

III Material und Methoden

1. Antisera, Bakteriophagen, Bakterien, Oligonukleotide und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Antisera, Bakteriophagen, Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide, sind in den Tabellen 1 - 5 beschrieben.

Antisera	Beschreibung	Herkunft
Anti-BlaM	Serum aus Kaninchen gegen β -Lactamase	5Prime \rightarrow 3Prime
Anti-Cholera toxin	Serum aus Kaninchen	Sigma
Anti-O1 LPS	Serum aus Kaninchen gegen <i>V. cholerae</i> der Serogruppe O1 (polyvalent)	Difco
Anti-Kaninchen	Serum aus Schwein, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase	DAKO

Tabelle 1: Antisera

Bakteriophagen	Beschreibung	Referenz/Herkunft
K139	Wt Phage aus O139 Stamm MO10 isoliert	(173)
K139.cm9	Lytischer <i>V. cholerae</i> Phage	(158)
CTX-Km Φ	Filamentöser Phage, Km ^r -transduzierend	(218)

Tabelle 2: Bakteriophagen

Bakterienstamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
<u><i>E. coli</i> K12</u>		
LE392	F ⁻ <i>supF supE hsdR galK trpR metB lacY tonA</i>	(188)
SM10 λ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu</i> λ pirRK6, Km ^r	(146)
<u><i>V. cholerae</i></u>		
AI1838	O139, Bangladesh 1993, Sm ^r	(220)
MAK757	O1 Ogawa, El Tor, Celebes 1937	(141)
MAK757K139.cm9	O-Antigen negative Mutante, lysogenisiert mit lytischem Phagen K139.cm9	(158)
MAK757res3	<i>manB1194::IS1004</i> , O-Antigen ⁻	diese Arbeit
MO10	O139, Indien 1992, K139 lysogen	(220)

Bakterienstamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
O395	O1 Ogawa, Klassisch, Indien 1964	(141)
O395pCTX-Km		(218)
O395-R1	O395 <i>gmd::Tn5lac</i> , O-Antigen ⁻ , Km ^r	(219)
P27459	O1 Inaba, El Tor, Bangladesh 1976	(165)
P27459-S	P27459 spontan Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>manB</i>	P27459-S Δ <i>manB</i> , O-Antigen ⁻ , Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>fla::cm</i>	P27459-S Δ <i>fla::cm</i> , Cm ^r , Sm ^r	Karl Klose
P27459Δ <i>fla::cm galU</i>	P27459-S Δ <i>fla::cm galU::pCVD442</i> , Ap ^r , Cm ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>galE::cm</i>	P27459-S Δ <i>galE::cm</i> , Cm ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>galK</i>	P27459-S Δ <i>galK</i> , Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>galK ΔgalE::cm</i>	P27459-S Δ <i>galK ΔgalE::cm</i> , Cm ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459 <i>galU</i>	P27459-S <i>galU::pCVD442</i> , Ap ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459 <i>lacZ</i>	P27459-S <i>lacZ::pMD13</i> , Ap ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459res30	P27459 <i>wbeW25::IS1004</i> , O-Antigen ⁻	diese Arbeit
P27459res30rev	spontan Revertante von P27459res30	diese Arbeit
P27459res46	R-LPS Mutante von P27459, spontan Sm ^r	diese Arbeit
P27459res105	Opakvariante von P27459-S, Sm ^r	diese Arbeit
P27459res105Δ <i>galE::cm</i>	P27459res105 Δ <i>galE::cm</i> , Cm ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459res105 <i>galU</i>	P27459res105 <i>galU::pCVD442</i> , Sm ^r	diese Arbeit
P27459res108	spontan Mutante von P27459-S, LPS intakt, Sm ^r	diese Arbeit
P27459res118	R-LPS Mutante von P27459-S, Sm ^r	diese Arbeit
P27459res144	spontan Mutante von P27459-S, verändertes O-Antigen, Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>toxR</i>	P27459-S Δ <i>toxR</i> , Sm ^r	diese Arbeit
P27459 <i>waaF</i>	P27459-S <i>waaF::pGP704</i> , Ap ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>wbeL</i>	P27459-S Δ <i>wbeL</i> , O-Antigen negativ	diese Arbeit
P27459Δ <i>wbeLpKEK</i>	Integration von pKEKΔ <i>wbeL</i> in P27459	diese Arbeit
P27459 <i>wbeN</i>	P27459-S <i>wbeN::pGP704</i> , O-Antigen ⁻ , Ap ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459 <i>wbeO</i>	P27459-S <i>wbeO::pGP704</i> , O-Antigen ⁻ , Ap ^r , Sm ^r	diese Arbeit
P27459Δ <i>wbeW</i>	P27459-S Δ <i>wbeW</i> O-Antigen ⁻ , Sm ^r	diese Arbeit

Tabelle 3: **Bakterienstämme.** Die Bakterienstämme wurden als Glycerin-Kulturen bei -80° C aufbewahrt. Zu 1 ml ÜN-Kultur wurden 500 µl 70 % Glycerin zugegeben und eingefroren.

Oligo	Sequenz¹⁾	Referenz²⁾
cm1	<u>GCAAGTCGACGGGCCCGCACCTCAAAAACACCATCATA</u> CA	
cm2	<u>AGTCGTCGACAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTG</u>	
galEPstI	<u>AAAAC</u> TCGACGAAAAGCCGTTACAATCGCCG	
galEFspI	<u>GAAAATGCGCAGGGCGTTTGTATAGCAACAG</u>	
5'galESmaI	<u>TCCCCCGGGCTATCGTACGGCTCATAACA</u>	
5'galESalI	<u>TACGCGTCGACATACCCGCTTGGATCATCTG</u>	
3'galESalI	<u>TACGCGTCGACCGTAATCTACACACAATGGC</u>	
3'galEApal	<u>GTAAGGGCCCAATCGGCCACGGTGGAAATT</u>	
5'galKSmaI	<u>TCCCCCGGGTAAAAGATGGCGCGAGAACC</u>	
5'galKSaI	<u>TACGCGTCGACAAGGTGCGTAGCATCATAGC</u>	
3'galKSaI	<u>TACGCGTCGACCACCCGAAGCAAGTAGAAGC</u>	
3'galKApal	<u>GTAAGGGCCCATTTGCCAGCGACGACGATC</u>	
galUPstI	<u>AACTGCAGCTAGCACACCATAGAGCAA</u>	
galUFspI	<u>CCCTGCGCATGCATTGTTTAGATAGCGAAT</u>	
galUSaI	<u>AAGAGCTCAGCTATTGGGTGATATCCGTA</u>	
galUXbaI	<u>GATCTAGACTTCGATATAGCCTTCAACGC</u>	
IS1004	CTGCTCTTGCTCAAGCTCTT	Z67733
10	ATTGTCATCCCTAAACCACC	(20)
IS1004seq ³⁾	AAGAGCTTGAGCAAGAGCAG	Z67733
manBBamHI	<u>CGGGATCC</u> TGATGTAGTACGTTTCGAGG	X59554
manBSaI	<u>TACAGGTCGACCCGCTAGATAAGAACCATCT</u>	X59554
manBseq ³⁾	GCCCCGATATTAGCTTATC	X59554
O1	CGCCGACATAAACGAAATCA	X59554
O2	ACTTGCTGATTCTTTCCAAC	X59554
O3	GGAGACTCCTTACGAAAAAT	X59554
O4	ATTGTCTAGGAGCTATTACA	X59554
O5	GAGGTAGTAATGAAACATCT	X59554
O6	GTGATGAACCACTTCCATGT	Y07788
waaFEcoRI	<u>GGAATTC</u> CGATGACGAGTTTAGGTCTT	
waaFSaI	<u>GCAAGTCGAC</u> TTTGGAACGCATGCCTGAGG	
waaFPstI	<u>AAAAC</u> TCGACGTACATCGCAGCCAAAAGAGC	
waaFFspI	<u>GAAAATGCGCAGCACCTTTTTCAAACCAGAGG</u>	
waaFseq	ACTAAGCTGAGTCGCTGTCCG	
waaLNsiI	<u>GGAATGCAT</u> ATTAGTTGGAACACGACCCT	
waaLseq	CTCTCAGTTGTAGCTGCAAC	
waaORF1	ATGAATATTTTGATGGCCCT	
waaORF2	ATGGCTGGCTTTGGTTTAAT	
5'wbeLSmaI	<u>TCCCCCGGGATGTCTATCTCTGAAGAAAA</u>	X59554
5'wbeLSaI	<u>TTTTGTGTCGACGCTATAACAATCCGGTCTTGA</u>	X59554
3'wbeLSaI	<u>ACGCGTCGAC</u> TTTGCCAAAGACCGTTTCAG	X59554

Oligo	Sequenz ¹⁾	Referenz ²⁾
3`wbeLapaI	<u>TTTTGGGCCCC</u> ATCAATGATAGAACCGCCG	X59554
wbeNSaI	<u>ACGCGTCGACT</u> TTTTGGATTACGTTTGTA	X59554
wbeNEcoRI	<u>GGAATTC</u> AGGTCATCTGTAAGTACAAC	X59554
wbeOSaI	<u>ACGCGTCGAC</u> TTAGAATTGATGATTATGTC	X59554
wbeOEcoRI	<u>GGAATTC</u> CTCCACAATGACTTTAGGT	X59554
wbeOPstI	<u>AACTGCAGATA</u> AGTTCGATGTTCCAAACT	X59554
wbeOStuI	<u>AAGGCCTATCTT</u> TCTGATACTTTTCTAC	X59554
5`wbeWSmaI	<u>TCCCCCGGG</u> ATTCCCTTACCTCTTGGTGC	X59554
5`wbeWSaI	<u>ACGGCTCGAC</u> CAGAAAATAGGGGAGCCAGT	X59554
3`wbeWSaI	<u>ACGCGTCGAC</u> GACACCAGTAAAGCTTGCAG	X59554
3`wbeWapaI	<u>GAGGGCCCC</u> GATGTGCGCATGAGTTAAG	X59554
wbeWPstI	<u>AAA</u> ACTGCAGAAAAACTACACTGGTCGCC	X59554
wbeWseq ³⁾	AAAAAACTACACTGGTCGCC	X59554

Tabelle 4: **Oligonukleotide.** Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen MWG Biotech und ARK. 1) Unterstrichene Nukleotide gehen keine Basenpaarung ein und wurden eingefügt um Restriktionsschnittstellen anzuhängen. 2) Die Sequenzinformation stammte aus dem *V. cholerae* Genomprojekt (96), wenn keine Accession-Nummer oder Zitat angegeben wurde. 3) Sequenzierprimer (markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff) wurden mit seq hinter dem Oligonamen gekennzeichnet.

Plasmide	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pACYC177	Klonierungsvektor, Km ^r , Ap ^r	(177)
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tc ^r	(178)
pACYCgalU	<i>galU</i> in <i>bla</i> von pACYC177, Km ^r	diese Arbeit
pACYCgalE	<i>galE</i> in <i>bla</i> von pACYC177, Km ^r	diese Arbeit
pACYCwaaF	<i>waaF</i> in <i>bla</i> von pACYC177, Km ^r	diese Arbeit
pACYCWbeO	<i>wbeO</i> in <i>bla</i> von pACYC177, Km ^r	diese Arbeit
pBR322	Klonierungsvektor, Ap ^r , Tc ^r	(230)
pCVD442	Suizidvektor, <i>sacB</i> , oriR6K, mobRP4, Ap ^r	(49)
pCVDgalU	‘ <i>galU</i> ‘ in pCVD442	diese Arbeit
pGP704	Suizidvektor, oriR6K, mobRP4, Ap ^r	(146)
pGPwaaF	‘ <i>waaF</i> ‘ in pGP704	diese Arbeit
pGPwbeN	‘ <i>wbeN</i> ‘ in pGP704	diese Arbeit
pGPwbeO	‘ <i>wbeO</i> ‘ in pGP704	diese Arbeit
pJNmanB	<i>manB</i> in <i>tet</i> von pACYC184, Cm ^r	diese Arbeit
pJNwbeW	<i>wbeW</i> in <i>bla</i> von pACYC177, Km ^r	diese Arbeit
pKEK89	<i>flaA</i> Komplementationsplasmid	(119)
pKEK229	pCVD442 mit Polylinker aus pWSK30	(39)
pKEKΔgalE	‘ORF <i>galE</i> ‘-‘ <i>galE</i> ORF‘ in pKEK229, Ap ^r	diese Arbeit
pKEKΔgalE::cm	<i>cat</i> in pKEKΔgalE, Cm ^r , Ap ^r	diese Arbeit

Plasmide	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pKEKΔgalK	´galTgalK´- ´galKgalM´ in pKEK229, Ap ^r	diese Arbeit
pKEKΔwbeL	wbeKwbeL´- ´wbeLwbeM´ in pKEK229, Ap ^r	diese Arbeit
pKEKΔwbeW	´ORF35wbeW´- ´wbeWORF´ in pKEK229, Ap ^r	diese Arbeit
pMD13	´lacZ´	(52)
pMD60	pCVD422 ΔtoxR1	(119)
pTrc99Akan	Expressionsvektor, Km ^r	(158)

Tabelle 5: **Plasmide**

2. Geräte und Chemikalien

Geräte	Hersteller/Vertrieb
Blotgeräte	
Semi-dry Blotgerät (Transfer Proteine)	BioRad
Tankblotgerät (Transfer LPS)	BioRad (Trans Blot Cell)
Vakuumblotgerät (Transfer DNA)	Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammern	
Für Agarose-Gele	BioRad; MWG Biotech
Mini Protean 3 (PAA-Gele)	BioRad
Protean II Xi Cell (PAA-Gele)	BioRad
Elektroporationsgerät	EQUIBIO (Easyject prima)
ELISA Reader	BioRad (Microtiterplate Reader Model 450)
Geldokumentationsanlage	BioRad
Geltrockner	BioRad
Hybridisierungsöfen	MWG Biotech
Photometer	UNICAM; Pharmacia Biotech (Ultrospec3000)
Thermocycler	Hybaid (Omn-E) Eppendorf (Mastercycler gradient)
Wasserkühlung	Pharmacia Biotech (Multi TempIII)
Zentrifugen	
Kühlzentrifugen	Sorvall RC5B
Tischzentrifugen	Heraeus (Biofuge pico)
Ultrazentrifuge	Sorvall OTD75

Tabelle 6: **Geräte**

Antibiotika wurden von Sigma und Enzyme von den Firmen Gibco und NEB bezogen. Von der Firma Quiagen wurden Plasmidpräparationskits, der Lamda-DNA-Präparations-Kit und Quiaquick eingesetzt. Desweiteren wurden von Amersham Pharmacia Biotech der „ECL direct

nucleic acid labelling Kit“, der „ECL detection Kit“, ECL-Hyperfilme sowie Nitrocellulose- (Hybond C) und Nylonmembranen (Hybond N⁺) verwendet; Geräte sind in Tab. 6 aufgelistet. Alle nicht aufgeführten Chemikalien, Materialien und Geräte wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Applichem, BioRad, Eppendorf, Gibco, Gilson, Greiner, MWG, Roth und Sigma bezogen oder die Hersteller sind an geeigneter Stelle erwähnt.

3. Lösungen, Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen

Medien wurden von den Firmen Difco, Gibco und Oxoid bezogen. Folgende Medien wurden verwendet: **LB** (Luria-Bertani; 136, 144); **MHB** (Mueller Hinton Bouillon; bezogen von Oxoid enthält: 2g/l Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g; 17,5 g/l Caseinhydrolysat; 1,5 g/l Stärke); **TCBS** (Thiosulfat Citrat Bile Sucrose (111): 0,5 % Yeast extract, 1 % Bacto peptone, 1 % NaCitrat, 1 % NaThiosulfat, 0,8 % Bile, 2 % Saccharose, 1 % NaCl, 0,1 % FeCitrat, 0,004 % Bromthymolblau, 0,004 % Thymolblau, pH 8,6), **AKI** ((102): 1,5 % Bacto pepton, 0,4 % Yeast extract, 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO₃, pH 7,4) und **Minimalmedium M9** (136). Feste Medien wurden mit 1,6 % Agar hergestellt, Ausnahmen: **TB-Topagar** (Tryptone-Broth; (136, 144); angesetzt mit 0,6 % Agar) und Motilitätsagar-Platten (LB mit 0,3 % Agar).

Für die Herstellung aller Lösungen und Medien wurde über eine Reinstwasseranlage entsalztes und filtriertes Wasser verwendet (Milli-Q-Plus, Millipore). Für Verdünnungsreihen zur Lebendzellzahlbestimmung wurde überwiegend PBS (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,18 % Na₂HPO₄·2 H₂O, 0,024 % KH₂PO₄, pH 7,4) mit 0,1 % Pepton (BactoPepton, Difco) verwendet, da *V. cholerae* Zellen in dieser Lösung wesentlich stabiler sind, aber wie gewünscht kein Wachstum erfolgt. Die Lösungen und Medien wurden 20 Min bei 120° C und 10⁵ Pa Überdruck autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden durch Sterilfilter (Schleicher & Schuell, Porendurchmesser 0,25 µm) filtriert und den Medien und Lösungen erst nach Abkühlen unter 50° C zugegeben.

Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37° C, wenn nicht anders angegeben. Flüssigkulturen wurden bei optimaler Belüftung in einem Schüttelwasserbad oder auf einem Schütteltisch inkubiert. Für Experimente unter TCP und CT induzierende Bedingungen „in vitro“ wurden *V. cholerae* O1 Klassische Stämme ÜN bei 30° C in LB angezogen (72). O1 El Tor Stämme lassen sich dagegen nur sehr schlecht „in vitro“ induzieren. Eine recht gute Induktion erhielt man, wenn eine ÜNK (in AKI-Medium) zunächst in einem kleinen Reagenzglas in 12 ml AKI-Medium ohne NaHCO₃ 1:100 verdünnt und 4 h bei 37° C ohne Schütteln inkubiert wurde. Nachdem man 5 ml dieser Kultur in ein großes Reagenzglas überführt und für 4 h bei 37° C unter starkem Schütteln inkubiert hatte, wurden die Zellen für die Messung von CT und TCP verwendet (140).

Je nach Bedarf wurden folgende Kohlenstoffquellen, Antibiotika und Indikatoren in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	50 oder 100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml (<i>E. coli</i>); 2 µg/ml (<i>V. cholerae</i>) Stammlösung 30 mg/ml in 50 % Ethanol.
Kanamycin	50 µg/ml
Kohlenstoffquellen	Galaktose, Glukose, Fruktose, Maltose: 0,2 % Glycerin: 0,4 %
Streptomycin	100 µg/ml
Tetracyclin	12 µg/ml (<i>E. coli</i>); 1 µg/ml (<i>V. cholerae</i>) Stammlösung 12 mg/ml bzw. 1 mg/ml in 50 % Ethanol
XG	40 µg/ml (Stammlösung in N,N-Dimethylformamid)

4. Mikrobiologische und genetische Methoden

4.1. Stammkonstruktionen

Für die gezielte Inaktivierung von *V. cholerae* Genen wurden zwei verschiedene Strategien gewählt. Die Gene *lacZ*, *galU*, *waaF*, *wbeN* und *wbeO* wurden durch Insertion eines Suizidvektors in das entsprechende Gen inaktiviert (146). Die konjugierbaren, in *V. cholerae* nicht replizierfähigen, Ap^r Suizidplasmide pMD13 (52), pCVD*galU*, pGP*waaF*, pGP*wbeN* und pGP*wbeO* enthielten ein internes Fragment des entsprechenden Genes (Konstruktion III 5.9.2). Nach Konjugation der Plasmide von dem *E. coli*-Donor SM10λpir in einen Sm^r *V. cholerae* Rezipient (vgl. III 4.2.) erfolgte die Selektion der Stämme, die das Plasmid durch homologe Rekombination über das interne Gen-Fragment integriert hatten, auf LBApSm Platten. Die Mutanten wurden durch PCR- und Southernblot-Analysen überprüft.

Stämme mit Deletionen im Leseraster der Gene *galk*, *toxR*, *wbeL* und *wbeW* wurden durch Verwendung von einem positiven Selektionsmarker nach der Methode von Donnenberg und Kaper hergestellt (49). Die eingesetzten Suizidplasmide enthielten das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*. *sacB* kodiert für die Levansucrase, die Saccharose in für *V. cholerae* toxisches Levan umwandelt. Die Suizidplasmide pMD60 (119), pKEKΔ*galk*, pKEKΔ*wbeL* und pKEKΔ*wbeW* (Konstruktion III 5.9.3.), die stromauf- und stromabwärts-liegenden DNA-Bereiche vom zu deletierenden Gen enthielten, wurden wiederum von dem *E. coli* Donor in einen Sm^r *V. cholerae* Rezipienten konjugiert (vgl. 4.2.). Durch Selektion auf LBApSm-Platten wurden Kolonien angereichert, die durch homologe Rekombination das Plasmid integriert hatten. Jeweils drei solcher Kolonien wurden in LB ohne Antibiotika angezogen und zweimal überimpft (Wachstum jeweils bei 37° C für 10h oder ÜN). Die Kulturen wurden dann in 150 mM NaCl gewaschen, in 150 mM NaCl verdünnt und jeweils 100 µl der 10⁻¹, 10⁻² sowie 10⁻³-Verdünnungen auf Selektionsplatten (0,5 % Yeast, 1 % Trypton, 10 % Saccharose, 1,6 % Agar) mit Sm ausplattiert

und bei 30° für 18 h oder für 2 Tage bei RT inkubiert. Pro Mutante wurden 30 saccharose-resistente Kolonien gereinigt und durch phänotypische Tests nach solchen Stämmen gesucht, die durch ein zweites Rekombinationsereignis die Deletion des Genes zur Folge hatten, was gleichzeitig auch zum Verlust des Plasmides geführt hatte. Im Falle der Deletion von Teilbereichen der Gene *wbeW* und *wbeL* wurden die Kolonien auf Phagenresistenz gegen K139.cm9 getestet. *galK*-Deletionsmutanten konnten nicht mehr auf M9-Galaktose-Platten wachsen, während Δ *toxR*-Stämme schlecht auf TCBS-Platten wuchsen. Die Stämme wurden anschließend durch PCR- und Southernblotanalysen auf die eingeführte Deletion und auf die Abwesenheit des Suizidplasmides überprüft (als Sonden wurden Gen-spezifische PCR-Produkte und das Suizidplasmid eingesetzt).

galE wurde durch eine Kombination aus Deletion und Insertion inaktiviert. Das Plasmid pKEK Δ *galE*::*cm* enthält zwischen den von *galE* stromauf- und stromabwärts-liegenden DNA-Bereichen eine CAT-Kassette, die Cm^r vermittelt (vgl. III 5.9.3.). Dies erlaubte, nach Konjugation in die *V. cholerae* Rezipienten P27459-S, P27459res105 und P27459 Δ *galK* eine Selektion auf Cm (vgl. III 4.2.). Die Stämme, die durch ein Doppelrekombinations-Ereignis entstanden waren, konnten nicht auf Ap wachsen. Die *galE*-Deletion/*cm*-Insertion und die Abwesenheit des Plasmides wurde durch PCR- und Southernblotanalysen überprüft (als Sonden wurde ein *galE*-PCR-Produkt, ein *galK*-PCR-Produkt, ein *cat*-PCR-Produkt und das Plasmid pKEK229 eingesetzt).

4.2. Konjugation

Die Konjugation von Suizidplasmiden mit defektem oriR6K und mobRP4-Region erfolgte vom Sm^s Donor *E.coli* SM10 λ *pir* in einen Sm^r *V. cholerae* Rezipient. Im *E.coli* Stamm SM10 λ *pir* ist ein Derivat des lysogenen λ -Phagen integriert, der das *pir* Gen trägt. Das Protein π , kodiert vom *pir* Gen, ist essentiell für die Replikation von Plasmiden mit oriR6K (122). Zusätzlich ist im Chromosom dieses Stammes ein Derivat des Plasmides RP4 integriert, das über *tra*-Gene verfügt, die für den konjugativen Apparat kodieren. Dies ermöglicht den Transfer von Plasmiden mit mobRP4-Region in verschiedene Gram-negative Rezipienten (189).

Für die Konjugation wurden Einzelkolonien von Donor und Rezipient, die am Abend zuvor gereinigt worden waren, auf LB-Platten ohne Antibiotika übereinandergestreichen. Nach Inkubation der Platten für mindestens 4 h bei 37° C wurden mit einem Zahnstocher aus verschiedenen Bereichen des Bakterienrasens Proben entnommen und auf eine Selektionsplatte (LBSm mit weiteren geeigneten Antibiotika) auf Einzelkolonien ausgestrichen.

4.3. Selektion auf Streptomycinresistenz

Um nach der Konjugation selektiv *V. cholerae* Rezipienten anreichern zu können, wurden spontan streptomycinresistente *V. cholerae* isoliert. Streptomycin inhibiert die Proteinsynthese,

das Zielmolekül ist dabei ein Protein der 30S-UE des Ribosoms. Eine 5 ml LB-ÜK wurde ankonzentriert auf 600 µl und jeweils 200 µl auf eine LBSm-Platte ausplattiert. Sm^r-Kolonien wurden mehrmals gereinigt. Sm^r Stämme besitzen wahrscheinlich eine Mutation im *rpsL*-Gen, das für das S12-Protein kodiert, dies wurde aber nicht überprüft.

4.4. Bakteriophagen Techniken

4.4.1. Herstellung von Phagenlysaten

Die Lyse des Phage K139 ist nicht durch DNA-schädigende Agentien (Mitomycin C oder UV) zu induzieren. Um hochtitrige K139 oder K139.cm9 Phagenlysate zu erhalten (158, 173), wurde deshalb eine ÜNK des Stammes MAK757 1:100 in 100 ml LB/10 mM CaCl₂ überimpft und bei 37° C für ungefähr 30 Min inkubiert. Dann wurden 10 µl sterilfiltrierter Überstand einer ÜNK des Stammes MAK757K139.cm9 (enthält spontan freigesetzte K139.cm9-Phagenpartikel) oder MO10 (enthält spontan freigesetzte K139 Phagen) zugegeben. Der Kolben wurde bei 37° C unter starkem Schütteln inkubiert, bis die Kultur deutlich lysiert war. Die Kultur wurde abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Alternativ wurde manchmal auch Chloroform zum Abtöten der Zellen und Freisetzen der intrazellulären Phagenpartikel zugesetzt. Die Phagenlysate wurden bei 4° C im Glasgefäß aufbewahrt.

Ein CTX-Km Φ Phagenlysat wurden aus dem Stamm O395pCTX–Km gewonnen, der die replikative Form des Phagen enthält (II 2.2.3.1.). Dazu wurde ein Kultur ÜN in LB bei 30° C angezogen, abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Der Phage CTX-Km Φ ist chloroformsensitiv, deshalb darf hier kein Chloroform verwendet werden (218). Das Phagenlysat wurde bei 4° C in einem Glasgefäß aufbewahrt und war für ungefähr 6 Monate stabil.

4.4.2. Ermittlung des Phagentiters

Die Phagentiter der K139 und K139.cm9 Lysate wurden ermittelt (158, 173), indem 100 µl Phagenlysat verschiedener Verdünnungsstufen (in der Regel 10⁻⁵, 10⁻⁶ und 10⁻⁷) mit 100 µl Referenzstamm MAK757 in 5 ml TB-Topagar/10 mM CaCl₂ bei 42° C im Wasserbad gemischt wurden und der gesamte Ansatz nach kurzem Vortexen auf einer LB-Platte verteilt wurde. Die Anzahl der Plaques wurde nach 6 h Inkubation bei 37° C ausgezählt. Da der Phage CTX-Km Φ nicht lytisch ist kann der Phagentiter auf diese Weise nicht ermittelt werden, sondern nur durch Ermittlung der Phagentransduktionsfrequenz (4.4.4.).

4.4.3. Plaqueinhibitions-Studien

Plaqueinhibitions-Studien wurden mit Modifikationen nach Guidolin und Manning (78) durchgeführt. Das K139.cm9-Phagenlysat wurde in LB/10 mM CaCl₂ so verdünnt, daß der Titer ungefähr 10⁴ pfu/ml betrug. Zu 1 ml dieses Phagenlysates wurden variable Konzentrationen an gereinigtem LPS zugesetzt, einschließlich einem Ansatz ohne LPS, und die Ansätze für 60 Min

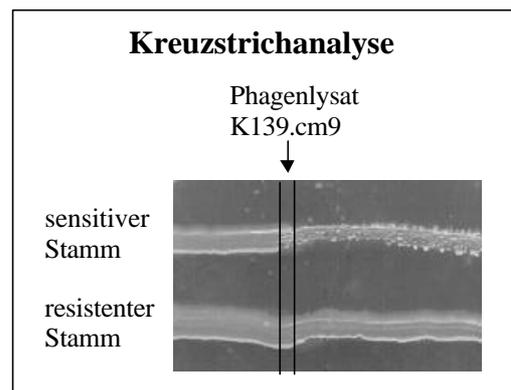
bei 37° C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurden jeweils 5, 10 und 50 µl eines Ansatzes zusammen mit 100 µl MAK757 ÜNK in 8 ml TB-Topagar/10 mM CaCl₂ (vorgewärmt in einem Reagenzglas bei 42° C im Wasserbad) pipettiert und das Gemisch nach kurzem Vortexen auf einer LB-Platte verteilt. Die Platten wurden für 6 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert und danach die Plaques ausgezählt. Die Inaktivierung der Plaquebildung in % wurde folgendermassen ermittelt: 100 – (100 mal Anzahl Plaques in Gegenwart von LPS dividiert durch die Anzahl der Plaques ohne zugesetztes LPS).

4.4.4. Phagentransduktion

Der Phage CTX-KmΦ kann *V. cholerae*-Stämme nur infizieren, wenn Pili TCP auf der Oberfläche vorhanden sind (218). Deshalb war es notwendig die Stämme unter TCP-induzierenden Bedingungen anzuziehen (vgl. III 3.). 200 µl dieser Kultur wurde dann mit 200 µl CTX-KmΦ Phagenlysat gemischt und für 30 Min bei RT inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 1, 10 und 100 µl auf Selektionsplatten (LBKm) ausplattiert. Um die Transduktionseffizienz zu ermitteln, wurde entweder die OD₆₀₀ der Kultur gemessen oder parallel die Lebendzellzahl bestimmt, indem die Kultur entsprechend verdünnt und auf LB-Platten ausplattiert wurde.

4.4.5. Isolierung spontan K139.cm9-resistenter Stämme

Phagenresistente Stämme wurden auf zwei unterschiedliche Weisen isoliert. K139.cm9 resistente MAK757-Kolonien wurden durch Kreuzstrich isoliert. Dazu wurde „eine Linie“ mit 200 µl frischem, hochtitrigem K139.cm9-Phagenlysat auf eine LB-Platte aufgetragen und nach dem Trocknen Einzelkolonien quer über die Phagenpartikeln gestrichen. Da der Stamm MAK757 sensitiv gegen K139.cm9 ist, bricht das Wachstum nach Kontakt mit dem Phagen ab. Danach tritt vereinzelt wieder Bakterienwachstum auf, diese Mischkulturen wurden isoliert, mehrmals auf Einzelkolonien gereinigt und anschließend durch erneuten Kreuzstrich auf Phagenresistenz getestet. Phagenresistente Kolonien konnten im Kreuzstrich leicht identifiziert werden, da sie über den lytischen Phagen wuchsen.



Die Anreicherung spontan phagenresistenter Mutanten des klinischen Isolates P27459 erfolgte durch Inkubation des Stammes mit dem lytischen Phagen K139.cm9 im TB Top-Agar. Ein Teil der Stämme wurde isoliert, indem eine P27459 ÜK 1:100 verdünnt und in der stationären Phase mit dem lytischen Phagen infiziert wurde. Um zu vermeiden, daß bereits existierende Mutationen innerhalb der Kolonie amplifiziert wurden, wurde in einem weiteren Versuchsansatz eine Einzelkolonie in LB stark verdünnt. Ungefähr 10 Zellen wurden in 50 ml LB inokuliert und bei 37° C im Schüttler inkubiert. Die Zellzahl im Inokulum wurde ermittelt,

indem das gleiche Volumen an Zellen mit dem inokuliert wurde, auf LB-Platten ausplattiert wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten in der früh-logarithmischen Phase wurden Aliquots aus der Kultur entnommen und mit Phagenlysat K139.cm9 (MOI 2 bis 10) in 9 ml TB-Topagar/10mM CaCl₂ (vorgewärmt bei 42° C) gemischt und auf eine große LB-Agarplatte verteilt. Die Platten wurden bei 37° C im Brutschrank für 16-24 h inkubiert. Einzelkolonien wurden aus dem Topagar gepickt, mehrmals gereinigt und im Kreuzstrich nochmals auf Phagenresistenz überprüft.

4.5. MHK- und MBK-Bestimmungen

Die Bestimmung der MHK (minimale Hemmkonzentration) von kationischen antimikrobiellen Peptiden erfolgte nach der Methode von Steinberg et al. (197). Durch Einhaltung dieser Methode mit den angegebenen Materialien, konnte die unspezifische Bindung von kationischen Peptiden an Oberflächenmaterialien vermieden und damit reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden. Die Stämme wurden ÜN bei 37° C in MHB Medium angezogen, dann in MHB auf ungefähr 10⁵ – 10⁶ CFU/ml verdünnt und jeweils 100 µl eines Stammes in eine Reihe einer U-förmigen Platte mit 96 Vertiefungen (Polypropylen, COSTAR) pipettiert. Für Protamine (Sigma) wurde eine 12 mg/ml und für PolymyxinB (Sigma) ein 10 mg/ml Stammlösung in 0,01 % Essigsäure hergestellt (in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen, Eppendorf). Für den eigentlichen Versuch wurde Protamine auf 6,75 mg/ml und PolymyxinB auf 500 µg/ml in 0,01 % Essigsäure mit 0,2 % BSA verdünnt. Diese 10fach Stammlösungen wurden seriell 1:2 mit 0,01 % Essigsäure mit 0,2 % BSA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Polypropylen) verdünnt und jeweils 11 µl pro Ansatz und Stamm zugegeben. Pro Stamm blieb ein Ansatz ohne Zugabe von kationischen Peptiden, um Wachstumsdefekte auszuschließen, die nicht auf die Peptide zurückzuführen waren. Die Mikrotiterplatten wurden in einem Kontainer mit feuchten Tüchern für 18 h bei 37° C inkubiert und dann wurde das Wachstumsverhalten ermittelt. Die MHK ist dabei die Konzentration an Peptid, bei der optisch kein Wachstum mehr zu erkennen ist. Die Bestimmung der MBK (minimale bakteriozide Konzentration) erfolgte durch ausplattieren jeweils eines Aliquots aus vier nacheinander folgenden Ansätzen, beginnend mit der Verdünnung, in der optisch noch Wachstum zu erkennen war, gefolgt von drei Verdünnungen ohne optisches Wachstum. Die MBK ist definiert als die Konzentration an Peptid, bei der keine überlebenden Zellen mehr vorhanden waren.

Die MHK von anionischen Detergentien wurde prinzipiell auf die gleiche Art und Weise bestimmt. Allerdings wurden die Stämme in LB Medium ÜN angezogen und verdünnt. Es wurden U-förmige Polystyren Microtiterplatten für 96 Proben (Greiner) verwendet und die Stammlösungen in H₂O angesetzt. Die getesteten Konzentrations-Bereiche lagen für SDS bei 600 µg/ml bis 9,3 µg/ml und für Novobiocin bei 1,5 µg/ml bis 23 ng/ml.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Präparation von Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Birnboim und Doly (21) beschriebenen Methode, die leicht modifiziert wurde. Dazu wurden 2 ml ÜNK abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 400 µg RNA, pH 8) resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wurde 300 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben, die Mischung durch invertieren gemischt und 5 Min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer 3 (2,55 M KAc, pH 4,8) zugegeben, der Ansatz durch invertieren gemischt und für 5 Min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Min, 4° C, 13 000 rpm) wurde der plasmidhaltige Überstand in ein frisches Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation (20 Min, RT, 13 000 rpm) gefällt. Das Pellet wurde mit 70% kaltem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen. Für die Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurde der Plasmidpräparationskit von Qiagen verwendet (Anleitung vgl. beiliegendes Handbuch).

5.2. Präparation chromosomaler DNA

Um neben chromosomaler DNA auch LPS für die Analyse auf SDS-Gelen zu erhalten (vgl. III 6.1.), wurde die Methode von Grimberg et al. (77) modifiziert, die ursprünglich nur zur Präparation von chromosomaler DNA beschrieben worden war. 4 ml einer ÜNK wurden abzentrifugiert, 1 x gewaschen in 2 ml TNE (10 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA) und das Pellet schließlich in 540 µl TNE (TNE/1 % Triton) resuspendiert. Nach Zugabe von 60 µl frisch angesetzter Lysozymlösung (5 mg/ml in H₂O) wurde für 20 Min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl ProteinaseK (20 mg/ml in H₂O) zugegeben, gemischt durch invertieren und für 2 h bei 65° C inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 2 ml „Phase lock gel“ Gefäß (Eppendorf) überführt, 600 µl Phenol (gesättigt in TE pH 8, Roth) zugegeben und durch invertieren gemischt. Nach Zentrifugation (10 Min, 13 000 rpm) wurde ein Aliquot der wässrigen Phase entnommen und für LPS-Analysen bei 4° C aufbewahrt. Aus 200 µl der wässrigen Phase wurde die chromosomale DNA durch Ethanol-fällung gewonnen. Dazu wurden 20 µl 5 M NaCl und 550 µl eiskalter 100 % Ethanol zugegeben und der Ansatz vorsichtig durch invertieren (ausfällen der DNA) gemischt. Nach Zentrifugation für 10 Min bei RT (13 000 rpm) wurde das Pellet mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

5.3. Präparation von Phagen DNA

Die Phagen-DNA wurde aus 250 ml K139-Phagenlysat gewonnen (vgl. III 4.4.1.). Dabei wurde der Lambda DNA Maxi Präparationskit von Quiagen verwendet.

5.4. Southern-Blot

Das Southern-Blot Verfahren (193) wurde angewandt um DNA-Fragmente zu identifizieren. Die chromosomale DNA (~15 µg) wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht der Verdau überprüft. Zudem wurde das Gel zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, um später den Marker auf der Membran einzeichnen zu können. Dies ermöglichte die Bestimmung der ungefähren Größen der hybridisierten Fragmente.

Die DNA-Fragmente wurden in einer Vakuum-Blot-Apparatur aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N⁺) transferiert. Um eine hohe Transfereffizienz zu erreichen, erfolgte zunächst eine Depurinierung der DNA für 15 Min mit einer 250 mM HCl-Lösung, anschließend wurde die DNA denaturiert für 20 Min in Lösung II (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH). Nach Neutralisierung für 30 Min in Lösung III (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5) erfolgte der eigentliche Transfer für 60 Min mit 20 x SSC Puffer (0,3 M Na₃Citrat, 3 M NaCl, pH 7). Die DNA wurde durch Crosslinking mit UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden, die anschließend in einer Hybridisierungslösung (enthalten im ECL-Kit, angesetzt mit 0,5 M NaCl) für 1 h bei 42° C vorhybridisiert wurde. Danach wurde die markierte Sonde, 200 ng eines gereinigten PCR-Produkts, zugegeben und über Nacht bei 42° C hybridisiert. Die Markierung der Sonde mit Peroxidase nach Denaturierung des PCR-Produktes (10 Min in kochendem H₂O) erfolgte nach Herstellerangaben (ECL-Kit, Amersham Pharmacia Biotech).

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x für 15 Min mit Waschlösung 1 (6 M Harnstoff, 0,4 % SDS, 0,5 x SSC, vorgewärmt auf 42° C) bei 42° C und 2 x für 5 Min bei RT in Waschlösung 2 (2 x SSC) gewaschen. Die Detektion der hybridisierten DNA-Fragmente erfolgte nach Inkubation für 1 Min in Detektionslösung (enthalten im ECL-Kit) und Auflegen eines Filmes für zunächst 10 Min. Je nach Bedarf wurde anschließend nochmal ein Film für kürzere oder längere Zeit aufgelegt. Zur erneuten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde wurde auf die Membran eine kochende 0,5 %ige SDS-Lösung gekippt und auf einem Schüttler bis zur Abkühlung auf RT inkubiert, nach kurzem waschen in 2 x SSC konnte die Prozedur, beginnend mit der Vorhybridisierung, erneut erfolgen.

5.5. Restriktionsverdau und Ligation

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen, das Auffüllen überstehender Enden mit dem Klenow-Enzym, die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel und die Ligierung der DNA-Fragmente erfolgte nach Standardvorschriften (136, 188). Die Reinigung der DNA-Fragmente sowohl aus Lösungen als auch aus Agarosegelen erfolgte mit QIAquick (Qiagen). Als DNA-Größenmarker wurde eine 1 kb Leiter (Gibco) verwendet.

5.6. Transformation

Für die Transformation von Ligationsansätzen in *E. coli* K12-Stämme wurde die Elektrottransformation nach Calvin & Hanawalt (30) durchgeführt. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Transformationseffizienz von 10^9 Transformanten/ μg intakter Plasmid-DNA aus.

Eine vereinfachte Elektroporations-Methode wurde zur Transformation von Plasmiden in *V. cholerae* angewandt (persönliche Mitteilung K. Klose). Dazu wurde ein am Vorabend gereinigter Stamm auf eine LB-Platte ausgestrichen und 4-5 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden von der Platte mit einem Zahnstocher abgekratzt und in $500\ \mu\text{l}$ $2\ \text{mM}$ CaCl_2 (auf 4° vorgekühlt) aufgenommen. Nach Zentrifugation für 3 Min bei 7500 rpm wurde das Pellet in $180\ \mu\text{l}$ kaltem $2\ \text{mM}$ CaCl_2 resuspendiert. Zu $60\ \mu\text{l}$ wurde $2 - 6\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA pipettiert und in eine Elektroporationsküvette (2 mm, EQUIBIO) überführt (alle Schritte erfolgten auf Eis). Im Elektroporationsgerät wurde eine Spannung von 1,8 kV zur eigentlichen Transformation angelegt. Die Zellen wurden dann in 1 ml LB überführt und für 30 Min im Schüttler inkubiert. $200\ \mu\text{l}$ und $800\ \mu\text{l}$ der Kultur wurden jeweils auf eine Selektionsplatte (LB mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

5.7. PCR

Der PCR-Ansatz (155) wurde für Standardanwendungen entweder mit der Thermoprime DNA-Polymerase (Advanced Biotechnologies) oder mit dem Supermix (Gibco) nach Herstellerangaben angesetzt. Für PCR-Produkte, die für Klonierungen eingesetzt wurden oder größer als 4 kb waren, wurde die Elongase (Gibco) mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verwendet. Die Denaturierungs-Temperatur für die DNA betrug 95°C , die Polymerisations-Temperatur 68°C . Die Hybridisierungs-Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer/DNA-Komplexe, wobei für jedes hybridisierende AT-Paar 2°C und für jedes hybridisierende GC-Paar 4°C angenommen wurde (bei unterschiedlichen Schmelz-Temperaturen der Primer wurde die niedrigere Temperatur als Hybridisierungs-Temperatur). Die Cycluszahl betrug 30 Cyclen, die Polymerisationsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stückes, wobei pro 1000 Nukleotide eine Min gerechnet wurde.

5.8. DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen erfolgte nach der Methode des Dideoxy-Kettenabbruchs nach Sanger et al. (183). Als Template für die dsDNA-Sequenzierung diente ein über Quiaquick gereinigtes PCR-Produkt ($100\ \text{ng}$ pro kb). Der Reaktionsansatz für die Cycle-Sequenzierung wurde mit dem „Thermo-Sequenase fluorescent labelled 7deAza-dGTP-Kit“ nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) angesetzt, der auch $1\ \text{pmol}$ fluoreszenzmarkierten Primer (IRD800, MWG Biotech) enthielt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte in einem Thermocycler (Denaturierung bei 95° für 30 sec; Hybridisierung für 30 sec,

Temperatur ist Primerabhängig; Polymerisation für 30 sec. bei 70° C; 30 Zyklen). Die Auftrennung der DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und die Analyse der Daten erfolgte mit dem automatischen DNA Sequenziergerät LiCor 4000 (MWG Biotech).

5.9. Plasmidkonstruktionen

5.9.1. Expressionsplasmide

Plasmide zur Komplementation von inaktivierten Genen in trans wurden alle auf dieselbe Art kloniert. Der kodierende Bereich der entsprechenden Gene wurde einschließlich der RBS (Ribosomenbindestelle) und Stopkodon mittels PCR amplifiziert und zusätzlich über die gewählten Primer Restriktionsschnittstellen eingeführt. Die PCR-Produkte wurden in den mit *Pst*I und *Fsp*I geschnittenen Vektor pACYC177 ligiert. Die entsprechenden Gene wurden dadurch in die Leserasterichtung des *bla*-Gens vom Vektor eingesetzt, so daß sie vom *bla*-Promotor aus transkribiert werden können (Abb. 6). Das Enzym *Pst*I generiert überhängende Enden, während *Fsp*I blunt schneidet. Dies erlaubte, daß für den Verdau der PCR-Produkte im 3' Bereich des Genes auch alternative Enzyme, die blunt schneiden, verwendet werden konnten.

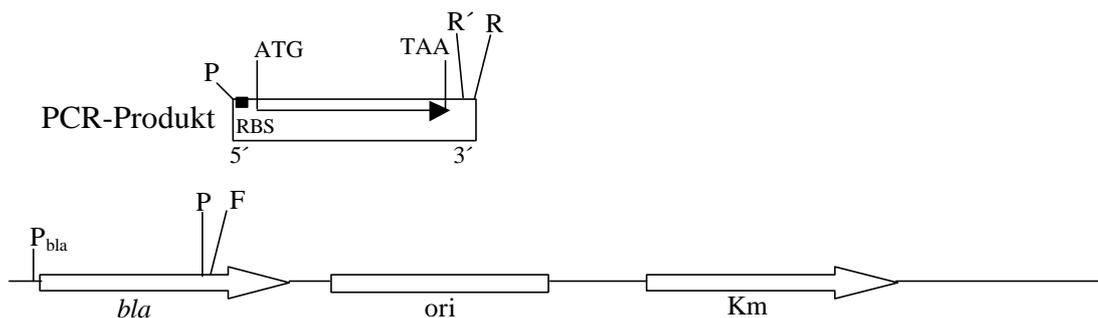


Abb. 6: **Konstruktion von Komplementationsplasmiden.** Der 3,9 kb große Vektor pACYC177 ist linearisiert abgebildet. Die relevanten Merkmale, wie die Restriktionsschnittstellen *Pst*I (P) und *Fsp*I (F), der Ori, der *bla*-Promotor (P_{bla}) sowie die Gene, die für die Resistenzmarker kodieren, sind eingezeichnet. Darüber ist schematisch ein PCR-Produkt, das in den Vektor kloniert wurde, dargestellt. Das PCR-Produkt enthielt die RBS und die kodierende Sequenz des entsprechenden Genes. Am 5' Ende wurde durch die Primer eine *Pst*I-Schnittstelle (P) und am 3' Ende eine Restriktionsschnittstelle (R) für ein blunt schneidendes Enzym eingeführt bzw. eventuell in der Sequenz vorhandene ausgenutzt (R').

Im Falle von *galE*, *galU* und *waaF* wurde im 5' Bereich durch die Primer eine *Pst*I-Schnittstelle und im 3' Bereich eine *Fsp*I-Schnittstelle eingeführt (Tab. 4). Für die Amplifikation von *wbeO* wurde im 5' Bereich eine *Pst*I Schnittstelle und im 3' Bereich eine *Stu*I Schnittstelle an die Oligonukleotide angehängt (Tab. 4). Die Amplifikation von *wbeW* erfolgte mit dem Primer *wbeWPst*I (Tab. 4), der im 5' Bereich die *Pst*I Schnittstelle einführt, und dem Primer O6 (Abb. 11, Tab. 4). Das PCR-Produkt wurde mit *Pst*I und *Xmn*I verdaut, da innerhalb der amplifizierten Sequenz im 3' Bereich nach dem Stopkodon eine *Xmn*I-Schnittstelle lag. Nach der Ligation wurden die Ansätze in den *E.coli* Stamm LE392 transformiert und auf Km^r selektioniert. Da der

Vektor durch die Insertion Ap^s wird, ist ein einfaches Testen von positiven Klonen möglich. Die auf diese Weise erhaltenen Plasmide pJN*wbeW*, pACYC*wbeO*, pACYC*waaF*, pACYC*galU* und pACYC*galE* konnten dann aus den *E.coli* Stämmen präpariert und in die entsprechenden *V. cholerae*-Stämme transformiert werden.

Das über PCR amplifizierte *manB*-Gen wurde aufgrund interner *PstI*-Schnittstellen im 5' Bereich mit einer *BamHI* und im 3' Bereich mit einer *SalI*-Schnittstelle versehen und in den mit *BamHI* und *SalI* verdauten Vektor pACYC184 kloniert. Die Expression von *manB* erfolgt vom tet-Promotor aus. Das resultierende Plasmid pJN*manB* ist Tc^s und Cm^r .

5.9.2. Plasmide zur Konstruktion von chromosomalen Insertionsmutanten

Interne Fragmente der Gene *waaF* (bp 132 – 481 der kodierenden Region), *wbeN* (bp 606 – 1004) und *wbeO* (bp 131 – 430) wurden mittels PCR amplifiziert und durch die verwendeten Primer gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *SalI* (im 5' Bereich) und *EcoRI* (im 3' Bereich) eingeführt (Tab. 4). Nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen wurden die PCR-Fragmente in den mit *SalI* und *EcoRI* verdauten Vektor pGP704 ligiert (Abb. 7).

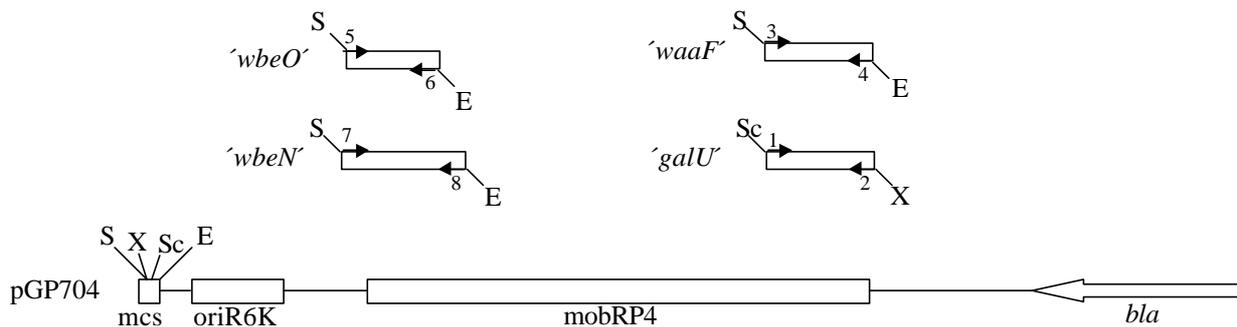


Abb. 7: **Konstruktion von Suizidplasmiden mit internen Genfragmenten.** Die Abbildung zeigt den linearen Ausgangsvektor pGP704 mit der mcs („multiple cloning site“), die unter anderem eine *SalI* (S), *XbaI* (X), *SacI* (Sc) und *EcoRI*-Schnittstelle enthält. Desweiteren wurden die relevanten Merkmale dieses mobilisierbaren Suizidvektors eingezeichnet (vgl. III 4.2.). Darüber sind schematisch die mit PCR amplifizierten internen Genfragmente '*galU*', '*waaF*', '*wbeO*' und '*wbeN*' abgebildet. Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit den Primern, die jeweils die genannte Restriktionsschnittstelle einfügen: 1 galUSacI, 2 galUXbaI; 3 waaFSalI, 4 waaFEcoRI; 5 wbeOSalI, 6 wbeOEcoRI; 7 wbeNSalI, 8 wbeNEcoRI. '*galU*' wurde in den Vektor pCVD442 kloniert, ein pGP704-Derivat das zusätzlich das *sacB*-Gen enthält.

Ein PCR generiertes internes Fragment von *galU* (bp 251 – 789) mit den eingeführten Restriktionsschnittstellen *SacI* und *XbaI* (Tab. 4) wurde in die mcs von pCVD442 kloniert. Die resultierenden Plasmide (pGP*waaF*, pGP*wbeN*, pGP*wbeO* und pCVD*galU*) wurden durch Restriktionsverdau überprüft und verwendet, um die entsprechenden Gene durch Plasmidintegration zu inaktivieren (vgl. III 4.1.).

5.9.3. Plasmide zur Konstruktion von chromosomalen Deletionsmutanten

Für die Klonierung von Plasmiden, die DNA-Bereiche stromauf- und stromabwärts des zu deletierenden Gens enthielten, wurde wiederum eine einheitliche Strategie angewandt. Diese wird im folgenden kurz beschrieben und ist in Abb. 8 grafisch dargestellt. Mit den Primern 5′-Genbezeichnung-SmaI (P1) und 5′-Genbezeichnung-SalI (P2) (Tab. 4) wurde der stromaufwärtsliegende Bereich amplifiziert und durch die Primer eine *SmaI* (Sm) und *SalI* (S) Restriktionsschnittstelle eingeführt. Mit den Primern 3′-Genbezeichnung-SalI (P3) und 3′-Genbezeichnung-ApaI (P4) (Tab. 4) wurde der stromabwärtsliegende Bereich amplifiziert und durch die Primer eine *SalI* (S) und *ApaI* (A) Schnittstelle eingeführt.

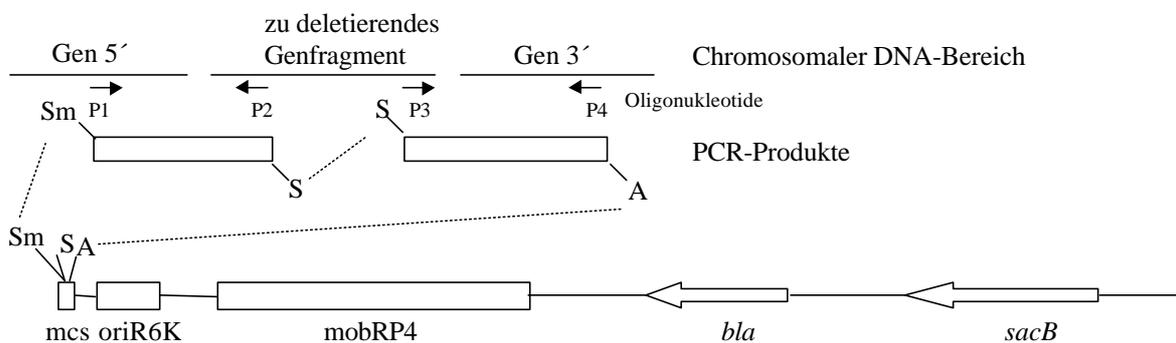


Abb. 8: **Klonierung von Suizidplasmiden, die für die Konstruktion von Deletionsmutanten verwendet wurden.** Die relevanten Merkmale des mobilisierbaren, linear dargestellten Suizidvektors pKEK229 sind eingezeichnet. In der mcs befinden sich u.a. die 3 Restriktionsschnittstellen *SmaI* (Sm), *SalI* (S) und *ApaI* (A), die jeweils nur einmal im Vektor vorkommen. Weitere Erklärungen vgl. Text.

Die PCR-Produkte wurden mit *SalI* für 5 h verdaut, gereinigt mit Qiaquick und über Nacht ligiert. Der Ligationsansatz wurde mit den Enzymen *SmaI* und *ApaI* für 4 h verdaut, gereinigt mit Qiaquick und in den mit *SmaI* und *ApaI* geschnittenen Vektor pKEK229 ligiert. Aliquots des Ligationsansatzes wurden in den Stamm SM10λpir transformiert, der die Replikation des Suizidplasmides erlaubt (vgl. III 4.2.), die Selektion erfolgte auf LBAp-Platten. Auf diese Weise wurden folgende Plasmide erhalten, die zur Konstruktion von chromosomalen Deletionsmutanten verwendet wurden (vgl. auch III 4.1.): pKEKΔ*galE* (deletiert wird bp 73-942 der 1014 bp langen kodierenden Region), pKEKΔ*galK* (Deletion von bp 70 – 1035 der 1158 bp langen kodierenden Region), pKEKΔ*wbeL* (Deletion von bp 57 – 1361 der 1413 bp langen kodierenden Region) und pKEKΔ*wbeW* (deletiert wird bp 116 – 430 von 552 bp der kodierenden Region).

In das Plasmid pKEKΔ*galE* wurde anschließend noch eine CAT-Cassette kloniert, um auf Cm^r selektionieren zu können (vgl. III 4.1.). Dazu wurde ein PCR-Produkt, generiert mit den Primern cm1 und cm2 (Tab. 4), mit *SalI* verdaut und in das mit *SalI* geöffnete Plasmid kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pKEKΔ*galE*::cm genannt und hatte *cat* entgegengesetzt zur Leserasterrichtung von *galE* inseriert.

6. Biochemische Methoden

6.1. Präparation von LPS

Für die Gewinnung von LPS zur Analyse auf SDS-Gelen wurde die Methode zur Präparation von chromosomaler DNA angewandt (vgl. 6.2.). Nach Proteinase K-Verdau und Phenolextraktion befand sich auch LPS in der wässrigen Phase. In der Regel waren 20 µl dieser wässrigen Phase ausreichend, um das LPS nach Auftrennung in SDS-Gelen mit Silber nachzuweisen, bei R-LPS-Mutanten mußte man dagegen 40 µl auftragen.

Gereinigtes LPS wurde nach einer von Slauch et al. modifizierten „heißes Phenol/Wasser“-Methode gewonnen (192). Dazu wurde eine 100 ml LB ÜNK abzentrifugiert, 1 x in 30 ml H₂O gewaschen, das Pellet anschließend in 15 ml Puffer A (150 mM NaCl, 20 mM MOPS pH 6,9) resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml, Nalgene) überführt. Anschließend wurden 15 ml Phenol gesättigt mit 20 mM MOPS¹⁾ zugegeben, vorsichtig gemixt durch invertieren und für 30 Min bei 65° C inkubiert. Nach 10 Min Inkubation auf Eis wurde für 20 Min bei 10 000 rpm (RT) zentrifugiert, danach wurde die obere wässrige Phase in ein Zentrifugenbecher (250 ml, Nalgene) überführt und 100 % reines eiskaltes Ethanol (4-faches Volumen) zugegeben. Die Präzipitation des LPS erfolgte bei -20° C über Nacht. Nach 30 Min Zentrifugation bei 11 000 rpm (4° C) wurde das Pellet mit 25 ml 95 % Ethanol gewaschen und anschließend in 5 ml Puffer A aufgenommen. Die DNA und RNA wurde durch Zugabe von 2,5 µg DNaseI (Boehringer) und 2,5 µg RNaseA (Boehringer) und anschließender Inkubation für 30 Min bei 37° C abgedaut. Der Ansatz wurde dann in ein 11,5 ml UZ-Zentrifugenröhrchen (Sorvall Ultracrimp11) überführt, das Röhrchen mit Puffer A aufgefüllt und in der Ultrazentrifuge bei 39 000 rpm für 3 h (4° C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert (~ 2 h auf einem Schüttler). Das gereinigte LPS wurde bei 4° C gelagert und die Menge auf einem Silbergel abgeschätzt, wobei definierte Mengen an O1 LPS (bezogen bei Sigma) zum Vergleich aufgetragen wurden. Es ist noch anzumerken, daß diese Methode zur Präparation von R-LPS (vor allem bei Mutationen, die tief im Kernbereich erfolgt waren, z.B. P27459res118) nicht geeignet war, da nur geringste Mengen erhalten wurden.

1) Herstellung von Phenol, gesättigt mit 20 mM MOPS: Festes Phenol (Applichem) wurde bei 65° C im Wasserbad geschmolzen. Unter dem Abzug wurde eine 20 mM MOPS Lösung pH 6,9 zugegeben und gut gemischt. Nach Aufbewahrung für einen Tag bei 4° C im Kühlschrank waren 2 Phasen zu erkennen. Die obere wässrige Phase wurde verworfen und nochmal neue MOPS-Lösung dazugegeben (insgesamt 3 x wiederholt).

6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen und LPS erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, (124)). Die Herstellung des Laufpuffers und der Lösungen für das Gießen der Gele erfolgte wie im Laborhandbuch (136) beschrieben. Es wurde dafür eine gebrauchsfertige 30 % Acrylamid-/ 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung (Roth) verwendet. Die Polyacrylamid-Endkonzentration im Gel zur Auftrennung von Proteinen variierte je nach

Fragestellung und betrug 15% für die Auftrennung von LPS. Es wurden die Proteingelapparaturen von BioRad verwendet, für die Analysen von Protein überwiegend Minigelkammern und für die Analyse von LPS ausschließlich große Gelkammern (Maße der Glasplatten: 22,5 cm Höhe x 20 cm Breite). Der verwendete 5 x SDS-Gel-Probenpuffer (für Proteine und LPS) wurde wie folgt hergestellt: 1,1 g SDS; 0,41g EDTA; 0,17g NaH₂PO₄x2H₂O; 1,1 ml β-Mercaptoethanol auffüllen mit H₂O auf 10ml (pH 7,2) + 10 ml 50% Glycerin mit 20 mg Bromphenolblau. Als Größenmarker wurde die 10 kDa-Leiter von Gibco und für Westernblot-Analysen die vorgefärbten Kaleidoscope Standards von BioRad verwendet.

6.3. Westernblot

Das Westernblot-Verfahren wurde zum immunologischen Nachweis von Proteinen bzw. LPS eingesetzt. Die Proteine bzw. das LPS wurden nach der Auftrennung durch SDS-PAGE vom Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (209). Der Transfer von Proteinen in Minigelen erfolgte mit einem „Semi-dry“ Blotgerät für 30 Min bei 15-20V. Da sich LPS wesentlich schlechter transferieren lässt, wurde ein adaptiertes Protokoll verwendet (pers. Mitteilung W. Brabetz). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 Min in 4° C kaltes H₂O gelegt, der Transfer erfolgte anschließend in einem Tankblotgerät bei einer Spannung von 30 V (Begrenzung auf 250 mA) für 16 h auf einem Magnetrührer und unter ständiger Wasserkühlung (4° C). Für beide Anwendungen wurde derselbe Transferpuffer (25mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol; pH 8,3) verwendet.

Nach dem Blotten wurden die noch freien Bereiche der Membran abgesättigt in TBS (20mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl)/3 % Magermilchpulver (Bio-Rad). Die Membran, auf die LPS geblottet worden war, mußte zuvor aber noch fixiert werden. Dies erfolgte durch Trocknen der Nitrocellulosemembran für 3 h bei 37° C zwischen Whatmanpapier, anschließender Inkubation für 5 Min in 10 % Essigsäure/10 % Isopropanol und 4 x waschen in H₂O für 5 Min. Als primäre Antikörper wurden polyklonale Antiseren (gegen O1-Antigen des LPS, 1:1000 verdünnt, Difco; gegen BlaM, 1:1000; 5Prime→3Prime) und als sekundärer Antikörper ein Anti-Kaninchen IgG (gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) verwendet. Die Inkubation der Membran in Gegenwart von Antikörpern erfolgte in TBS/3 % Milchpulver, das Waschen mit TBS (4-5 mal für 5 Min). Der Nachweis der Protein-Antikörperkomplexe erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ECL-Reagenz (Amersham), eine Substanz, die nach enzymatischer Spaltung durch die Meerrettichperoxidase luminisziert. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Autoradiographiefilm zwischen 2 Min und 1 h exponiert.

6.4. Silberfärbung von LPS in PAA-Gelen

Der Nachweis von LPS in PAA-Gelen erfolgte nach einer leicht abgewandelten Silberfärbungsmethode (persönliche Mitteilung W. Brabetz), die ursprünglich von Tsai und Frasch entwickelt worden war (212). Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel über Nacht in

100 ml Fixierlösung (25 % Isopropanol, 7 % Essigsäure) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das LPS oxidiert in 100 ml Fixierlösung mit 0,87 g Na-Perjodat (Sigma). Nach 3 x waschen mit H₂O für 30 Min wurde das Gel für 10 Min inkubiert in einer frisch angesetzten Färbelösung (70 ml H₂O + 1,4 ml NaOH + 1 ml NH₃ + 1,25 ml 20 % AgNO₃; dabei ist es wichtig, die angegebene Reihenfolge der Substanzen beim Zusammenmischen einzuhalten). Anschließend wurde 3 x für 10 Min mit H₂O gewaschen und dann entwickelt in 100 ml Entwickler (2,5 % Na₂CO₃ + 30 µl 37 % Formaldehyd, frisch angesetzt und auf 60° C vorgewärmt). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 ml 50 mM EDTA (pH 8) gestoppt und nach 10 Min das Gel in H₂O gelegt und darin bis zum Trocknen im Geltrockner aufbewahrt.

6.5. Färbung von Proteinen in PAA-Gelen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Gel mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Dazu wurde das Gel für 1 h in der Färbelösung (0,2 % Coomassie-Brilliant-Blue R 250 [Serva], 40 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert und anschließend der Hintergrund mit Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) 2 x für 30 Min entfärbt.

6.6. ELISA

Für den Nachweis und die Quantifizierung von CT wurde der G_{M1}-ELISA (72) angewandt. Dazu wurden zunächst Ganglioside Typ III (Sigma G2375) an Microtiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxi Sorp, Nunc) gekoppelt. Dies erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 1 (10 µg/ml G_{M1} in 60 mM NaCarbonat-Puffer, pH 10) in jede Vertiefung und anschließender Inkubation für 4 h bei 37° C, nach 3 x waschen mit PBS wurden mit Lösung 2 (PBS, 4 mg/ml BSA [Fraktion V von Sigma]) die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Nach 3 x waschen mit PBS wurden die Platten getrocknet und entweder gleich verwendet oder bei 4° C gelagert (bis zu 6 Monaten).

Für die quantitative CT-Konzentrations-Messung wurden die Zellen unter CT induzierenden Bedingungen (III 3.) angezogen, von einem Aliquot die OD₆₀₀ bestimmt, die Kulturen abzentrifugiert und 300 µl Überstand in die erste Vertiefung der G_{M1} gekoppelten Platten pipettiert. Um die Menge an CT bestimmen zu können wurde in eine Vertiefung 300 µl gereinigtes CT (1 µg/ml, verdünnt in PBS; Bezogen bei Sigma) gefüllt. Die CT-haltigen Lösungen wurden seriell 1:3 verdünnt (100 µl in 200 µl Lösung 2). Nach Inkubation für 20 Min bei 37° C und 3 x waschen mit PBS wurden pro Vertiefung 200 µl Anti-Cholera-toxin-Serum (Sigma, 1:1000 in Lösung 2) zugegeben und für 20 Min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit PBS gewaschen, dann 200 µl sekundäre Antikörper-Lösung (Anti-Kaninchen gekoppelt mit Meerrettichperoxidase [DAKO], 1:2000 in Lösung 2) zugegeben und dann für 20 Min bei 37° C inkubiert. Der Nachweis der CT/Antikörperkomplexe erfolgte nach 3 x waschen mit PBS mit dem ImmunoPure® TMB Substrate Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers. Die Farbreaktion wurde nach Auftreten einer Blaufärbung mit 100 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die

Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm im ELISA-Reader. Die Konzentration an CT im Überstand wurde in $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1} / \text{OD}_{600}$ angegeben.

6.7. Präparation von Außenmembranproteinen

Für die Anreicherung von Außenmembranproteinen wurde die Sensitivität von *V. cholerae* gegenüber Harnstoff ausgenutzt (132). Dazu wurde zunächst die OD_{600} der ÜK bestimmt und die Kulturen auf OD_{600} 1 eingestellt. Zwei ml davon wurden abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml 4 M Harnstoff resuspendiert und für 10 Min bei RT inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 6000 rpm für 3 Min, wurde der Überstand in ein 11,5 ml UZ-Röhrchen (Ultracrimp 11) überführt, das Röhrchen mit 4 M Harnstoff aufgefüllt und bei 39 000 rpm für 1 h bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl 10 mM HEPES mit 10 μg DNaseI (Boehringer, Mannheim) und 10 μg RNaseA (Boehringer, Mannheim) resuspendiert. Durch Inkubation des Ansatzes für 30 Min bei RT konnten die Nucleinsäuren anschließend abgebaut werden. Der Ansatz wurde wiederum in ein UZ-Röhrchen überführt, mit 4 M Harnstoff aufgefüllt und für 1 h bei 4° C und 39 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μl 1x SDS-Gel-Probenpuffer resuspendiert. Für die Analyse der Außenmembranproteine wurden 20 μl auf ein PAA-Gel aufgetragen.

6.8. Analyse von Proteinen im Kulturüberstand: TCA-Fällung

Eine ÜK wurde 1:100 in 5 ml LB verdünnt, bei 37° C im Schüttler inkubiert und die Zellen in der spät-logarithmischen Phase (OD 1,5 bis 2,5) geerntet. Die Zellen wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und 2 ml davon abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μl 1 x SDS-Gel-Probenpuffer aufgenommen, um auch die zelluläre Proteine analysieren zu können. Der Überstand wurde sterilfiltriert, um alle Zellen zu entfernen. Die Fällung der Proteine erfolgte für 1 h auf Eis nach Zugabe von 110 μl 100 % TCA* zu 1 ml Überstand. Die Proteinpräzipitate wurden durch Zentrifugation für 15 Min bei 13 000 rpm und 4° C pelletiert. Das Pellet wurde 2 x mit 400 μl 90 % Aceton gewaschen, wobei das Aceton nur zugegeben und sofort wieder abgekippt wurde. Nach dem Trocknen des Pellets wurden die Proteine in 100 μl 1 x SDS-Gel Probenpuffer resuspendiert. Zur Analyse wurden jeweils 10 μl Gesamtzellextrakt und 10 μl gefällte Proteine aus dem Überstand auf ein 15 %iges PAA-Gel aufgetragen.

*100% TCA: 50 g Trichloressigsäure Festsubstanz wurde in 22,7 ml H_2O aufgelöst und bei 4° C dunkel aufbewahrt (~ ein Monat stabil).

6.9. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die spezifische β -Galaktosidaseaktivität von Zellsuspensionen und Kulturüberständen wurde wie beschrieben (144, 145), mit leichten Modifikationen durchgeführt. Eine ÜK wurde 1:50 in 5 ml M9-Maltose verdünnt und bei 37° C im Schüttler bis zur spät-logarithmischen Phase (OD_{578} 1

bis 2) inkubiert und die OD₅₇₈ bestimmt. 2,5 ml Kultur wurden abzentrifugiert und 2 ml Überstand für die Messung eingesetzt. Parallel dazu wurde ein Aliquot der Kultur in Z-Puffer (10,7 g Na₂HPO₄*H₂O; 5,5 g NaH₂PO₄*H₂O; 0,75 g KCl; 0,246 g MgSO₄*7H₂O) auf eine OD₅₇₈ von 0,5 verdünnt. 2 ml dieser Zellsuspension wurden mit je 30 µl 0,1 % SDS und Chloroform permeabilisiert und nach 10 Min Inkubation die Reaktion durch Zugabe von 400 µl ONPG (2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) gestartet. Die Reaktion der Ansätze mit dem Kulturüberstand wurde direkt durch Zugabe von 400 µl ONPG gestartet. Nach Eintreten der Gelbfärbung oder bei keiner sichtbaren Verfärbung nach 30 Min wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml NaCarbonat abgestoppt. Die Reaktionsansätze wurden abzentrifugiert und anschließend die Absorption bei 405 nm vermessen. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{spez. } \beta\text{-Gal-Aktivität (}\mu\text{mol Produkt/min} \times \text{mg Protein)} = \frac{\Delta E_{405} \times V_t}{OD_{578} \times c_p \times V_B \times t \times e \times d}$$

ΔE_{405} = Extinktion von o-Nitrophenol bei 405 nm

OD₅₇₈ = eingesetzte Bakterienmenge

c_p = Proteinkonzentration (107 µg Protein/ml OD₅₇₈)

V_t = Endvolumen des Ansatzes (3,4 ml)

V_B = Volumen an eingesetzter Zellsuspension

e = Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol (4860 M⁻¹*cm⁻¹)

d = Durchmesser der Küvette (1 cm)

t = Reaktionszeit in min

7. Phänotypische Tests

7.1. Motilität

Die Beweglichkeit der *V. cholerae* Bakterien wurde im Motilitätsagar überprüft. Dazu wurde eine Einzelkolonie in den Agar eingestochen und die Platten ÜN bei 37° C inkubiert. Motile Bakterien schwärmen, während nicht-motile Bakterien eine Kolonie am Einstichort bilden. In Gegenwart von 0,4 % Gallensalze (Sodium choleate, 50 % Stammlösung in H₂O, autoklaviert, Sigma S9875) schwärmen die Bakterien stärker (teilweise wird die ganze Platte von motilen Bakterien bedeckt) und die Zuordnung motil - nichtmotil ist einfacher (82).

7.2. HA-Proteaseaktivität

Die Aktivität der HAP wurde qualitativ auf LB-Agarplatten mit 1 % Milchpulver überprüft. HAP positive Stämme zeigten einen klaren Hof um die gebildeten Kolonien (163).

7.3. Serumresistenztest

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

Für die Versuche zur Selektion auf O-Antigen positive Revertanten wurden 250 µl Zellen des Stammes P27459res30 (gewaschen und resuspendiert in PBS) mit 250 µl menschlichen Serum (von einer Person gewonnen) gemischt und für 1 h bei 37° C inkubiert. Der Ansatz wurde dann abzentrifugiert, gewaschen mit PBS, in 100 µl aufgenommen und alles auf eine LB-Platte ausplattiert.

7.4. Überleben in Gegenwart von kurzkettigen organischen Säuren

Der Überlebensassay wurde durchgeführt wie bei Merrell und Camilli (142) beschrieben. Eine ÜK wurde 1:150 in 30 ml LB pH 7 überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Min bei 6000 rpm (RT) abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml LB pH 7 resuspendiert. 100 µl davon wurden in ein Reagenzglas mit 900 µl LB pH 7 überführt (= nicht adaptierte Zellen). Die restlichen 900 µl wurden abzentrifugiert (6000 rpm, 5 Min, RT), das Pellet in 1 ml LB pH 5,7 resuspendiert und ebenfalls in ein Reagenzglas überführt (= adaptierte Zellen). Beide Ansätze wurden für 1 h bei 37° C im Schüttler inkubiert, danach jeweils 800 µl entnommen, die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 5 Min, RT) und die Pellets jeweils in 800 µl LB 8,7 mM Essigsäure, 2,5 mM Buttersäure, 3,7 mM Propionsäure, pH 4,4 resuspendiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37° C ohne Schütteln inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 200 µl entnommen, abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl PBS/0,1 % Pepton resuspendiert. Nach einer seriellen 1:10-Verdünnung in PBS/0,1 % Pepton wurden jeweils 100 µl von drei geeigneten Verdünnungsstufen auf LB-Platten ausplattiert. Die Bestimmung der Lebenszellzahl zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgte durch serielle Verdünnung der restlichen 200 µl Zellsuspension (nach Adaptation) in PBS/0,1 % Pepton und ausplattieren von jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} auf LB-Platten. Das Überleben in % wurde ausgerechnet, indem die Anzahl der überlebenden Zellen nach Säureschock zu verschiedenen Zeitpunkten durch die Anzahl der lebenden Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ geteilt und das Ergebnis mit 100 multipliziert wurde.

7.5. Biofilmbildung

Die Fähigkeit von *V. cholerae* einen Biofilm an abiotischen Materialien zu bilden wurde unter Zuhilfenahme verschiedener beschriebener Methoden (168, 229, 239, 241) wie folgt untersucht: Qualitativ konnte man die Biofilmbildung abschätzen, indem man eine ÜNK 1:100 in 1 ml LB in Borosilicatglas-Reagenzröhrchen verdünnte und für mindestens 2 Tage bei RT ohne Schütteln inkubierte. Biofilmpositive Zellen „schwimmen“ dicht gepackt an der Oberfläche, während biofilmmegative Zellen als Suspension vorliegen. Adhärente Bakterien konnten nachgewiesen werden, durch Ausgießen der Zellen, 4 x Nachspülen mit H₂O, 10 Min Färbung in einer 0,4 % Kristallviolett-Lösung (in 70 % Ethanol) und kräftigem Waschen mit H₂O. Ein quantitativer Biofilmassay wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Polystyrene, Greiner) durchgeführt. ÜNK wurden wiederum 1:100 in LB verdünnt und pro Stamm jeweils 3 Vertiefungen mit 100 µl befüllt. Die Platten wurden für 24 h bei RT inkubiert, anschließend wurden die Bakterien ausgeschüttet, die Platte 3 x mit H₂O gewaschen und die adhärennten Bakterien durch Zugabe von 200 µl 2,5 % Glutaraldehyd fixiert (5 Min, RT). Nach 2 x Waschen mit H₂O wurden die Bakterien nach Zugabe einer 0,4 % Kristallviolett-Lösung (200 µl pro Vertiefung) für 10 Min bei RT gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte nach Solubilisierung des Kristallvioletts mit 300 µl Ethanol/Aceton (80:20) durch Messung der OD bei 570 nm in einem ELISA Reader.

8. Tierversuche

Die Tierversuche wurden während eines vierwöchigen Aufenthalts im Labor von Dr. Karl Klose in San Antonio, Texas gemacht bzw. wurden später weiterhin von diesem Labor durchgeführt. Verwendet wurden 5-6 Tage alte CD1 Mäuse, die 2 h vor der Inokulation mit *V. cholerae* von dem Muttertier getrennt wurden. Im sogenannten „competition assay“ wurde die Kolonisierungsfähigkeit von *V. cholerae* Mutanten (P27459-Derivate, *lac*⁺) mit dem Wt P27459*lacZ* (*lac*⁻) verglichen (120). Die Stämme wurden ÜN bei 37° C in LB angezogen, gewaschen und in 150 mM NaCl verdünnt. Mutante und Wt wurden gemischt und mit einem blauen Lebensmittelfarbstoff versetzt. 50 µl dieser Bakteriensuspension (enthielten ungefähr 10⁷ CFU Mutanten und 10⁷ CFU Wt) wurden mit Hilfe eines Schlauches in den Magen der mit Äther betäubten Mäusebabys injiziert. Parallel wurden geeignete Verdünnungen dieses Inokulums auf LBXG-Platten ausplattiert, um die exakte Lebendzellzahl von Mutanten und Wt im Inokulum zu bestimmen. Die Mäuse wurden für 24 h ohne Nahrung bei 30° C gehalten, anschließend getötet und der Dünndarm herauspräpariert. Nach Homogenisierung des Darms wurden geeignete Verdünnungen auf LBSmXG-Platten ausplattiert, um die Lebendzellzahl von Mutanten und Wt im Darmhomogenat zu bestimmen. Der „competitive index“ (CI) wurde folgendermassen ermittelt: Verhältnis von Mutanten/Wt im Dünndarmhomogenat geteilt durch das Verhältnis von Mutanten/Wt im Inokulum.

9. Computeranalysen

Seit Anfang 1999 sind die Sequenzrohdaten aus dem *Vibrio cholerae* Genomprojekt öffentlich zugänglich (TIGR) und seit Januar 2000 sind die Daten in zwei Contigs abrufbar, die die zwei Chromosome mit ~ 1 Mbp Basenpaaren und ~ 2,9 Mbp Basenpaaren umfassen. Es war ausschließlich eine Suche auf AS- oder DNA-Sequenz-Ebene möglich. Für die Suche nach *gal*- (Galaktosestoffwechsel) und *waa*- (LPS Kernoligosaccharid Biosynthese Gencluster) Genen wurden aus den Datenbanken über Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) die entsprechenden AS-Sequenzdaten von *E.coli* bzw. weiteren Gram-negative Bakterien heruntergeladen und zur Suche für die *V. cholerae* Genomsequenz verwendet. Wurden homologe Bereiche gefunden, so erhielt man die DNA-Sequenz-Rohdaten, die etwa 4 kb flankierende Sequenzen umfassten. Die Auswertung dieser DNA-Sequenz erfolgte mit Hilfe des Programmes OrfFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), das Anhaltspunkte über mögliche kodierende Bereiche liefert, da die DNA-Sequenz in alle 6 möglichen Leserasterrichtungen translatiert wurde. Das Programm OrfFinder ist direkt mit dem Programm Blast Search gekoppelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), das mit einem Datenbank-Algorithmus (3) nach Homologien zu bekannten Genen sucht. Durch diese Analysen konnten mutmaßliche kodierende Bereiche identifiziert werden. Die Sequenzdaten bildeten dann die Grundlage zur Inaktivierung der Gene für funktionelle Analysen.

Anmerkung: Im August 2000 wurde die DNA-Sequenz zusammen mit den annotierten ORFs veröffentlicht (85) und es ist nun eine komfortable Suche in der *V. cholerae* Datenbank möglich (TIGR). Die Auswertungen bezüglich der ORFs wurden verglichen und stimmten in den meisten Fällen überein. Abweichungen ergaben sich teilweise im Start der kodierenden Region und damit in der Größe des Proteins. Allerdings war keines der funktionell analysierten Gene betroffen. Die neuen Bezeichnungen der ORFs (85) wurden nachträglich übernommen.