

I Zusammenfassung

Vibrio cholerae, der Erreger der Cholera, ist ein Gram-negatives, fakultativ pathogenes Bakterium. Die Serogruppe O1 Biotyp El Tor ist für fast alle Cholera-Ausbrüche der anhaltenden 7. Pandemie verantwortlich. Inzwischen ist die Cholera in weiten Teilen Südostasiens, Afrikas und Südamerikas als endemisch zu betrachten. Die Ausbrüche treten periodisch auf, betreffen gleichzeitig größere Gebiete und sind überwiegend gekoppelt an Armut und schlechte sanitäre Verhältnisse. Zwischen den epidemischen Ausbrüchen persistiert *V. cholerae* in natürlichen aquatischen Habitaten. Die Infektion beginnt mit der oralen Aufnahme des Erregers durch kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser. *V. cholerae* kolonisiert den menschlichen Dünndarm und sekretiert das Cholera-toxin, das die Sekretion von Elektrolyten und Wasser aus den Darmepithelzellen stimuliert, die Folge sind starke wässrige Durchfälle. Die meisten klinischen O1 El Tor Isolate sind mit temperenten Phagen der Kappa Familie lysogenisiert. Ein Phage aus dieser Familie, K139, wurde bereits auf molekularbiologischer Ebene untersucht.

In dieser Arbeit konnte die *V. cholerae* Oberflächenstruktur identifiziert werden, an die der Phage K139 adsorbiert. Phagenbindungs-Studien mit gereinigtem Lipopolysaccharid (LPS) ergaben, daß das O-Antigen der Serogruppe O1 den Phagenrezeptor darstellt. Zusätzlich wurden phagenresistente Mutanten des transluzenten O1 El Tor Inaba Stammes P27459 nach Inkubation mit einem lytischen K139-Derivat isoliert. Analysen des LPS-Laufverhaltens in Polyacrylamid-Gelen (PAA) zeigten, daß viele der Spontanmutanten defekte LPS-Moleküle synthetisierten, die entweder im O-Antigen, im Kernoligosaccharid oder in beidem betroffen waren. Phagenresistente Mutanten mit offensichtlich unverändertem LPS bildeten entweder transluzente oder opake Kolonien. Mit Hilfe von Plaqueinhibitions-Studien konnten Rezeptormutanten (O-Antigen negative Stämme und Stämme mit verändertem O-Antigen) von Mutanten unterschieden werden, die wahrscheinlich in einem späteren Schritt der Phageninfektion beeinträchtigt sind, da sie den Phagen noch binden konnten (Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid aber intaktem O-Antigen und transluzente Mutanten mit intaktem LPS). Opakvarianten synthetisieren wahrscheinlich ein Exopolysaccharid und verhinderten dadurch den effektiven Zugang des Phagen K139 zu seinem Rezeptor, dem O-Antigen.

Weiterhin wurden ausgewählte spontan phagenresistente Stämme genetisch analysiert. O-Antigen Mutanten wurden in Southernblot-Analysen mit spezifischen, gegen das bereits gut charakterisierte O-Antigen-Biosynthese-Gencluster (*rfb*) gerichtete Sonden untersucht. Zwei der O-Antigen negativen Stämme waren durch Insertion des IS-Elementes IS1004 in das *rfb*-Gencluster entstanden, ohne dabei die Transkription der stromabwärts liegenden Gene zu beeinträchtigen. Nach Behandlung einer serumsensitiven Mutante (*wbeW*:IS1004) mit menschlichem Serum konnten einige überlebende Zellen isoliert werden, die durch die präzise Exzision von IS1004 aus *wbeW* wieder Serumresistenz erlangt haben. Diese Revertanten waren auch wieder in der Lage das O-Antigen zu synthetisieren. Diese Daten zeigen, daß eine

reversible Insertion von *IS1004* in das *rfb*-Gencluster erfolgen kann und das dieses Element in *V. cholerae* O1 El Tor aktiv ist. Weitere Analysen deuten an, daß sich *IS1004* bei der Transposition repliziert, daß es am linken Ende nach Erkennung von 5'TT(T/C)AT inseriert und, daß bei der Insertion 2 bp verdoppelt werden.

Spontan phagenresistente Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid ohne O-Antigen (R-LPS-Mutanten) sind wahrscheinlich im Kernoligosaccharid-Biosynthese-Gencluster (*waa*) mutiert. Das *V. cholerae waa*-Gencluster wurde identifiziert, indem die Sequenz von *E. coli* Proteinen, die an der Kernoligosaccharid-Biosynthese beteiligt sind, für die gezielte Suche nach Homologen in der *V. cholerae* Datenbank eingesetzt wurde. *waaF*, das für die Heptosyl-II-Transferase kodiert, wurde durch genetische Manipulation inaktiviert und zeigte im PAA-Gel das gleiche Migrationsverhalten wie zwei spontan phagenresistente Mutanten. In den Spontanmutanten konnte jedoch im Gegensatz zu der konstruierten Mutante durch ein *WaaF*-exprimierendes Plasmid lediglich das Kernoligosaccharid, nicht aber das O-Antigen wiederhergestellt werden. Weitere genetische Analysen ergaben, daß eine der Spontanmutanten 546 bp deletiert hatte, die Teile von *waaF* und *waaL* betrafen, letzteres kodiert dabei vermutlich für die O-Antigen-Ligase.

Spontanmutanten mit intaktem O-Antigen aber verändertem Kernoligosaccharid konnten als *galU*-Mutanten charakterisiert werden, die auch im Galaktosekatabolismus beeinträchtigt waren. Zusätzlich wurden zwei weitere *gal*-Gene, *galE* und *galK*, durch genetische Manipulation inaktiviert. Diese Mutanten konnten ebenfalls keine Galaktose mehr verstoffwechseln, synthetisierten aber ein intaktes LPS. In Gegenwart hoher Galaktosekonzentrationen wurde in *galU*- und *galE*- Mutanten aufgrund der Defekte im Gal-Stoffwechsel Lyse beobachtet. Zusätzlich wurde die Rolle von *galU* und *galE* in der Biofilmbildung untersucht. Da der transluzente Wildtyp (Wt) im Gegensatz zu Opakvarianten keinen Biofilm bilden konnte, wurden *galE* und *galU* auch in einer Opakvariante inaktiviert. *galU*- und *galE*-Mutationen erzeugten in der Opakvariante wieder eine transluzente Koloniemorphologie und einen biofilmnegativen Phänotyp an abiotischen Oberflächen. Diese Daten deuten an, daß die Synthese von UDP-Galaktose ausgehend von UDP-Glukose für die Synthese des Exopolysaccharides (VPS) notwendig ist.

Virulenzstudien in neugeborenen Mäusen ergaben, daß O-Antigen negative Stämme sowie *galU*- sehr viel schlechter und R-LPS-Mutanten nicht mehr im Dünndarm kolonisieren konnten. Da *galE* und *galEK*-Mutanten ebenso gut wie der Wt kolonisierten, konnte ausgeschlossen werden, daß toxische Galaktose-Effekte für den Kolonisationsdefekt der *galU*-Mutante verantwortlich waren. Zusätzlich wurde die Überlebensfähigkeit der LPS-Mutanten in Gegenwart von verschiedenen Substanzen, die nachweislich im menschlichen Dünndarm vorkommen, unter „in vitro“ Bedingungen untersucht. R-LPS und *galU*-Mutanten waren im Vergleich mit dem Wt sensitiver gegenüber schwachen organischen Säuren, Defensinen, dem Komplementsystem und Gallensäuren. O-Antigen negative Stämme waren dagegen weiterhin resistent gegen-

über Gallensäuren und schwachen organischen Säuren aber sensitiv gegen die Komponenten des angeborenen Immunsystems. Bisher wurde für keine der LPS-Mutanten eine größere Beeinträchtigung weiterer Virulenzfaktoren, wie z.B. Motilität, Synthese der Pili TCP oder Cholera-toxin-Produktion festgestellt. Auch die Zusammensetzung der Proteine in der äußeren Membran war offensichtlich nicht beeinträchtigt, allerdings wurde beobachtet, daß aus *galU* Mutanten in geringem Maße und aus R-LPS Mutanten in verstärktem Maße periplasmatische Proteine in den Überstand diffundieren können. Diese Ergebnisse deuten an, daß nicht nur das O-Antigen, wie bereits bekannt, sondern auch eine spezifische Kernoligosaccharid-Struktur für eine effektive Kolonisierung von *V. cholerae* essentiell ist. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich in der Ausbildung einer stabilen äußeren Membran zu suchen, die die Persistenz in Gegenwart bakteriozider Substanzen des Dünndarms ermöglicht.

I Summary

Vibrio cholerae is a Gram-negative, facultative pathogen and is the causative agent of cholera. The Serogroup O1, Biotyp El Tor is responsible for virtually all cholera out-breaks in the ongoing seventh pandemic. Cholera is endemic in Southeast Asia and parts of Africa and Latin America, where seasonal out-breaks occur widely and are particularly associated with poverty and poor sanitation. During interepidemic periods *V. cholerae* resides within natural aquatic environments. Infection starts with ingestion of contaminated food or drinking water. *V. cholerae* colonizes the mucosal surface of the human small intestine and secretes cholera toxin. The toxin stimulates secretion of water and electrolytes by the cells of the small intestine, leading to severe watery diarrhoea. The majority of clinical O1 El Tor isolates are harboring temperate phages of the kappa phage group. So far only one phage of this family, K139, was investigated on a molecular level.

In this study the phage K139 adsorption site on the bacterial cell surface was determined. Phage-binding studies with purified lipopolysaccharide (LPS) showed that the O-antigen of the serogroup O1 serves as the phage receptor. In addition, phage resistant mutants of the O1 El Tor Inaba strain P27459 were screened by using a virulent isolate of phage K139. Analysis of the LPS by PAGE migration patterns revealed that most of the spontaneous mutants synthesize incomplete LPS molecules, either composed of defective O-antigen or core oligosaccharide. Phage resistant isolates with apparently normal LPS form either translucent or opaque colonies. Applying phage-binding studies it was possible to distinguish between receptor mutants (O-antigen negative mutants and mutants with altered O-antigen) and mutations which probably caused abortion of a later step of phage infection, because such mutants still bind the phage (mutants with an altered core oligosaccharide but intact O-antigen and translucent mutants). Opaque strains probably produce an exopolysaccharide, limiting thereby the access of phage K139 to its receptor, the O-antigen.

The genetic nature of spontaneous phage resistant strains was investigated. O-antigen negative strains were investigated by Southern hybridization with probes specific for the well known O1-antigen biosynthesis cluster (*rfb*). Two of the investigated O-antigen negative mutants revealed insertions of element IS1004 into the *rfb*-gene cluster without affecting transcription of downstream genes. Treating one *wbeW*::IS1004 serum sensitive mutant with normal human serum, it was found that several survivors showed precisely excised IS1004 restoring O-antigen biosynthesis and serum resistance. These data show that transposition into the *rfb* gene cluster is a reversible process and strongly suggest that IS1004 is an active element in *V. cholerae* O1 El Tor. Further analysis suggests replication of IS1004 during transposition, insertion of IS1004 with its left end next to 5'TT(T/C)AT and creation of a 2 bp duplication upon insertion.

Spontaneous phage resistant R-LPS mutants were found to synthesize an altered core without attached O-antigen. This type of mutants are most likely affected in the core oligosaccharide biosynthesis gene cluster (*waa*). By searching the *V. cholerae* genomic database, with sequences of known core biosynthetic genes from *E. coli* the *waa*-gencluster was identified and further characterized by homology analysis. *waaF*, encoding heptosyl-II-transferase, was inactivated and the LPS was found to have the same migration behaviour in PAA gels than two spontaneous mutants. However, in contrast to the constructed *waaF* mutant complementation with *waaF* in trans restored only the core oligosaccharide but not the O-antigen synthesis in the spontaneous mutants. Further analysis revealed that one mutant had a deletion of 546 bp affecting *waaF* and *waaL*, the latter is thought to encode the putative O-antigen-ligase.

Spontaneous mutants with intact O-antigen but altered core oligosaccharide were identified as *galU* mutants, which were also affected in the galactose catabolism. Other *gal* genes, *galE* and *galK*, were inactivated and these mutants were also found to be defective in the catabolism of exogenous galactose but synthesized an apparently normal LPS. Additionally, *galU* and *galE* mutants were found to lyse in the presence of high galactose concentrations. Furthermore the role of *galU* and *galE* in biofilm formation was investigated. In contrast to the spontaneous phage resistant opaque colony variant the translucent wt-strain was unable to form a biofilm, therefore the *galE* and *galU* mutations were also introduced into the opaque colony variant. *galU* and *galE* mutants of the opaque strain were translucent and unable to form a biofilm on abiotic surfaces, suggesting that the synthesis of UDP-galactose, via UDP-glucose, is essential for the biosynthesis of the exopolysaccharide.

Virulence studies in infant mice indicated that O-antigen negative mutants, *galU* and R-LPS mutants but not *galE* and *galEK* mutants were defective in colonization of the mouse small intestine, excluding any toxic galactose effects in the gut. By investigating the sensitivity to several substances known to be present in the intestine „in vitro“, it was shown that *galU* and R-LPS mutants were more sensitive to weak organic acids, cationic antimicrobial peptides, the complement system and bile salts. O-antigen negative strains were found to be sensitive against gut-associated bacteriocidal substances, but they displayed significant resistance to bile salts and organic acids. No gross change in other virulence determinants such as motility, synthesis of pili TCP, cholera toxin production or outer-membrane proteins has yet been found for any of the LPS mutants. However, some periplasmic leakage for *galU* and significant leakage for R-LPS mutants was observed. These results suggest that not only the O-antigen, as already known, but also a specific core oligosaccharide architecture seems to be required for *V. cholerae* colonization, most probably in providing resistance against bacteriocidal substances.

