese Verknüpfungen katalysieren, das Substrat UDP-Glukose fehlt. Damit könnten in der *galU*-Mutante im Kernoligosaccharid die beiden Seitenzweige  $\alpha$ -Glc und  $\beta$ -Glc- $\beta$ -Fruc fehlen (Abb. 19 B). UDP-Glukose ist auch ein Donor für die Biosynthese weiterer aktivierter Kohlenhydrate wie z.B. UDP-Glukuronsäure oder UDP-Galaktose, die ebenfalls in verschiedene Di-, Oligo- oder auch Polysaccharide eingebaut werden

können (8, 129). Aus diesem Grund können in einer *galU*-Mutante auch andere kohlenhydrathaltige Strukturen beeinträchtigt sein, die nicht unbedingt Glukose enthalten.

Weiterhin ist UDP-Glukose am Abbau exogener Galaktose beteiligt. Es ist dabei ein Substrat für GalT (Galaktose-1-P-Uridyltransferase), das die Umwandlung von Gal-1-P zu Glc-1-P katalysiert (Abb. 28). Deshalb können *galU*-Mutanten exogene Galaktose nicht mehr verstoffwechseln, keine UDP-Galaktose synthetisieren und häufen in Anwesenheit hoher Galaktose-Konzentrationen das toxische Stoffwechselprodukt Galaktose-1-P an, was im Endeffekt zur Lyse der Zellen führt (129). Die Galaktosesensitivität wurde auch für die *V. cholerae galU*-Mutanten beobachtet. Um mögliche Effekte einer *V. cholerae galU*-Mutante zumindest teilweise besser einordnen zu können, wurden zwei weitere Gal-Gene, *galE* und *galK*, inaktiviert. Phänotypische Untersuchungen aller Gal-Mutanten bestätigten, daß auch *V. cholerae* den in vielen Organismen üblichen Gal-Stoffwechselweg benutzt (Abb. 28 A und B, adaptiert nach (129)).

*galE* kodiert für die UDP-Glukose-Epimerase, die in den meisten Organismen sowohl die Umwandlung von UDP-Glukose zu UDP-Galaktose als auch die Rückreaktion katalysiert. In Anwesenheit von exogener Galaktose bilden *galE*-Mutanten UDP-Galaktose, können diese aber nicht mehr zu UDP-Glukose umwandeln (Abb. 28 A) was in Gegenwart hoher Galaktosekonzentrationen zur Akkumulation dieses toxischen Zwischenproduktes und zur Lyse der Zellen führt. In Abwesenheit exogener Galaktose können *galE*-Mutanten dagegen keine UDP-Galaktose bilden (Abb. 28 B), dieses Intermediat steht dadurch spezifischen Transferasen nicht als Substrat für den Aufbau galaktosehaltiger Oberflächenstrukturen zur Verfügung. Durch direkten Vergleich einer *galE*- mit einer *galU*-Mutante sollte damit entschieden werden können, ob der Effekt einer *galU*-Mutante auf die Beeinträchtigung galaktosehaltige Strukturen zurückzuführen ist. Allerdings ist diese Bewertung in Anwesenheit nichttoxischer Galaktose-Konzentrationen unter Umständen schwierig, nämlich dann, wenn in *galE*-Mutanten die gebildete UDP-Galaktose ausreicht, um galaktosehaltige Strukturen zu bilden. So wurde z.B. für *Haemophilus influenzae* beobachtet, daß *galE*-Mutanten galaktosehaltiges LPS bilden, wenn zur Anzucht der Stämme Vollmedium verwendet wurde (138).

Die konstruierte *galK*-Mutante sollte nicht mehr in der Lage sein Galaktose-1-P zu synthetisieren (Abb. 28 A). Damit kann diese Mutante ebenfalls keine exogene Galaktose mehr verstoffwechseln, reichert aber nicht wie *galE*- oder *galU*-Mutanten toxische Zwischenprodukte an (Abb. 28 A). Die Synthese von UDP-Gal und UDP-Gluc wird in der *galK*-Mutante durch GalU und GalE gewährleistet. Deshalb war diese Mutante lediglich unfähig in Gegenwart von Galaktose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, besaß aber ansonsten keine Beeinträchtigungen. Zusätzlich wurde eine *galEgalK*-Doppelmutante hergestellt, die UDP-Galaktose weder aus exogener Galaktose noch durch Biosynthese aus dem Intermediat UDP-Glukose synthetisieren kann (Abb. 28 B). Diese Mutante sollte damit nicht mehr in der Lage sein Galaktose in Oberflächenstrukturen einzubauen.

Dazu muß aber angemerkt werden, daß dies natürlich nur zutreffen kann, wenn in der *galEK*-Mutante kein weiteres *galE* vorhanden ist, das ein funktionelles GalE exprimiert. In der *V. cholerae* Datenbank wurde neben dem hier inaktivierten *galE* (VCA0774, 65 % Identität über 338 AS zu GalE von *E.coli*) ein zweites Gen als *galE* annotiert (85). Dieser ORF (VC0262) besitzt aber nur sehr geringe Homologien zu bekannten Proteinen, bei denen es sich überwiegend um verschiedene Epimerasen handelt, darunter auch GalE von *E.coli* (26 % Identität in 168 von 338 AS). Diese Computerdaten unterstützen nicht unbedingt eine Funktion dieses ORFs als GalE. Zudem wurde dieser ORF (VC0262) bereits charakterisiert und die Autoren schlossen praktisch aus, daß es sich um ein funktionelles GalE handelt (55). Der eindeutige Phänotyp bezüglich des Gal-Stoffwechsels der hier konstruierten und analysierten *galE*-Mutante unterstützt ebenfalls nicht die Theorie eines zweiten funktionsfähigen GalE. Aus diesen Gründen wird davon ausgegangen, daß die in dieser Arbeit konstruierte *galEK*-Doppelmutante keine UDP-Galaktose mehr synthetisieren kann und es kein zweites funktionsfähiges GalE gibt.

Durch die Konstruktion der verschiedenen *gal*-Mutanten kann durch direkten Vergleich der *galU*-, *galE*- und *galEK*-Mutanten unter gegebenen Bedingungen abgeschätzt werden, ob die Beeinträchtigung im Gal-Stoffwechsel, z.B. Galaktosesensitivität oder die Unfähigkeit exogene Galaktose verstoffwecheln zu können, für einen beobachteten Effekt verantwortlich sind. Gleichzeitig ist es möglich zu entscheiden, inwieweit auch in einer *galU*-Mutante galaktosehaltige Oberflächenstrukturen involviert sind.

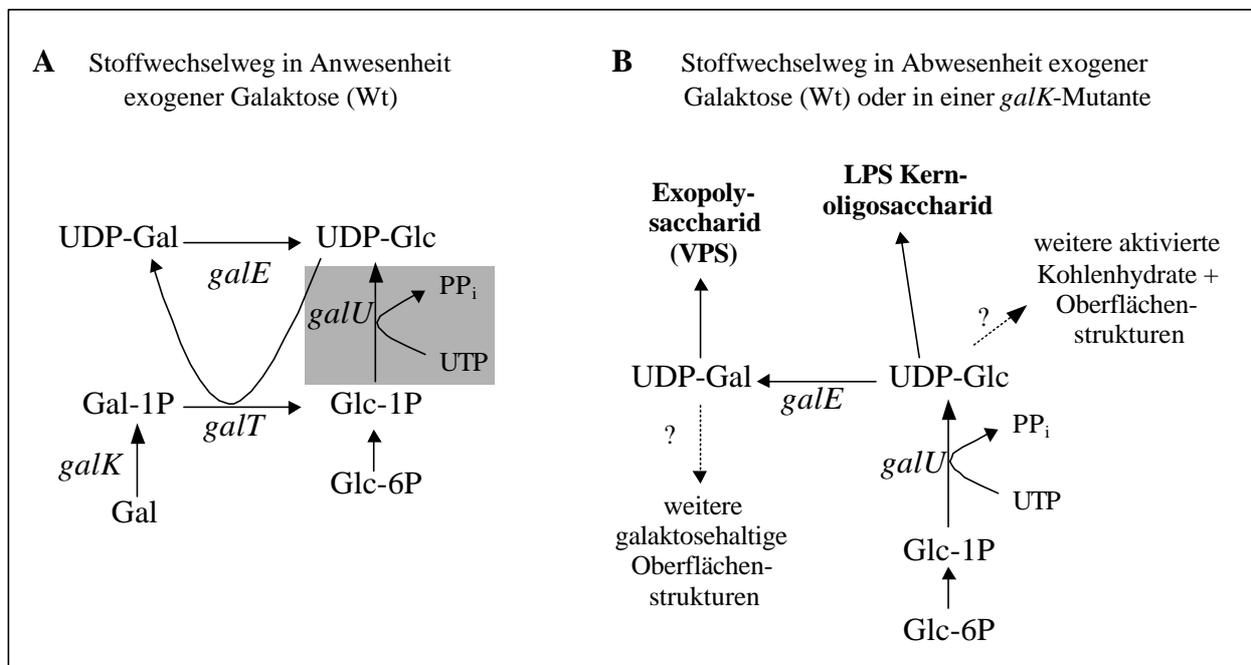


Abb. 28: Postulierter Galaktosestoffwechsel in *V. cholerae*.

A. Abbau exogener Galaktose. Die Synthese von UDP-Glc aus Glc-1P ist grau unterlegt, um anzudeuten, daß diese Reaktion nur notwendig ist, wenn viel UDP-Glc benötigt wird.

B. Synthese von UDP-Gal und UDP-Glc ohne verfügbare exogene Galaktose. Es ist zudem angedeutet, für welche Oberflächenstrukturen UDP-Gal und UDP-Glc wahrscheinlich als Donoren benötigt werden.

### *gal*-Gene und die LPS- bzw. Exopolysaccharid-Synthese

Für zwei *V. cholerae* Oberflächenstrukturen, das LPS und das Exopolysaccharid (VPS), wurde untersucht, in wieweit für deren Synthese *galU* und *galE* benötigt wird. *galE*- und *galEK*-Mutanten synthetisierten im Gegensatz zu der *galU*-Mutante ein offensichtlich unverändertes LPS. Daraus kann man schließen, daß Galaktose kein Bestandteil des LPS ist. Dies ist in Übereinstimmung mit Analysen anderer Autoren, die weder bei der Bestimmung der LPS Kohlenhydrat-Zusammensetzung, noch bei der Ermittlung der LPS-Struktur Galaktose im LPS der Serogruppe O1 nachweisen konnten (106, 112, 216). Für die Serogruppe O139 könnte dagegen eine *galE*-Mutation gravierende Auswirkungen haben, da in dieser Serogruppe Galaktose sowohl Bestandteil des O-Antigens als auch der Kapsel ist.

Die Beteiligung von *galU* und *galE* an der Bildung des VPS wurde indirekt in quantitativen Biofilmassays untersucht. Da der Wt Stamm im Gegensatz zu der spontan phagenresistenten Opakvariante nicht in der Lage war einen Biofilm an abiotischen Materialien zu bilden, mußten für diese Analysen die Gene *galE* und *galU* in der Opakvariante inaktiviert werden. Diese *galU*- und *galE*-Mutanten bildeten transluzente Kolonien und waren nicht mehr in der Lage einen Biofilm zu bilden. Dieses Verhalten ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die *galE*- und *galU*-Mutanten kein VPS mehr synthetisieren konnten. Da sowohl *galE*- als auch *galU*-Mutanten diesen Phänotyp zeigten, scheint in beiden Mutanten der Ausfall der Synthese von UDP-Galaktose dafür verantwortlich zu sein (Abb. 28 B) was andeutet, daß Galaktose ein Bestandteil der VPS ist. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Analysen weiterer Autoren, die Galaktose im VPS nachweisen konnten (217, 239). Das auf Chromosom 2 lokalisierte *galE* und das auf Chromosom 1 lokalisierte *galU* sind demnach neben dem auf Chromosom 1 liegenden (85), bereits charakterisierten *vps*-Gencluster (239) ebenfalls an der Biosynthese des VPS beteiligt.

## **2. Virulenzeigenschaften der *V. cholerae* LPS- und *gal*-Mutanten**

Die Verfügbarkeit von verschiedenen Typen an LPS- und Gal-Mutanten ermöglichte die Korrelation zwischen LPS-Struktur und *V. cholerae* Virulenz zu untersuchen. In Abb. 29 wurde zur besseren Übersicht schematisch die mögliche LPS-Struktur der untersuchten Mutanten abgebildet. Die Kolonisierungsfähigkeit dieser Mutanten wurde in neugeborenen Mäusen untersucht. O-Antigen negative Mutanten (Abb. 29 D) waren nicht mehr in der Lage, effektiv zu kolonisieren. Dieses Verhalten wurde auch schon für andere *rfb*-Mutanten, sowohl in O1 klassischen als auch O1 El Tor Stämmen beobachtet (33, 221). Dagegen konnten aus dem Dünndarmhomogenat keine überlebenden R-LPS-Mutanten isoliert werden. Damit scheinen R-LPS Mutanten (Abb. 29 E) im Gegensatz zu O-Antigen negativen Mutanten überhaupt nicht mehr kolonisieren zu können.

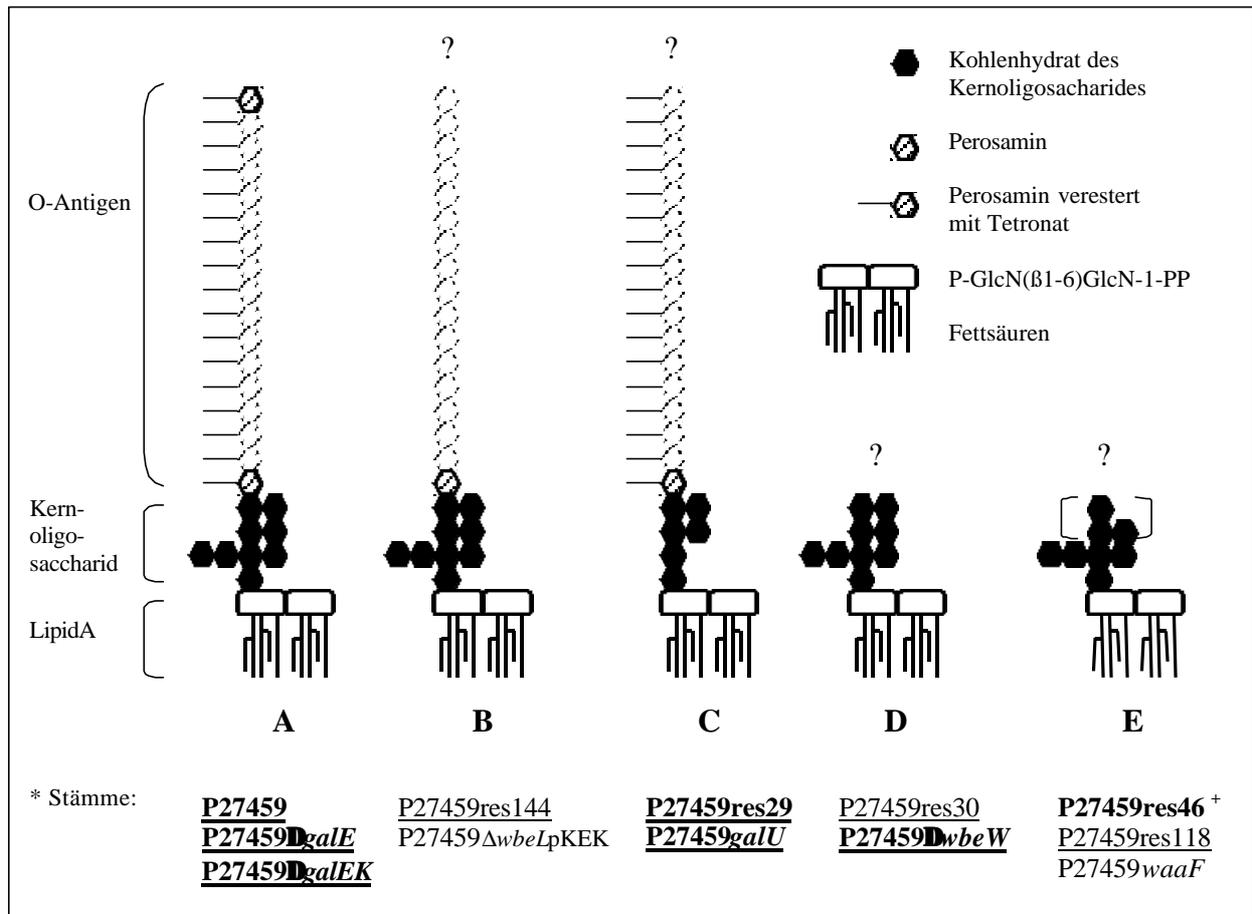


Abb. 29: Mögliche Struktur des LPS von Wt und Mutanten.

A: Wt-LPS der Serogruppe O1. Die schematische Darstellung beruht auf Strukturdaten verschiedener Autoren (112, 216; vgl. auch Abb. 5 und Abb. 19 für detaillierte Struktur).

B: Mutanten mit verändertem O-Antigen. Die Hinweise, daß bei diesen Mutanten, wie hier abgebildet, das Tetronat fehlt sind bisher aber noch unvollständig.

C: Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid aber intaktem O-Antigen. Da es sich um *galU*-Mutanten handelt, wurde bei der Darstellung angenommen, daß keine Glukose - weder  $\beta$ -Glc noch  $\alpha$ -Glc (vgl. Abb. 19) - im Kernoligosaccharid dieser Mutanten vorhanden ist.

D: O-Antigen negative Stämme (spontan phagenresistente *IS1004*-Insertionsmutante P27459res30, konstruierte Deletionsmutante  $\Delta wbeW$ ).

E: R-LPS-Mutanten. Bei den beiden *waaF*-Mutanten P27459res118 und P27459waaF, sprechen mehrere Hinweise für die abgebildete Struktur - [ohne die 3 eingeklammerten Kohlenhydrate]. Bei der Mutante P27459res46 handelt es sich dagegen definitiv nicht um eine *waaF*-Mutante, wie Komplementationsstudien zeigten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des Migrationsverhaltens des Kernoligosaccharides im PAA-Gel ist zu vermuten, daß in dieser Mutante mehr Kohlenhydrate als in den *waaF*-Mutanten vorhanden sind. Deshalb wurde rein spekulativ in dieser Abbildung ein etwas umfassenderes Kernoligosaccharid für P27459res 46 eingezeichnet.

\*) Isolate der einzelnen LPS-Typen, die „in vivo“ auf ihre Kolonisierungsfähigkeit getestet wurden, sind fett gedruckt, während die in verschiedenen „in vitro“-Assays untersuchten Isolate unterstrichen sind.

+) Die Kolonisierungsversuche in neugeborenen Mäuse wurden mit P27459res46 durchgeführt, da zu dieser Zeit die *waaF*-Mutante P27459res118 noch nicht vorhanden war. P27459res46 war nicht in der Lage zu kolonisieren, da keine lebenden Zellen aus dem Dünndarmhomogenat reisolieren werden konnten. Die „in vitro“ Versuche wurden dagegen mit der *waaF*-Mutante P27459res118 durchgeführt. Kolonisierungsversuche in neugeborenen Mäusen wurden bisher mit der *waaF*-Mutante nicht wiederholt, da nicht zu erwarten ist, daß diese Mutante besser kolonisiert als P27459res46.

?) Das ? über B - E soll andeuten, daß es sich bei der abgebildeten Struktur der Mutanten nur um Vermutungen handelt, die auf genetischen Analysen und Migration des LPS im PAA-Gel beruhen, nicht aber auf Strukturdaten.

*galU*-Mutanten mit dem verändertem Kernoligosaccharid aber intaktem O-Antigen (Abb. 29 C) kolonisierten signifikant (50 – 100 fach) schlechter als der Wt. Die eingeschränkte Kolonisierungsfähigkeit der *galU*-Mutanten war aber eindeutig nicht auf Defekte im Gal-Stoffwechsel zurückzuführen, da *galE*- und *galEK*-Mutanten (Abb. 29 A) so gut wie der Wt kolonisierten. Diese Daten deuten gleichzeitig an, daß keine galaktosehaltigen Oberflächenstrukturen für die Kolonisierung essentiell sind, auch nicht das Exopolysaccharid VPS. In der *galU*-Mutante können neben der LPS-Struktur aber auch pleiotrope Effekte für den Kolonisierungs-Defekt verantwortlich sein. Einige Beispiele aus Gram-negativen Bakterien sollen dies veranschaulichen: UDP-Glukose als Donor für die (I) Synthese der Schutzsubstanzen Trehalose bei hoher Osmolarität und MDO („membrane-derived oligosaccharides“) bei niedriger Osmolarität in *E. coli* (41). (II) Synthese von UDP-Arabinose, das z.B. in *S. typhimurium* in Anwesenheit von Polymyxin B in das Lipid A des LPS eingebaut wird und damit die Resistenz gegenüber antimikrobiellen, kationischen Peptiden erhöht (54). (III) Synthese von UDP-Galaktose in *Neisseria meningitidis*, das u.a. zur Synthese glykosilierte Pili benötigt wird (198). Zudem ist UDP-Glukose ein potentielles intrazelluläres Signalmolekül, das z.B. in *E. coli* in der Regulation der Expression des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^s$  involviert ist (23). Da in der *V. cholerae galU*-Mutante aber gerade die LPS-Struktur beeinträchtigt war, sind pleiotrope Effekte auch aus diesem Grund nicht auszuschließen. Deshalb wurden einige „in vitro“ Untersuchungen durchgeführt, die zum Ziel hatten, die Ursache des Kolonisierungs-Defektes der LPS-Mutanten, vor allem der *galU*-Mutante, einzugrenzen. Durch Vergleich der drei verschiedenen LPS-Mutanten-Typen O-Antigen negativ (Abb. 29 D), O-Antigen-negativ mit verändertem O-Antigen (R-LPS, Abb. 29 E), O-Antigen positiv mit verändertem O-Antigen (*galU*, Abb. 29 C) konnte gleichzeitig auch die Funktion der LPS-Substrukturen unter verschiedenen Bedingungen evaluiert werden.

Die „in vitro“-Untersuchungen einiger bekannter Virulenzfaktoren lieferten bisher keine Hinweise, daß die Kolonisierungsdefekte der untersuchten LPS-Mutanten auf eine spezifische Ursache zurückzuführen war. In Schwarmagarplatten waren z.B. alle Mutanten motil, was die Ausbildung einer intakten Flagelle andeutet. Weiterhin konnten die LPS-Mutanten mit dem Phagen CTX $\Phi$  transduziert werden, der die Pili TCP als Rezeptor nutzt (218). Dies spricht für die Synthese der für die Kolonisierung essentiellen Pili. Allerdings kann allein aufgrund dieser Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden, daß die Ausbildung und die Funktion der Pili in den Mutanten während der Kolonisierung im Dünndarm beeinträchtigt ist. Gerade in dieser Frage wurden von verschiedenen Autoren bisher unterschiedliche Ergebnisse präsentiert. Zum einen wurde beschrieben, daß O-Antigen negative Mutanten keine TCP-Pili synthetisieren und diese deshalb nicht mehr kolonisieren können (98, 99) während andere Autoren in solchen Mutanten TCP Pili elektronenmikroskopisch und durch CTX $\Phi$ -Phagentransduktion nachweisen konnten (32). Das „Assembly“ von TCP in LPS-Mutanten ist somit noch nicht endgültig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Überstand aller LPS-Mutanten konnten die extrazellulären Proteine HAP und vor allem CT nachgewiesen werden, womit diese Mutanten potentiell Cholera auslösen könnten. Allerdings konnte auch hier mit den bisher durchgeführten Methoden noch nicht endgültig geklärt werden, ob alle LPS-Mutanten diese Proteine noch aktiv sekretieren oder ob sie nur aus dem Periplasma in den Überstand diffundieren. Hinweise für dieses als „periplasmic leakage“ bezeichnete Phänomen (240) kamen aus der Beobachtung, wonach in LPS-Mutanten das normalerweise periplasmatisch lokalisierte Protein  $\beta$ -Lactamase zum Teil im Überstand nachzuweisen war, während das cytoplasmatische Protein  $\beta$ -Galaktosidase (Daten nicht gezeigt) nicht im Überstand zu detektieren war. Betroffen war hierbei vor allem die R-LPS-Mutante, in der signifikant erhöhte Konzentrationen an  $\beta$ -Lactamase im Überstand nachzuweisen war, während in *galU*-Mutanten leicht erhöhte Konzentrationen und in O-Antigen negativen (Daten nicht gezeigt) und Wt-Stämmen keine  $\beta$ -Lactamase zu detektieren war. Hier müßten noch genauere Untersuchungen endgültig klären, ob das EPS-Transportsystem vor allem in R-LPS-Mutanten noch aktiv ist. Es sei hier aber auch erwähnt, daß es bisher kaum direkte Methoden gibt, dies zu untersuchen. Daher muß immer wieder auf solche phänotypischen Untersuchungen zurückgegriffen werden, die häufig viele Fragen offen lassen.

Das „periplasmic leakage“ von Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid (*galU*, R-LPS) war ein Hinweis, daß die Integrität der AM dieser Mutanten gegenüber der des Wt und der der O-Antigen negativen Mutante erniedrigt ist. Dies wurde auch durch die Beobachtung bestätigt, wonach ausschließlich Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid erhöhte Sensitivität gegenüber hydrophoben Agentien wie Novobiocin und SDS zeigten. Die Instabilität der AM und die Unfähigkeit der AM eine effektive Barriere gegen hydrophobe Substanzen auszubilden, könnte eventuell auf schwache Kernoligosaccharid-Kernoligosaccharid Interaktionen der veränderten LPS-Kernstruktur zurückzuführen sein. Hinweise auf größere Schädigungen der AM wurden jedoch nicht gefunden. So zeigte beispielsweise das AM-Proteinprofil der LPS-Mutanten im Vergleich zum Wt keine auffälligen Unterschiede.

Hinweise, daß die Überlebensfähigkeit der „in vivo“ untersuchten LPS-Mutanten im Dünndarm beeinträchtigt sein könnte, ergaben Untersuchungen „in vitro“, die in Gegenwart von Substanzen, die nachweislich im Dünndarm vorkommen, durchgeführt wurden. Das Vorhandensein von einem intakten Kernoligosaccharid ohne O-Antigen (Abb. 29 D) war ausreichend, um ähnlich gut wie der Wt in Gegenwart von Gallensäuren und schwachen organischen Säuren zu überleben. Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid waren dagegen sensitiv, wobei die R-LPS-Mutante jeweils am stärksten beeinträchtigt war. Ein ausreichender Schutz gegenüber Gallensäuren und organischen Säuren scheint essentiell für die Persistenz von *V. cholerae* im Dünndarm zu sein, da u.a. induzierbare Systeme nachgewiesen wurden, die das Überleben in Gegenwart dieser Substanzen erhöhen. In Gegenwart von schwachen organischen Säuren, die intrazellulär akkumulieren können und dadurch den osmotischen Druck erhöhen (66, 176), wird z.B. das ATR-System induziert (142). Ist dieses System induziert, überleben auch die

R-LPS-Mutanten wesentlich besser, allerdings war über einen längeren Zeitraum betrachtet auch in der R-LPS-Mutante kein ausreichender Schutz gewährleistet. Diese Tatsache spricht dafür, daß ein intaktes Kernoligosaccharid für die Persistenz in Gegenwart von organischen Säuren notwendig ist.

Gallensäuren lagern sich in die Innenmembran ein und zerstören dadurch das Membranpotential. Zudem ist bekannt, daß in Anwesenheit von Gallsäuren die Expression von Virulenzfaktoren beeinflusst wird, so ist z.B. die Motilität erhöht, während die Transkription von *ctxA* (CT) und *tcpA* (TCP Pili) reprimiert wird (82). Aus diesem Grund ist es vermutlich für *V. cholerae* wichtig, Gallensäuren effektiv aus der Zelle fernzuhalten. An diesem Vorgang sind zum einen Effluxpumpen beteiligt (36), andererseits scheint auch die Ausbildung einer stabilen undurchlässigen AM essentiell zu sein. Daran sind wahrscheinlich, wie hier gezeigt, die LPS-Kernoligosaccharid-Struktur und von anderen gezeigt, das AM-Porin OmpU beteiligt. OmpU wird während der Infektion exprimiert – gleichzeitig wird die Synthese von OmpT reprimiert – und scheint dabei eine Pore auszubilden, die selektiv ist und die Diffusion von Gallensäuren kaum zuläßt (169).

Beide LPS-Substrukturen, O-Antigen und Kernoligosaccharid waren dagegen an der Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen des angeborenen Immunsystems beteiligt. O-Antigen negative Mutanten waren extrem sensitiv gegenüber dem Komplementsystem. Dieses Verhalten wurde auch von anderen Autoren berichtet (219). Es ist möglich, daß wie in anderen, bereits gut untersuchten Gram-negativen Bakterien die Resistenz des Wt auf das Abfangen des Membran-Angriffskomplexes durch Bindung von C3 an das O-Antigen zurückzuführen ist (105), was aber bisher experimentell für *V. cholerae* O1 nicht gezeigt wurde. Ein intaktes Kernoligosaccharid scheint für ausreichenden Schutz gegen das Komplementsystem ebenfalls wichtig zu sein, da die Überlebensfähigkeit der *galU*-Mutanten in Gegenwart von menschlichem Serum ebenfalls herabgesetzt war. Auch hier kann bisher nur spekuliert werden, daß eventuell die Dichte an LPS-Molekülen nicht ausreichend war, um das Einlagern des Membran-Angriffskomplexes sterisch zu verhindern. Interessanterweise sind auch die Pili TCP an der Resistenz gegenüber dem Komplementsystem beteiligt (164), die Ursache dafür ist eventuell in der Ausbildung von Mikrokolonien zu suchen (117). Inwieweit dies aber „in vivo“ eine Rolle spielt ist bisher nicht geklärt, da z.B. eine Pilus-Mutante extrem sensitiv gegenüber dem Komplementsystem war, in neugeborenen Mäusen aber kolonisieren konnte (117).

Für die Resistenz gegenüber antimikrobiellen kationischen Peptiden ist dagegen die Ausbildung einer intakten Kernoligosaccharid-Struktur wichtiger als die Anwesenheit eines intakten O-Antigens. Diese Peptide lagern sich zunächst in die AM ein und zerstören damit deren Integrität, können aber anschließend auch in die IM gelangen und diese damit depolarisieren (54). Die Resistenz gegenüber solchen Peptiden kann von der Konzentration und der Ladung der LPS-Moleküle abhängen. Zusätzlich wurden für verschiedene Bakterien induzierbare Systeme beschrieben, die die Resistenz erhöhen, so z.B. Effluxpumpen in Yersinien

(14); Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung des Lipid A in *S. typhimurium* (81); Modifikation des Kernoligosaccharides mit Ethanolamin und die des LipidA mit 4-Aminoarabinose in *S. typhimurium*, wobei beide Maßnahmen die positive Ladung im LipidA-Kernoligosaccharid-Bereich erhöhen und dadurch vermutlich Resistenz vermitteln (54). Für *V. cholerae* wurden solche Resistenzmechanismen bisher noch nicht beschrieben.

Es ist noch anzumerken, daß in den „in vitro-Virulenz Studien“ teilweise auch die spontan phagenresistente Mutante mit verändertem O-Antigen (Abb. 29 B) mituntersucht wurde. Die genetische und biochemische Ursache dieser Mutation konnte nicht zweifelsfrei ermittelt werden, indirekte Hinweise deuten an, daß eventuell das Tetronat nicht mehr synthetisiert wird. Diese Mutante wurde noch nicht auf ihre Kolonisierungsfähigkeit in neugeborenen Mäusen untersucht. In den „in vitro“ Untersuchungen verhielt sie sich aber tendenziell wie eine O-Antigen negative Mutante. Weiterhin waren in den „in vitro“ Versuchen auch die *galE* und *galEK*-Mutanten einbezogen worden. Beide Mutanten waren ausnahmslos so resistent wie der Wt, was zusätzlich bestätigte, daß sie ein intaktes LPS exprimieren. Durch diese vergleichende Untersuchungen wurde nochmal unterstrichen, daß auch in den „in vitro“ Studien die Beeinträchtigung der *galU*-Mutante im Gal-Stoffwechsel keine Rolle spielte.

Zusammenfassend lieferten die „in vivo“ und „in vitro“ Untersuchungen gute erste Anhaltspunkte, daß *galU*-Mutanten aufgrund ihrer veränderten LPS-Struktur unter den harschen Bedingungen im Dünndarm nicht ausreichend persistieren können. Natürlich sind zusätzliche pleiotrope Effekte der *galU*-Mutante nicht auszuschließen, da durch den Verlust der UDP-Glukose-Synthese auch andere Funktionen beeinträchtigt sein könnten. Um die Relevanz der Kernoligosaccharid-Struktur in der *V. cholerae*-Pathogenese weiter zu adressieren, müßten in künftigen Arbeiten definierte Mutanten des *waa*-Genclusters mit veränderter Kernoligosaccharid-Struktur auf ihre Kolonisierungsfähigkeit getestet werden. Interessant wäre aber auch zu klären, ob *V. cholerae* anderer Serogruppen dieselbe Kernoligosaccharid-Struktur aufweisen, oder ob die Serogruppen O1 und O139 eventuell aufgrund der Zusammensetzung ihres Kernoligosaccharides einen Persistenzvorteil im menschlichen Dünndarm haben.

Weiterhin gilt es in Zukunft die Frage der exakten Rolle des O-Antigens der Serogruppe O1 bei der *V. cholerae* Pathogenese zu klären. In dieser Arbeit wurde zu der bekannten Sensitivität gegenüber dem Komplementsystem auch eine Sensitivität gegenüber antimikrobiellen kationischen Peptiden festgestellt, was andeutet, daß auch diese Mutanten in der Überlebensfähigkeit beeinträchtigt sind. Bisher steht immer noch die Frage offen, ob das LPS zusätzlich auch an der Adhärenz an die Darmmukosa beteiligt ist. Andere Arbeitsgruppen haben bereits Hinweise darauf gefunden, in dem sie zeigen konnten, daß gereinigtes O1-LPS als Kompetitor eingesetzt, die Adhärenz von *V. cholerae* O1 an die Mukosa bzw. differenzierten Zellen herabsetzt (15, 35). Da nun ein Set an verschiedenen LPS-Mutanten bzw. gereinigtes LPS aus diesen Mutanten zur Verfügung steht (Abb. 29), könnte die Bindung an die Darmmukosa bzw. die Schleimschicht in geeigneten experimentellen Ansätzen gezielt untersucht werden.

### 3. Phageninfektion contra *V. cholerae* Oberflächenstrukturen

#### *Das O-Antigen als Phagenrezeptor des temperenten Phagen K139*

Der Phage K139 ist innerhalb pathogener *V. cholerae* O1 El Tor Isolate weit verbreitet und konnte auch in O139 Stämmen nachgewiesen werden. Eine Infektion mit K139 war bisher nur mit nicht-lysogenen O1 El Tor Stämmen, nicht aber in O139 Stämmen möglich (158, 173). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Plaqueinhibitions-Studien gezeigt, daß K139 die O-spezifische Seitenkette von *V. cholerae* Stämmen der Serogruppe O1 erkennt. In diesen Experimenten wird gereinigtes LPS mit dem lytischen Phagen K139.cm9 vorinkubiert und anschließend die Plaquebildungs-Kapazität des Phagen in einem Referenzstamm untersucht. Findet eine LPS-Phagen-Interaktion statt, kann der Referenzstamm nicht mehr infiziert werden.

Eine Interaktion des Phagen mit LPS der Serogruppe O139 konnte nicht nachgewiesen werden, auch nicht dann, wenn gereinigtes LPS des K139 lysogenen Stammes MO10 der Serogruppe O139 eingesetzt wurde. Diese Daten deuten an, daß es sich bei dem O139 Stamm MO10, aus dem der Phage ursprünglich isoliert worden war (173), um einen vormals O1 El Tor Stamm handelt. Die Serogruppenkonversion durch Austausch der *rfb*-Gencluster gilt in der Zwischenzeit für *V. cholerae* als etabliert. Sowohl epidemiologische (16, 83, 91) als auch molekularbiologische (19, 199) Untersuchungen sprechen dafür, daß pathogene Stämme der Serogruppe O139 aus O1 El Tor Stämmen entstanden sind. Allerdings wird seit kurzem auch ein alternativer Weg der Entstehung pathogener O139-Stämme diskutiert. Die Theorie beruht auf der Beobachtung, daß aus der Umwelt TCP positive O139 Stämme isoliert werden können, die mit dem Cholera-toxinphagen transduziert werden konnten und nachweislich CT produzierten (58). Bisher wurde aber noch nicht der Nachweis erbracht, daß diese Stämme „in vivo“ pathogen sind. Wäre der Stamm MO10 jedoch über diesen alternativen Weg entstanden – hätte also nie das O1-Antigen synthetisiert - müßte man postulieren, daß das Phagen-genom von K139 durch andere Mechanismen, z.B. konjugative Transposition in trans, oder durch einen anderen, generell transduzierenden Phagen aus einem K139-lysogenen Isolat in den O139 Stamm MO10 übertragen worden war. Eventuell können pathogene *V. cholerae* mit anderen Serogruppen als O1 auf unterschiedliche Weise entstehen.

Es ist nicht auszuschließen, daß auch weitere *V. cholerae* Serogruppen mit dem Phagen K139 infiziert werden können. Der Phage CP-T1, der ebenfalls das O-Antigen der Serogruppe O1 erkennt (78) kann z.B. auch Isolate der Serogruppe O37 infizieren (27). Diese Möglichkeit des Phagen K139 hängt davon ab, ob andere Serogruppen in ihrem O-Antigen den von K139 zur spezifischen Bindung benötigten Rezeptor exprimieren. Diese definierte biochemische Struktur innerhalb des O1-Antigens konnte bisher nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Die spontan phagenresistenten Stämme mit verändertem O-Antigen und die konstruierte Mutante P27459 $\Delta$ *wbeLpKEK* deuten an, daß Tetronat, das mit jeder Perosaminuntereinheit verestert ist, eine mögliche wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Phagen und O-Antigen spielen

könnte. Allerdings fehlt bisher der biochemische Nachweis, daß diese beiden Stämme tatsächlich Perosamin ohne Tetronat bilden. Zwei andere mögliche Strukturen konnten durch Plaqueinhibitions-Studien als Phageninteraktionspartner ausgeschlossen werden. Zum einen spielt die Methylierung des terminal lokalisierten Perosamins keine Rolle bei der Phagenerkennung, da LPS der Serotypen Ogawa (terminales Perosamin methyliert (92)) und Inaba (terminales Perosamin demethyliert) mit dem Phagen interagieren konnten. Zum anderen scheidet Quinovosamin (2-Amino-2,6-Dideoxy-D-Glukose) aus, das im LPS der Serogruppen O1 (200) und O139 (121) nachgewiesen wurde.

### *Spontan phagenresistente Mutanten und der Infektionsweg nach Phagenbindung*

Die isolierten spontan phagenresistenten Mutanten könnten auch Einblicke in den weiteren Infektionsverlauf nach Bindung des Phagen an das O1-Antigen geben, der bisher für K139 unbekannt ist. Für Gram-negative Bakterien wurden bisher vier grundsätzlich verschiedene Modelle postuliert, die in Abb. 30 dargestellt sind (50). Um zunächst einen Überblick über den jeweiligen Grund der Phagenresistenz zu erhalten, wurden die spontan phagenresistenten Isolate eingeteilt in Phagenrezeptor-Mutanten und Mutanten, in denen der Phageninfektionsprozeß an einer anderen Stelle unterbrochen sein muß. Die drei verschiedenen Mutantentypen mit Defekten im O-Antigen (O-Antigen negative Stämme, R-LPS-Mutanten, Mutanten mit verändertem O-Antigen) waren eindeutig Phagenrezeptor-Mutanten, die, wie in Plaqueinhibitions-Studien gezeigt werden konnte, keine Interaktion zwischen Phagen und LPS mehr erlaubten. Bei den *galU*-Mutanten und den transluzente Mutanten mit offensichtlich unverändertem LPS kann es sich dagegen nicht um eine gestörte LPS-Phagen-Interaktion handeln, da der Phage in Plaqueinhibitions-Studien mit dem vorhandenen O-Antigen dieser Stämme interagieren konnte. Dies könnte andeuten, daß es in diesen Stämmen nicht zur Injektion der Phagen-DNA kommen kann.

Bei *galU*-Mutanten könnte eventuell das veränderte Kernoligosaccharid für den Abbruch des Infektionsprozesses verantwortlich sein. In den transluzenten Mutanten mit intaktem LPS ist dagegen nicht auszuschließen, daß zelluläre Proteine, wie Außenmembranproteine, periplasmatische Proteine oder gar Innenmembranproteine mutiert sind (vgl. Abb. 30 III, IV). Gerade diese Mutanten könnten Hinweise auf die Beteiligung wirtseigener Proteine beim Infektionsverlauf des Phagen K139 liefern. Es wäre allerdings experimentell einfacher diese Wirtsproteine aufzudecken, wenn man nicht wie in dieser Arbeit Spontanmutanten, sondern statt dessen beispielsweise durch gerichtete Mutagenese phagenresistente Transposon-Insertionsmutanten isolieren würde. Die Frage nach Beteiligung von Wirtsproteinen bei der Phageninfektion wäre auch aus einem anderen Aspekt interessant, da Hinweise gefunden wurden, daß ein periplasmatisch lokalisiertes, vom Phagen K139 selbst kodiertes Protein (Glo) möglicherweise den DNA-Injektionsprozess in eine K139-lysogene Zelle verhindern kann (158).

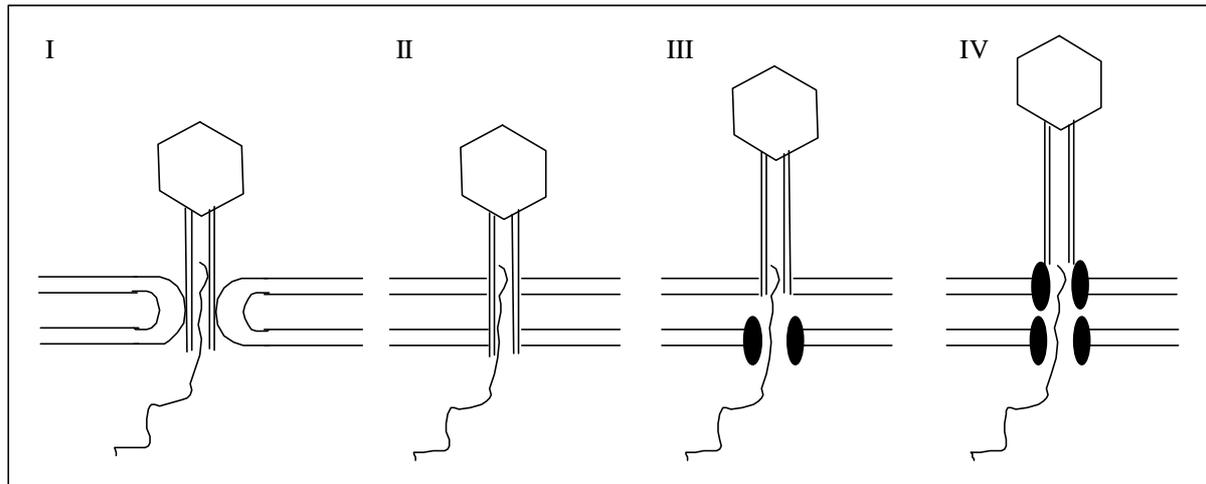


Abb. 28: **Mögliche Mechanismen für die Injektion von Phagen-DNA in Gram-negativen Bakterien.** Abbildung nach Dreiseikelmann (50).

(I) Der Phage kann nach der Bindung eine Membranfusion der äußeren und inneren Bakterienmembran induzieren, so daß eine Art Tunnel für den Phagenschwanz entsteht (Bsp. T4-Phage).

(II) Phagenschwanzproteine können sich sowohl in die äußere als auch in die innere Membran einlagern. Dies erlaubt die Penetration des Phagenschwanzes durch beide Membranen (Bsp. T5-Phage).

(III) Der Phagenschwanz bildet eine Pore durch die äußere Membran und nutzt ein zelluläres Innenmembranprotein für die DNA-Injektion (Bsp. Phage fd).

(IV) Die DNA-Injektion wird nach Interaktion mit einer Pore der äußeren Membran induziert und die DNA gelangt durch eine Pore der AM und ein IM-Transportsystem ins Cytoplasma (Bsp. Phage  $\lambda$ ).

### *Phagenresistenz durch Synthese eines Exopolysaccharides und Biofilmbildung*

Die Resistenz der Opakvarianten gegenüber dem Phagen K139.cm9 unter Laborbedingungen ist wahrscheinlich auf ein von diesen Stämmen konstitutiv exprimiertes Exopolysaccharid (VPS) zurückzuführen. Ein direkter Nachweis der VPS-Synthese wurde bisher nicht erbracht, da noch kein Antikörper gegen das VPS zur Verfügung stand. Drei verschiedene Beobachtungen deuten aber an, daß die Diffusion des Phagen K139 durch eine externe Kohlenhydrat-Matrix erschwert ist und der Phage seinen Rezeptor, das O1-Antigen, nur schwer erreichen kann, was im Endeffekt dazu führt, daß nur wenige Zellen lysiert werden können. Die Befunde dazu waren: (a) Opakvarianten konnten in Gegenwart des lytischen Phagen K139.cm9 Kolonien bilden. (b) Der Phage konnte noch mit dem gereinigten LPS aus einer Opakvariante interagieren und eine Plaquebildung war in Opakvarianten noch eingeschränkt möglich. (c) Opakvarianten, in denen *galE* deletiert wurde, zeigten eine transluzente Koloniemorphologie, da sie vermutlich das VPS nicht mehr synthetisieren konnten und waren wie der transluzente Wt wieder sensitiv gegenüber dem Phagen K139.cm9. Die Transduktion des filamentösen Phagen CTX $\Phi$  war dagegen in transluzenten Stämmen und Opakvarianten gleich gut möglich. Alle erhaltenen Km<sup>r</sup>-Transduktanten des Phagen CTX $\Phi$ -Km bildeten weiterhin opake Kolonien. Dieser Phage scheint somit durch die Kohlenhydrat-Matrix diffundieren zu können.

Die Opakvariante konnte im Gegensatz zum parentalen transluzenten Ausgangsstamm P27459 einen Biofilm an abiotischen Oberflächen bilden. Warum der Wt P27459 nicht (mehr) zur Biofilmbildung befähigt ist, ist bisher ungeklärt. Dieses Verhalten wurde auch für andere O1 El Tor Isolate beschrieben (239). Eigene Untersuchungen mit ein paar klinischen O1 El Tor Isolaten zeigten, daß manche einen Biofilm an abiotischen Oberflächenmaterialien bilden können, während andere, wie P27459, dazu nicht in der Lage sind (Daten nicht gezeigt). Molekularbiologische Untersuchungen zur Biofilmbildung in *V. cholerae* stehen noch am Anfang (227, 229, 239), gewinnen aber immer mehr an Bedeutung, da zu vermuten ist, daß auch pathogenen O1 und O139 Stämme in vielfältigen aquatischen Biofilmen persistieren. Die Assoziation von pathogenen *V. cholerae* mit Phyto- und Zooplankton, und deren Vermögen Cholera zu verursachen, wurde bereits demonstriert (37). Über den Prozeß der Ausbildung eines dreidimensionalen Biofilms an abiotischen Oberflächen ist bisher nur bekannt, daß *V. cholerae* dazu eine funktionstüchtige Flagelle und die Typ IV Pili MSHA benötigt. Diese Biofilme sind aber nur stabil, wenn anschließend das VPS synthetisiert werden kann. Es entsteht dann ein stabiles Geflecht mit wassergefüllten Kanälen (226, 227).

Natürlich vorkommende Biofilme, die selten nur von einer Bakterienspezies besiedelt sind, stellen auch eine ideale Umgebung für genetischen Austausch zwischen Mikroorganismen dar (68). Ob die Verbreitung des temperenten Phagen K139 in Biofilmen stattfinden kann, ist fraglich aufgrund des Befundes, daß dieser Phage wahrscheinlich nicht gut durch die VPS-Matrix diffundieren kann. Die Transduktion des filamentösen Phagen CTX $\Phi$  und damit auch des Cholera-toxins innerhalb von Biofilmen ist ebenfalls ungewiss, da nicht bekannt ist, ob *V. cholerae* die als Phagenrezeptor dienenden Pili TCP unter diesen Bedingungen synthetisiert.

