

IV Ergebnisse

1. Identifizierung des O1-Antigens als Rezeptor des Phagen K139

Der Phage K139 wurde aus dem *V. cholerae* O139 Stamm MO10 isoliert und konnte in verschiedenen klinischen O139 Isolaten nachgewiesen werden. Allerdings ist es bisher nur gelungen Stämme der Serogruppe O1 mit diesem Phagen zu infizieren (158, 173). Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Möglichkeit, daß das O1-Antigen des LPS als Phagenrezeptor erkannt wird. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von Plaueinhibitions-Studien überprüft. Gereinigtes LPS der Serogruppe O1 (aus Stamm 569B, Inaba, bezogen bei Sigma) wurde in verschiedenen Konzentrationen mit einem auf 10^4 pfu eingestellten Phagenlysat des lytischen Phagen K139.cm9 vorinkubiert und dann wurde quantitativ die Plauebildung im Referenzstamm MAK757 bestimmt. In Abb. 9 A erkennt man, daß die Anzahl der Plaues mit steigender Konzentration an gereinigtem LPS abnimmt.

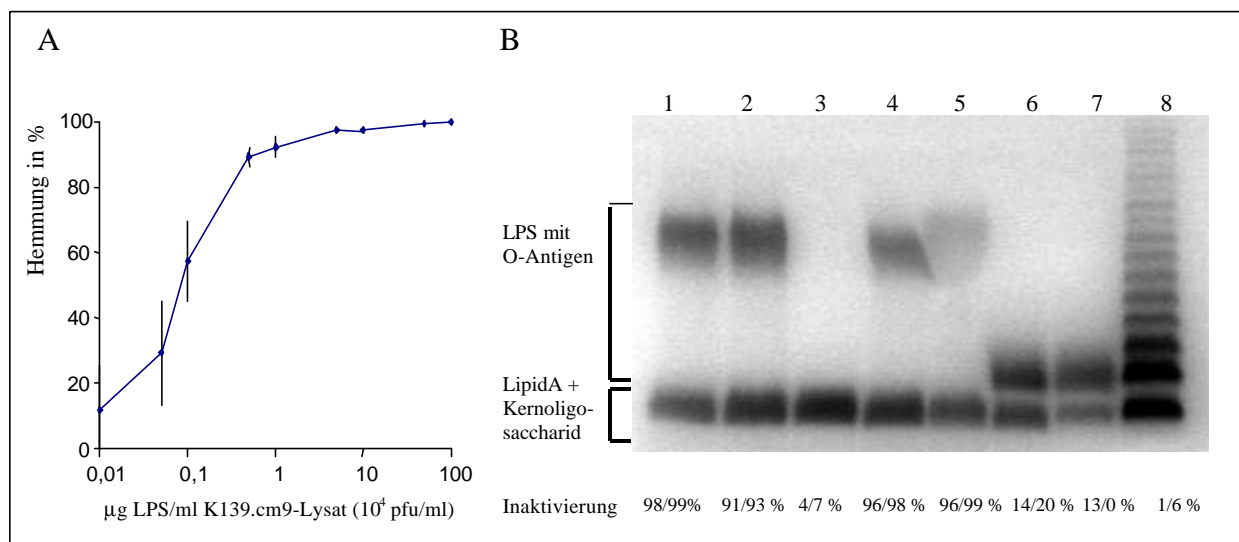


Abb. 9: Nachweis der Bindung des Phagen K139.cm9 an das O1-Antigen mit Plaueinhibitions-Studien.

A. Hemmung der Plauebildung des Phagen K139.cm9 durch steigende Konzentrationen an gereinigtem *V. cholerae* O1 Inaba LPS (Sigma). Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

B. Silbergefärbtes LPS nach Auftrennung in einem 15%igen PAA-Gel durch SDS-PAGE. Das gereinigte LPS stammte aus den O1 klassischen Stämmen 569B (Inaba, Spur 1), O395 (Ogawa, Spur 2) und O395-R1 (O-Antigen negativ, Spur 3); aus den O1 El Tor Stämmen MAK757 (Ogawa, Spur 4) und P27459 (Inaba, Spur 5); aus den O139 Stämmen AI1838 (K139 nicht lysogen, Spur 6) und MO10 (K139 lysogen, Spur 7); sowie aus *Salmonella typhimurium* (Spur 8). Unter der Abb. sind die Ergebnisse aus den Plaueinhibitions-Studien angegeben. Die Angaben beziehen sich auf $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ LPS, Konzentrationen also, die laut Abb. 9A ausreichend für eine gesättigte Phagen/LPS-Interaktion sein sollten. Angegeben ist der Mittelwert aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten.

Um einerseits auszuschließen, daß diese beobachtete Phagen-LPS Interaktion unspezifisch ist, und um andererseits zu überprüfen, ob ausschließlich das O1-Antigen erkannt wird, wurde LPS aus unterschiedlichen *V. cholerae* Stämmen in Plaqueeinhibitions-Versuchen getestet. Das LPS wurde dazu aus verschiedenen *V. cholerae* Serogruppen (O1 und O139), Serotypen (Inaba und Ogawa) und Biotypen (Klassisch und El Tor) gereinigt (Abb. 9 B). Als Kontrollen dienten ein ebenfalls aufgereinigtes LPS aus einem O-Antigen negativen O1 *V. cholerae* Stamm und ein von Sigma bezogenes gereinigtes LPS aus *S. typhimurium* (Abb. 9 B). In Plaqueeinhibitions-Studien konnte ausschließlich LPS mit intaktem O1-Antigen, unabhängig vom Bio- oder Serotyp, die Plaqueeinbildung des lytischen Phagen K139.cm9 im Stamm MAK757 verhindern und damit mit dem Phagen interagieren (Abb. 9 B).

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß der Phage K139 die O-spezifische Seitenkette zur Bindung an *V. cholerae* O1 nutzt und deshalb Stämme der Serogruppe O1, nicht aber der Serogruppe O139 mit diesem Phagen infiziert werden können.

2. Isolierung spontan K139.cm9-resistenter O1 El Tor Stämme

Um weitere Hinweise auf den Phageninfektionsprozeß und die spezifische Rezeptordomäne innerhalb des O1-Antigens zu erhalten, wurden spontan phagenresistente Stämme mit Hilfe des lytischen Phagen K139.cm9 isoliert. Da der Phage K139 an das LPS bindet, konnte gleichzeitig mit diesem Versuchsansatz evaluiert werden, ob verschiedene LPS-Mutanten isoliert werden können, die sich eventuell für Virulenzstudien eignen würden. Deshalb wurde der transluzente klinische O1 El Tor Inaba Stamm P27459 mit dem lytischen Phagen infiziert und im TB Topagar inkubiert (III 4.4.5.). Aus zwei unterschiedlichen Kulturen wurden insgesamt 120 Kolonien isoliert, gereinigt und in Kreuzstrichanalysen auf Resistenz gegen K139.cm9 überprüft.

Die Charakterisierung und Einteilung der Mutanten erfolgte durch Analyse des LPS-Laufverhaltens nach Auftrennung durch SDS-PAGE. Die 120 Stämme ließen sich in 5 verschiedene LPS Typen einteilen (Abb. 10, a-e), die auch teilweise klonalen Ursprungs sein können. In Abb. 10 A ist das LPS aus repräsentativen Stämmen jeder Gruppe in einem silbergefärbten PAA-Gel dargestellt, während in Abb. 10 B der korrespondierende Westernblot gegen O1 LPS abgebildet ist. Die meisten Isolate besaßen kein O-Antigen mehr (Gruppe a). Stämme, die ein verändertes O-Antigen exprimierten, wurden in Gruppe b eingeteilt. Charakteristisch für diese Gruppe ist, daß die O-antigenhaltige LPS-Fraktion im Vergleich zum Wt LPS schneller im PAA-Gel migriert (Abb. 10 A) und nur schwach mit Silber angefärbt ist. Zwei weitere Beobachtungen sprechen dafür, daß es sich um ein verändertes O-Antigen und nicht um einen Präparationsartefakt handelt. Zum einen autoagglutinieren Mutanten mit verändertem O-Antigen im Gegensatz zu O-Antigen negativen Stämmen der Gruppe a nicht (Tab. 7). Zum anderen wird diese Struktur, wenn auch schwach, vom polyklonalen Antiserum noch erkannt (Abb. 10 B). Stämme der Gruppe c wiesen einen Defekt im Kernoligosaccharid des LPS auf, der auch den Verlust des O-Antigens zur Folge hatte (R-LPS Mutanten). Es waren aber auch O-Antigen

positive Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid (Gruppe d) unter den Isolaten. Desweiteren gab es Mutanten, bei denen keine sichtbaren LPS-Defekte zu erkennen waren (Gruppe e). Hier waren aufgrund der Koloniemorphologie zwei verschiedene Typen zu unterscheiden. Transluzente Kolonien mit einer normalen glatten Oberfläche (Abb. 10 C) und opak erscheinende Kolonievarianten, die kompakter waren und zudem dunkler wirkten (Abb. 10 D).

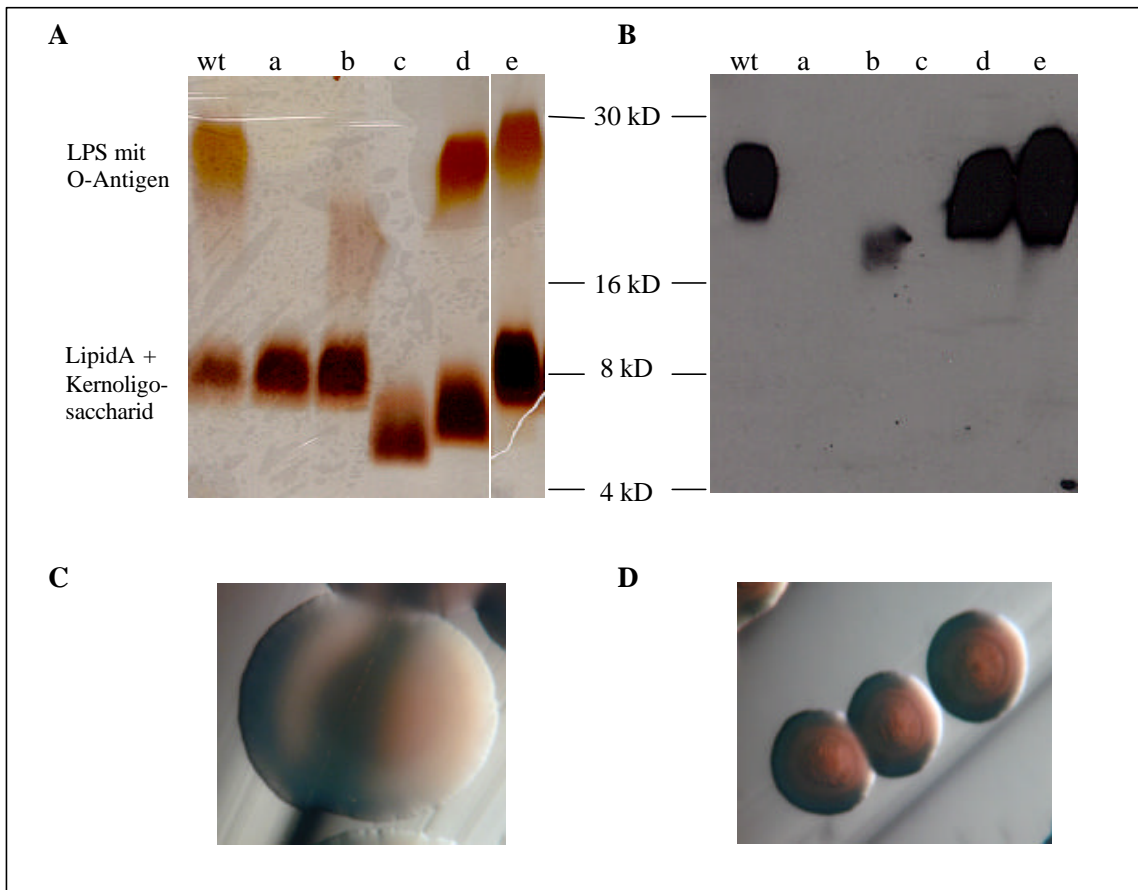


Abb. 10: **Charakteristisches Laufverhalten des LPS von phagenresistenten Stämmen in PAA-Gelen und Koloniemorphologien von Spontanmutanten.**

A. Silbergefärbtes PAA-Gel. Das LPS wurde aus repräsentativen Stämmen (vgl. Tab. 7) der einzelnen phagenresistenten Gruppen präpariert und analysiert.

B. Immunodetektion des O1-Antigens mit polyklonalem Antiserum gegen O1-Stämme (O1 polyvalent von Difco, Tab. 1). Es wurde jeweils gleichviel LPS aufgetragen wie in A.

C. Transluzente Koloniemorphologie der spontan phagenresistenten Mutanten und des Wt. Abgebildet ist eine Kolonie des Wt P27459.

D. Koloniemorphologie von spontan phagenresistenten Opakvarianten. Abgebildet sind 3 Kolonien des Stammes P27459res105.

Da der Phage K139.cm9, der eine *Tn10dcat* Insertion trägt (vermittelt Cm^r), ursprünglich aus einem lysogenen Stamm isoliert worden war (158), wurde als nächstes überprüft, ob es sich bei allen Stämmen um nichtlysogene Zellen handelt. Alle 120 Isolate konnten nicht auf Chloramphenicol wachsen, was andeutete das diese Isolate nicht mit dem Phagen K139.cm9 lysogenisiert sind. Zusätzlich wurden noch alle Stämme durch Southernblot-Analysen auf

Phagen-DNA überprüft. Als Sonde wurde eine mit *Hind*III verdaute DNA des Wt Phagen K139 eingesetzt. In drei der 120 Isolate konnte Phagen-DNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Alle drei Stämme besaßen aber zusätzlich Defekte in der Oberflächenstruktur, darunter war eine Mutante ohne O-Antigen, ein Stamm mit verändertem Kernoligosaccharid und eine Opakvariante. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auch das LPS des Phagendonor-Stammes MAK757K139.cm9 analysiert. Dieser Stamm exprimiert den Phagenrezeptor, das O-Antigen, nicht mehr (Daten nicht gezeigt). Diese Daten deuten an, daß der Phage K139.cm9 überwiegend lytisch ist, in seltenen Fällen aber in das bakterielle Chromosom integrieren kann, und daß lysogene Stämme nur zu isolieren sind, wenn zusätzlich sekundäre Mutationen auftreten, die die Superinfektion mit diesem lytischen Phagen verhindern.

Um zu unterscheiden, ob es sich bei den sechs verschiedenen Typen an phagenresistenten Isolaten um Phagenrezeptor-Mutanten handelt, oder ob ein anderer Schritt in der Phageninfektion unterbrochen ist, wurde gereinigtes LPS aus repräsentativen Stämmen in Plaqueinhibitions-Studien getestet. Wie aus Tab. 7 ersichtlich, konnte K139.cm9 nicht mehr mit dem LPS aus den getesteten Stämmen der Gruppen a und b interagieren. Das bestätigte, daß das O-Antigen als Rezeptor fungiert und deutet an, daß in Typ b-Mutanten der spezifische Phageninteraktionspartner fehlen könnte. LPS, präpariert aus Isolaten der Gruppen d, e (transluzent) und e (opak), war dagegen in der Lage die Plaquebildung zu hemmen. Dies deutet an, daß der Phage mit dem O-Antigen dieser Stämme interagieren kann. Der Phageninfektions-Prozeß muß also in diesen Mutanten an einer anderen Stelle unterbrochen sein.

Stamm	Gruppe/Merkmal	Autoagglutination ¹⁾	Plaqueeinhibition ²⁾
P27459	Wt	nein	96 % / 99 %
P27459res30	a / O-Antigen ⁻	ja	0 % / 0 %
P27459res144	b / verändertes O-Antigen	nein	13 % / 23 %
P27459res118	c / O-Antigen ⁻ , veränderter Kern	ja	n.d. ³⁾
P27459res29	d / O-Antigen ⁺ , veränderter Kern	nein	94 % / 97 %
P27459res108	e / LPS unverändert, transluzent	nein	96 % / 98 %
P27459res105	e / LPS unverändert, opak	nein	99 % / 99,9 %

Tabelle 7: **Einige charakteristische Eigenschaften repräsentativer phagenresistenter Stämme.** 1) Die Stämme wurden als Autoagglutination positiv eingestuft, wenn sich die Zellen einer ÜK spätestens 30 Min nach Herausnahme aus dem Schüttler abgesetzt hatten. 2) Die Plaqueeinhibitionsversuche wurden mit jeweils 10 und 100 µg gereinigtem LPS durchgeführt. Angegeben ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen. 3) LPS aus diesem R-LPS-Stamm ließ sich nicht besonders gut mit der angewandten „Heißes Phenol-Wasser-Methode“ (III 6.1.) präparieren. Da aber dieser Stamm kein O-Antigen mehr exprimiert, kann man davon ausgehen, daß der Phage nicht mehr binden kann.

Diese Untersuchungen zeigten, daß der lytische Phage K139.cm9 als Werkzeug eingesetzt werden kann, um *V. cholerae*-Mutanten mit veränderten Oberflächenstrukturen zu isolieren. Es konnten u.a. Spontanmutanten mit vier verschiedenen definierten LPS-Defekten und Opakvarianten angereichert werden. Dadurch eröffneten sich einige Möglichkeiten für weitere

Analysen. Die transluzenten phagenresistenten Stämme mit intaktem LPS könnten Hinweise auf den weiteren Phageninfektionsprozeß liefern, diese Mutanten wurden allerdings in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert. Die Koloniemorphologie der Opakvarianten könnte eventuell mit der konstitutiven Expression eines Exopolysaccharides gekoppelt sein. Kürzlich wurden *V. cholerae* Rugose-Kolonievarianten beschrieben, die diese Eigenschaft besitzen und dadurch zur Biofilmbildung befähigt waren (239). Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Opakvarianten auf Biofilmbildung untersucht. Die LPS-Mutanten könnten geeignet sein, die Relevanz des LPS in der *V. cholerae*-Pathogenese zu untersuchen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst damit begonnen die einzelnen LPS-Mutanten-Typen in Bezug auf den genetischen Defekt zu charakterisieren. Anschließend wurden diese dann in infektiologisch relevanten Eigenschaften verglichen. Da 60 % der Spontanmutanten O-Antigen negativ waren, wurde zusätzlich die Möglichkeit wahrgenommen zu untersuchen, ob diese Mutationen durch größere DNA-Veränderungen innerhalb des *rfb*-Genclusters entstehen können.

3. Entstehung von O1-Antigen negativen Isolaten durch Insertion eines IS-Elements

3.1. Identifizierung von IS1004-Insertionen im *rfb*-Gencluster

Das *V. cholerae* O-Antigen-Biosynthese-Gencluster (*rfb*-Gencluster) war in letzter Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, vor allem seit beobachtet wurde, daß die für Cholera-Epidemien 1992/93 in Indien und Bangladesh verantwortliche Serogruppe O139 möglicherweise durch Austausch des *rfb*-Genclusters aus O1 El Tor Stämmen entstanden war (19, 38). Es wurde auch diskutiert, daß IS-Elemente in diesen Prozeß involviert sein könnten (19, 51, 199). Um zu untersuchen, ob die isolierten, spontan phagenresistenten, O1 negativen Stämme eventuell durch DNA-Veränderungen größerer Bereiche, wie Deletion oder Insertion entstanden waren, wurde das *rfb*-Gencluster von 45 phagenresistenten P27459-Isolaten der Gruppen a (O-Antigen) und b (verändertes O-Antigen) mittels Southernblot-Analysen untersucht.

Die chromosomale DNA wurde mit den Enzymen *Ava*I und *Sac*I verdaut, und der Blot mit drei verschiedenen PCR-generierten Sonden, die fast die gesamte *rfb*-Genregion abdeckten, hybridisiert (Abb. 11). Das Restriktionsmuster des Stammes P27459res30 unterschied sich vom Wt, wenn zum Hybridisieren die Sonde C verwendet wurde. Um die Ursache dieses Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus zu klären, wurde der betroffene DNA Bereich im Stamm P27459res30 mit den Primern O5 und O6 amplifiziert und das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Bss*HI verdaut. Diese Analysen ergaben, daß im *wbeW*-Gen eine Insertion von ungefähr 600 bp erfolgt sein mußte. Das PCR-Produkt wurde dann mit einem Sequenzierprimer (*wbeW*seq, Tab. 4), der in den kodierenden Bereich von *wbeW* hineinliest, sequenziert. Der Vergleich der Sequenzdaten mit der Datenbank ergab eine Insertion des Insertionselements IS1004 an bp-Position 25 nach dem Startkodon in *wbeW* (Abb. 11).

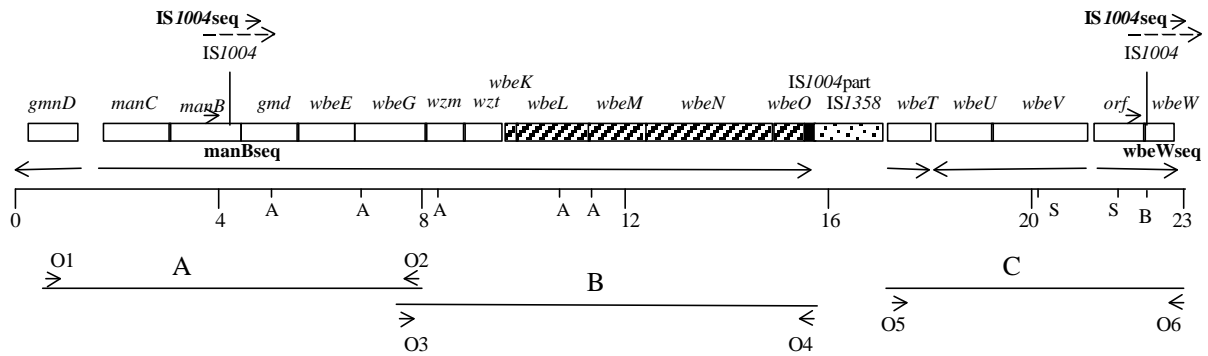


Abb. 11: **Das *V. cholerae* *rfb*-Gencluster.** Die Darstellung des *rfb*-Genclusters erfolgte nach Sequenzinformationen aus der Datenbank (Accession Nr. X59554 und Y07788) und aus Literaturangaben (19, 200). Die Größe der DNA-Bereiche ist in kb angegeben. Die Bereiche A, B und C stellen die Sonden zur Hybridisierung des Blotes dar und wurden mit den Primern O1-O6 wie eingezeichnet amplifiziert. Restriktionsschnittstellen: *Ava*I (A), *Bss*HI (B) und *Sac*I (S). Die Insertionsseiten von *IS1004* in *wbeW* (P27459res30) und *manB* (MAK757res3) sind markiert. Die Sequenzierprimer (seq) zur Sequenzierung der *IS1004*-Insertion sind schematisch durch Pfeile dargestellt und die Namen Fett gedruckt. Das in der Originalsequenz vorhandene partielle *IS1004* ist durch ein ausgefülltes Rechteck und *IS1358* gepunktet dargestellt. Die postulierten Transkriptionseinheiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gene für die Tetronatbiosynthese (*wbeKLMNO*) sind gestreift.

Vier phagenresistente Isolate des avirulenten O1 El Tor Stammes MAK757 wurden auf dieselbe Art und Weise charakterisiert. In dem Isolat MAK757res3 war ebenfalls eine *IS1004*-Insertion im kodierenden Bereich von *manB* (bp 1194) erfolgt (Abb. 11). Um zu untersuchen, ob der Verlust des O-Antigens ausschließlich auf die Inaktivierung von *manB* bzw. *wbeW* durch Insertion von *IS1004* zurückzuführen ist, wurden zwei Plasmide konstruiert, die konstitutiv *manB* bzw. *wbeW* vom *bla*-Promotor aus transkribieren (III 5.9.1). Beide Plasmide konnten nach Transformation die O-Antigen-Synthese durch Komplementation in trans wiederherstellen (Abb. 12). Somit waren die Stämme P27459res30/pJN*wbeW* und MAK757res3/pJN*manB* auch wieder sensitiv gegen den lytischen Phagen K139.cm9.

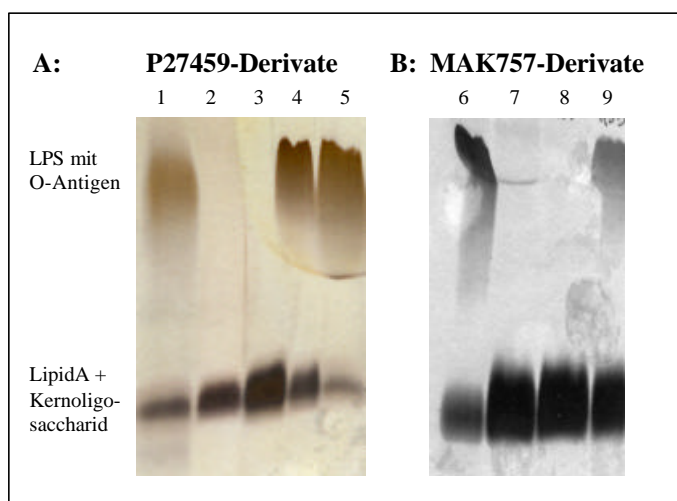


Abb. 12: **LPS nach SDS-PAGE und Silberfärbung.**

- 1: Wt P27459
- 2: P27459res30
- 3: P27459res30/pACYC177
- 4: P27459res30/pACYC*wbeW*
- 5: P27459res30rev1
- 6: MAK757
- 7: MAK757res3;
- 8: MAK757res3/pACYC184
- 9: MAK757res3/pJN*manB*.

Da *manB* vermutlich im Operon mit 12 weiteren Genen transkribiert wird (Abb. 11, (201)) stellte sich als nächstes die Frage, wie die Gene stromabwärts der *IS1004*-Insertion transkribiert werden. Das *IS1004* Element (Accession-Nr. Z67733) wurde auf mögliche Transkriptionsterminatoren und Promotoren untersucht. Im 5' Bereich befinden sich Sequenzen, die Ähnlichkeiten zu einer Terminatorstruktur zeigen, und im 3' Bereich könnte ein Promotor liegen (Abb. 13). Dies deutet darauf hin, daß nach der Insertion von *IS1004* in ein Operon die Transkription der stromaufwärts liegenden Gene terminiert wird, und stromabwärtsliegende Gene möglicherweise von diesem *IS1004* internen Promotor transkribiert werden. Ein Versuch diese Hypothese mit Northernblot-Analysen zu belegen, war nicht erfolgreich.

Durch die Southernblot-Analysen des *rfb*-Genclusters mit einer begrenzten Anzahl von O-Antigen veränderten Stämmen konnte gezeigt werden, daß diese durch Insertion des IS-Elementes *IS1004* entstehen können. Die Transkription von stromabwärts liegenden Genen wird durch die Insertion offensichtlich nicht beeinträchtigt.

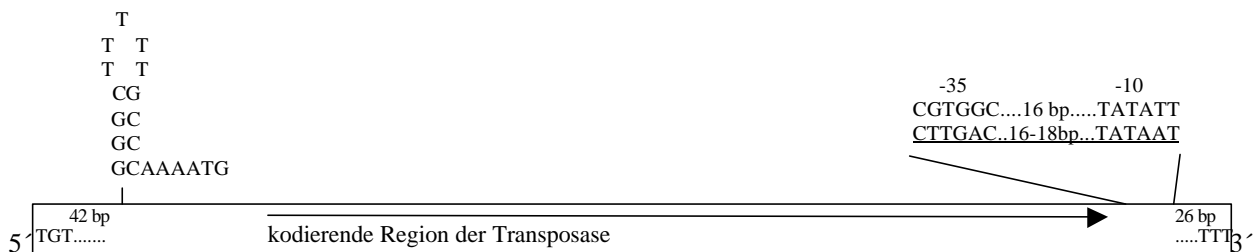


Abb. 13: **Charakteristische Merkmale des 620 bp langen *IS1004*-Elementes.** Der Anfang wurde nach den Sequenzergebnissen (Abb. 14) mit TGT und das Ende mit TTT festgelegt. Bei bp 46 beginnt ein Sequenzabschnitt, der Ähnlichkeit zu Rho-unabhängigen Terminatoren zeigt. Es befindet sich zudem ein 438 bp langer ORF, *tnpA*, der vermutlich für die Transposase kodiert, innerhalb des IS-Elementes (20) (Accession Nr. Z67733). Im 3' Bereich liegt ein Sequenzabschnitt, der hohe Homologie zu dem *E. coli* σ^{70} -Musterpromotor (unterstrichene Sequenz) aufweist.

3.2. Selektion auf O-Antigen positive Revertanten

Die Insertion von IS-Elementen ist häufig reversibel (71), deshalb wurde dies für die *IS1004*-Insertion in *wbeW* überprüft. Eine Möglichkeit zur Anreicherung potentiell O-Antigen positiver Revertanten ergab sich aus der Tatsache, daß O1-Antigen negative Stämme im Gegensatz zu O1-Antigen positiven Stämmen sensitiv gegenüber dem Komplementsystem sind (219). Ungefähr 10^8 Zellen des Stammes P27459res30 wurden für 1 h in Gegenwart von 50 % menschlichem Serum inkubiert und anschließend der gesamte Ansatz auf einer LB-Platte ausplattiert. In vier unabhängigen Versuchen wurden zwischen 3 und 200 überlebende Zellen gefunden. Insgesamt wurden 76 Kolonien in Kreuzstrichanalysen gegen den lytischen Phagen K139.cm9 getestet, wovon 23 wieder phagensensitiv waren. Dies war der erste Hinweis darauf, daß diese Stämme das O-Antigen wieder exprimieren konnten. Acht dieser phagensensitiven Stämme wurden genauer untersucht, wobei die Analyse des LPS durch SDS-PAGE und Silberfärbung bestätigte, daß alle das O1-Antigen wieder synthetisieren konnten (Abb. 12 A, Spur 5; Revertante 1 als

Bsp.). In diesen Stämmen war durch Southernblot-Analysen auch kein *IS1004* mehr in *wbeW* nachzuweisen (Abb. 15, Spur 5, Revertante 1 als Bsp.), somit handelte es sich tatsächlich um Revertanten. Zusätzlich wurde von der Revertante 1 ein PCR-Produkt mit den Primern O5 und O6 amplifiziert (Abb. 11) und mit dem Sequenzierprimer *wbeW*seq (Tab. 4) sequenziert. Die Sequenz der Revertante ist zu 100 % identisch mit der Sequenz vom Wt P27459 (Abb. 14). Es konnte also gezeigt werden, daß die Insertion von *IS1004* in das Gen *wbeW* reversibel ist.

3.3. Charakterisierung der *IS1004*-Insertionen

IS1004 wurde erst vor kurzem im Genom von *V. cholerae* Stämmen verschiedener Sero-
gruppen nachgewiesen und kann als epidemiologischer Marker benutzt werden, um Stämme zu
typisieren (20). Bik et al. (20) hatten auch chromosomale Bereiche mit *IS1004*-Insertionen eines
O1 klassischen Stammes subkloniert und sequenziert. Aus diesen Daten wurde postuliert, daß
IS1004 628 bp umfaßt, für ein Protein (TnpA) kodiert, keine terminalen inverted Repeats (kurze
gegenläufige Sequenzwiederholungen) besitzt und daß bei der Transposition die Insertionsstelle
nicht verdoppelt wird (20).

	Flankierende Seite 5'	linkes Ende	<i>IS1004</i>	rechtes Ende	Flankierende Seite 3'
P27459 (wt):	<u>TTTCTTGATTTTAT</u>				TTTTGCTCTA
P27459res30:	<u>TTTCTTGATTTTAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATTTTTCCTCTA</u>
P27459res30rev:	TTTCTTGATTTTAT				TTTTGCTCTA
MAK757:	TGGAGCAAGTTTAT				TTACATTATT
MAK757res3:	<u>TGGAGCAAGTTTAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATTTACATTATT</u>
<i>flaC</i> :	<u>GCTGGGTTTTTTAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATTGGTTTTGTG</u>
<i>wbeO</i> :	TACTTGATTTTAT	TGTCATCCC	<i>IS1358</i>	
<i>IS1004A</i> :	<u>CTCGCTTTTTTCAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATAGCTTTTTTTC</u>
<i>IS1004B</i> :	<u>CGCTCTTTTTTCAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATTAAACTATCT</u>
<i>IS1004C</i> :	<u>GAAGCGCTTTTCAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATTGGTAAAATG</u>
<i>IS1004D</i> :	<u>TGCGCTTTTTTCGT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATTTTTTCAGCC</u>
<i>IS1004E</i> :	<u>AGCCGCTCTTTTAT</u>	TGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTT	<u>ATGTTTATAAAT</u>
<i>IS1004</i> :		TTTCATTGTCATCCC	<i>IS1004</i>	AGGCGGATTTTTTAT	

Abb. 14: ***IS1004*-Insertionen im Chromosom von *V. cholerae*.** Sequenziert wurden jeweils PCR-Produkte, die mit den Primern O5 und O6 im Falle der P27459-Derivate und mit den Primern manBBamHI und manBSalI im Falle der MAK757-Derivate amplifiziert worden waren. Die Sequenzreaktion erfolgte für die PCR-Produkte aus den „P27459“-Stämmen mit dem Sequenzieroligonukleotid *wbeW*seq und für die der „MAK“-Stämme mit manBseq. Die PCR-Produkte, amplifiziert aus P27459res30 und MAK757res3, wurden noch zusätzlich mit dem Oligonukleotid *IS1004*seq sequenziert. Die flankierenden Sequenzen der bisher bekannten, mit *IS1004* assoziierten chromosomalen Bereiche wurden aus der Datenbank bzw. aus der Literatur entnommen. Zitate für: *flaC* (119), *wbeO* (Accession Nr. X9554), *IS1004A-IS1004E* (20) und die bisher festgelegte *IS1004* Sequenz (Accession Nr. Z67733). Die möglicherweise bei der Transposition verdoppelten bp AT sind unterstrichen.

In Abb. 14 wurden die bisher veröffentlichten sowie die in der Datenbank gespeicherten Sequenzdaten von chromosomalen *IS1004*-Insertionen mit den hier erhaltenen Sequenzdaten nach *IS1004*-Transposition in *wbeW* bzw. *manB* verglichen. Es wurde beim Vergleich ausschließlich Augenmerk auf die flankierenden Sequenzen gelegt, eventuell vorhandene Sequenzunterschiede innerhalb des Elements wurden jedoch nicht genauer untersucht. Das *IS1004*-Element umfasst demnach 620 bp statt 628 bp und startet mit 5'TGTCAT. Die Insertion erfolgt präferentiell in AT-reiche Regionen, bevorzugt nach 5'TTTAT oder 5'TTCAT-Sequenzfolgen. Bei der Transposition scheint es zur Verdoppelung der bp AT an der Insertionsstelle zu kommen, da beide Nukleotide das IS-Element nach der Integration flankieren. Nur in einem Falle (*IS1004D*) ist AT nicht auf beiden Seiten zu finden, was nicht unbedingt der Hypothese der AT-Verdopplung widerspricht, da hier eine Mutation nach der Transposition aufgetreten sein könnte. *IS1004* ist nur unvollständig im *rfb*-Gencluster (*wbeO*) zu finden und interessanterweise mit einem weiteren, defekten IS-Element, *IS1358*, gekoppelt (19).

3.4. Verteilung chromosomaler *IS1004*-Elemente nach Transposition

Um Hinweise auf den Transpositionsmechanismus zu erhalten, wurden die parentalen Stämme P27459 und MAK757, die O-Antigen negativen Mutanten mit *IS1004* Insertion und eine O-Antigen positive Revertante in Southernblot-Analysen auf die Verteilung von *IS1004*-Elementen im Genom untersucht. Die chromosomale DNA wurde, wie bei Bik et al. beschrieben, mit *HpaII* verdaut und zunächst mit einer *IS1004* spezifischen Sonde (PCR-Produkt hergestellt mit den Primern 10 und *IS1004*, Tab. 4) hybridisiert.

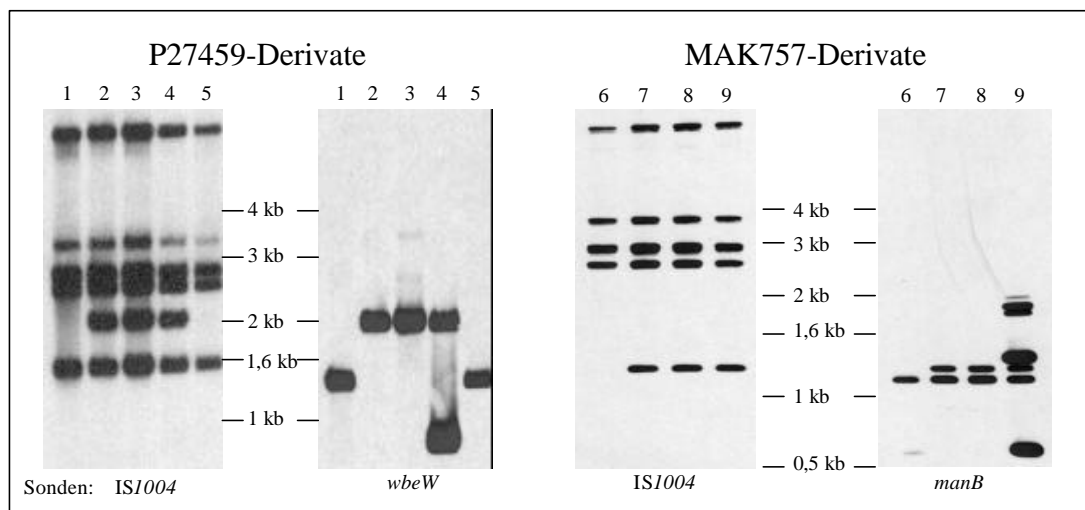


Abb. 15: **Verteilung der *IS1004* Elemente im Genom von Wt, Mutanten und einer Revertante.** Für die Southernblot-Analyse wurde die chromosomale DNA mit *HpaII* verdaut und zunächst mit einer *IS1004* spezifischen Sonde hybridisiert. Anschließend wurden dieselben Blots mit spezifischen Sonden gegen *wbeW* oder *manB* rehybridisiert, um die Insertion in das entsprechende Gen zu zeigen. Die zusätzlichen Banden in Spur 4 (*wbeW*-Hybridisierung) und Spur 9 (*manB*-Hybridisierung) stammen von den Komplementationsplasmiden. 1: Wt P27459; 2: P27459res30; 3: P27459res30/pACYC177; 4: P27459res30/pACYC*wbeW*; 5: P27459res30rev1; 6: MAK757; 7: MAK757res3; 8: MAK757res3/pACYC184; 9: MAK757res3/pJN*manB*.

Nach diesem Verdau befinden sich im Chromosom des Stammes P27459 fünf (Abb. 15, Spur 1) und in MAK757 vier *IS1004*-Kopien (Abb. 15, Spur 6). In den O-Antigen negativen Mutanten P27459res30 (Abb. 15, Spur 2) und MAK757res3 (Abb. 15, Spur 7) ist jeweils eine zusätzliche Kopie vorhanden. Dies deutet auf einen replikativen Transpositionsmechanismus hin. Interessanterweise ist die Verteilung der IS-Elemente in der Revertante P27459res30rev1 (Abb. 15, Spur 5) dieselbe wie im Wt. Sieben weitere Revertanten zeigten nach *HpaII*-Verdau und Hybridisierung mit der *IS1004* spezifischen Sonde auch keinen Unterschied zum Wt (Daten nicht gezeigt).

Da es möglich ist, daß man durch Verdau der chromosomalen DNA mit *HpaII* nicht alle Kopien an *IS1004* detektieren konnte, wurde die chromosomale DNA des Wt P27459, der Mutante P27459res30 und der Revertante P27459res30rev1 zusätzlich noch mit *EcoRI*, *HindIII* und *PstI* verdaut (alle Enzyme schneiden nicht in *IS1004*). Auch hier ergab sich nach Hybridisierung mit der *IS1004* spezifischen Sonde kein sichtbarer Unterschied in der Verteilung der IS-Elemente von Revertante und Wt (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit den Sequenzdaten deuten die Southernblot-Daten auf eine exakte Exzision des zusätzlichen *IS1004*-Elementes im Stamm P27459res30rev1 hin. Die Blots wurden mit einer *wbeW*- bzw. *manB*-spezifischen Sonde rehybridisiert (Abb. 15), um die Kopplung des zusätzlichen IS-Elements mit den entsprechenden Genen zu zeigen.

4. Mutanten mit verändertem O1-Antigen: Defekt in der Tetronatbiosynthese ?

Unter den spontan phagenresistenten Mutanten waren auch Stämme, die ein verändertes O-Antigen exprimierten und keine Autoagglutination zeigten (Typ b, Abb. 10A). Charakteristisch für diese Mutanten, wie z.B. P27459res144, ist, daß sie nur geringe Mengen an O-Antigen bilden und das Laufverhalten des isolierten LPS in 15 %igen PAA-Gelen deutlich vom Wt O1-LPS zu unterscheiden ist. Diese Art von Mutation war bisher für *V. cholerae* nicht beschrieben worden. Theoretisch könnte es sich um ein strukturell anderes O-Antigen handeln. Einige Gram-negative Bakterien, z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (75) oder *Burkholderia pseudomallei* (47) exprimieren gleichzeitig zwei verschiedene O-Antigene, in der Regel A- und B-Band-LPS genannt. Es ist auch bekannt, daß Monomere anderer Oberflächen-Polysaccharide wie z.B. ECA oder Kapsel an das Lipid A-Kernoligosaccharid gebunden werden können (232). Die Bindung verschiedener Polysaccharide an das Lipid A-Kernoligosaccharid erfolgt in *E. coli* durch die O-Antigen Ligase (WaaL). WaaL erkennt das Lipid A-Kernoligosaccharid und den C55-Carrier, an den verschiedene „Polysaccharid-Monomer-Bausteine“ gebunden vorliegen können (87). In *V. cholerae* der Serogruppe O139 sind z.B. das O-Antigen und die Kapsel identisch. Es könnte sich bei diesem veränderten O-Antigen hypothetisch aber auch um ein Perosaminpolymer ohne verknüpftes Tetronat handeln (vgl. Abb. 5).

Aus der Literatur ging bisher nicht eindeutig hervor, ob *V. cholerae* O1-Stämme ein O-Antigen nur mit Perosamin ohne verestertes Tetronat bilden können. Arbeiten, in denen

Transposonmutanten im Tetronatbiosynthese-Gencluster charakterisiert wurden (224) oder in denen größere Bereiche dieser Genregion deletiert wurden (60, 149), beschreiben nur, daß bei diesen Mutanten kein O-Antigen zu erkennen war. Allerdings wurde auch beschrieben, daß einige dieser Mutanten autoagglutinierten, während andere als Suspension vorlagen.

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden gezielt Gene inaktiviert, deren Produkte für die Synthese des Tetronats benötigt werden (Abb. 11, 16). Es sei hier nochmal darauf hingewiesen, daß bisher weder die Regulation des *rfb*-Genclusters noch die biochemischen Reaktionen der Tetronatbiosynthese experimentell untersucht wurde. Alle Daten beruhen ausschließlich auf Sequenz- und Homologievergleichsanalysen (150).

Das Gen *wbeL* wurde durch Deletion der AS 19 – 453 und die Gene *wbeN* und *wbeO* durch Insertion eines Suizidplasmides im Stamm P27459 inaktiviert (III 4.1.). Alle drei Stämme waren in Kreuzstrichanalysen resistent gegen den Phagen K139.cm9 und zeigten Autoagglutination in Flüssigkulturen. Die Analyse des LPS durch SDS-PAGE mit anschließender Silber- und Immunofärbung ergab, daß alle 3 Mutanten kein O-Antigen exprimierten (Abb. 17 A + B, Spur 4-6). Die Synthese des O-Antigens im Stamm P27459*wbeO* wurde durch ein *WbeO*-kodierendes Plasmid (vgl. III 5.9.1.) in trans komplementiert (Abb. 17 A + B, Spur 7).

Die Inaktivierung von drei verschiedenen Tetronat-Biosynthesegenen hatte also jeweils den Verlust des gesamten O-Antigens zur Folge, was der Theorie der Existenz eines tetronatlosen Perosamin-O-Antigens widersprach. Theoretisch gibt es mehrere Möglichkeiten diesen O-Antigen negativen Phänotyp zu erklären. Eventuell ist GDP-Perosamin kein Substrat für die postulierte GDP-Tetronat-Perosamintransferase oder die Proteine *WbeO*, *N* und *L* sind für weitere Schritte innerhalb der O-Antigenbiosynthese essentiell. Es ist auch denkbar, daß die Proteine für die Perosamin- und Tetronatbiosynthese einen Komplex bilden und es in Abwesenheit eines Enzyms zur Inhibierung der Perosamin-Polymerisation kommt. Für diese These könnte folgende Beobachtung sprechen: Bei der Konstruktion der Deletionsmutante P27459Δ*wbeL* mit Hilfe des Suizidvektors pKEKΔ*wbeL*, der den positiven Selektionsmarker *sacB* enthält (III 4.1.), wurde im ersten Schritt das Plasmid pKEKΔ*wbeL* (III 5.9.3.) über die

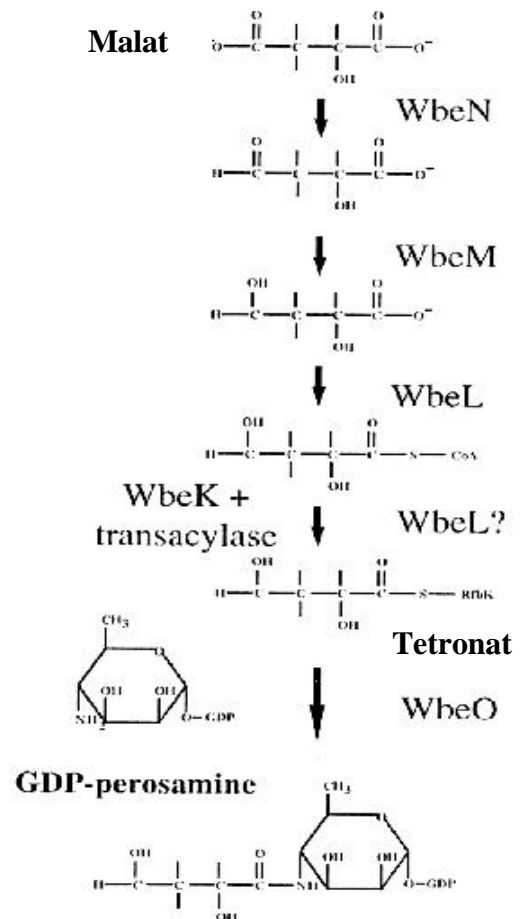


Abb. 16: **Postulierte Biosynthese von GDP-Perosamin-Tetronat.** Ausgangssubstrat ist Malat. Die Abbildung wurde von Stroehrer et al. entnommen (200).

flankierenden Sequenzen stromauf- oder stromabwärts von *wbeL* in das Genom rekombiniert (Abb. 18). Der Stamm P27459 Δ *wbeL*pKEK war K139.cm9-resistent, autoagglutinierte nicht und exprimierte ein verändertes O-Antigen (Abb. 17 A/B, Spur 3). Dieser Stamm war damit phänotypisch nicht vom dem spontan phagenresistenten Stamm P27459res144 (Abb. 17 A/B, Spur 2) zu unterscheiden.

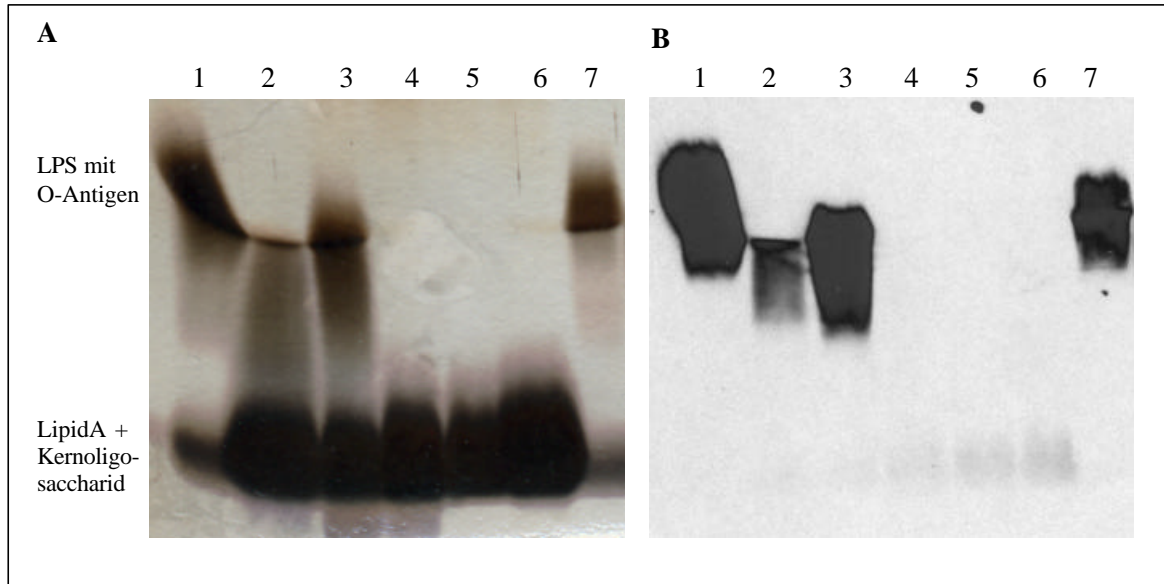


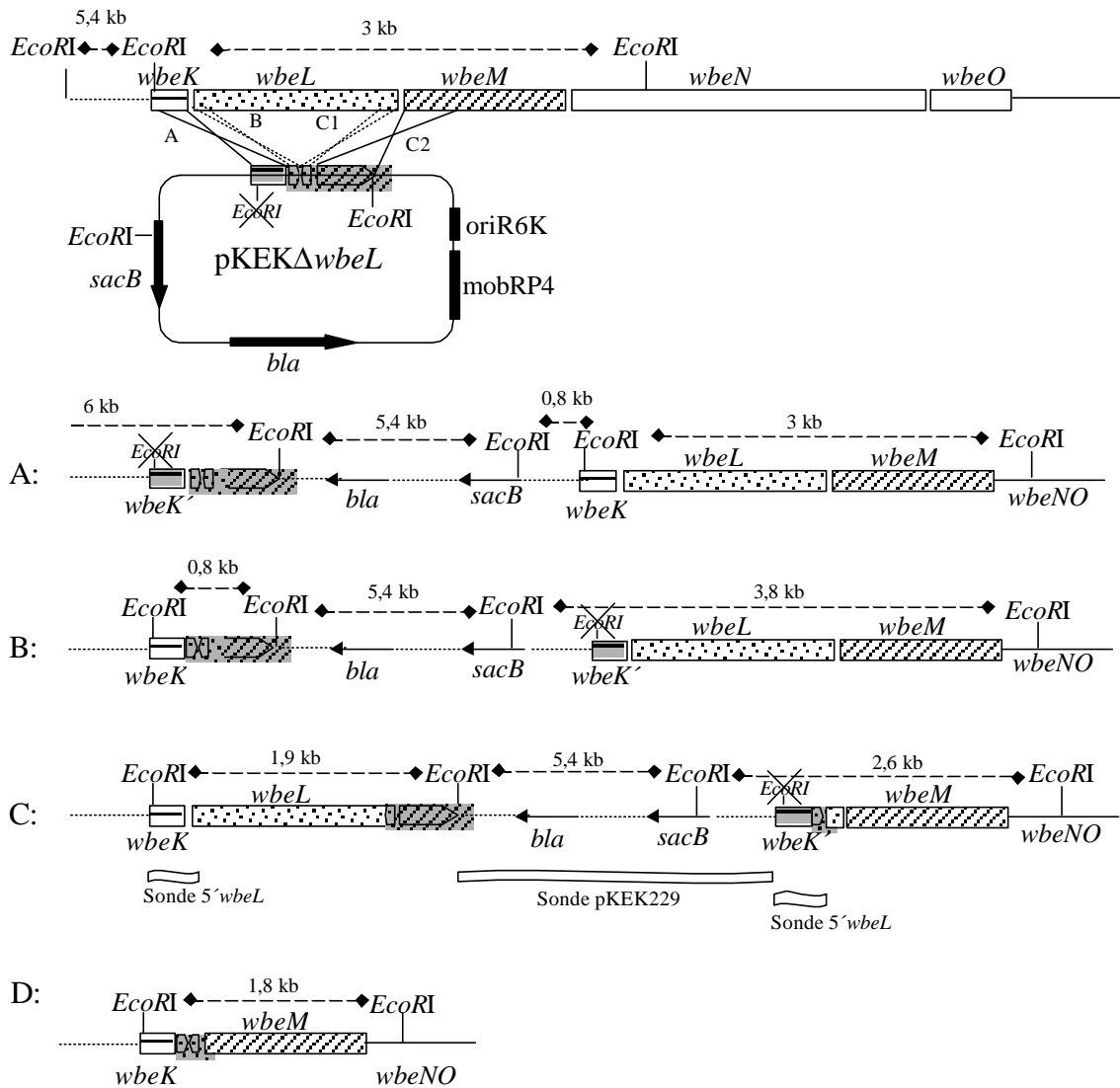
Abb. 17: **LPS-Analyse von Stämmen mit Mutationen in Tetronatbiosynthesegenen.**

A. LPS nach Silberfärbung des 15%igen PAA-Gels.

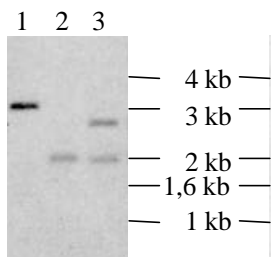
B. Korrespondierendes Westernblot mit einem polyklonalen O1-Antiserum. Es wurde jeweils dieselbe Menge aufgetragen. Spur 1: P27459; 2: P27459res144; 3: P27459 Δ *wbeL*pKEK; 4: P27459 Δ *wbeL*; 5: P27459*wbeN*; 6: P27459*wbeO*; 7: P27459*wbeO*/pACYC*wbeO*.

Um herauszufinden, wie das Plasmid pKEK Δ *wbeL* in das Chromosom integriert war, wurden Southernblot-Analysen durchgeführt. Theoretisch sind 4 verschiedene Möglichkeiten der Integration denkbar, allerdings wären durch Southernblotanalysen nur 2 Möglichkeiten zu unterscheiden. Da das Insert im Plasmid pKEK Δ *wbeL* aber eine Mutation in der *EcoRI*-Schnittstelle aufwies - diese Punktmutation wurde zufällig durch die PCR eingeführt und durch Sequenzierung des Plasmides mit dem Primer T7 Polymerase (Laborsammlung) aufgedeckt - war es möglich, durch Southernblotanalysen drei grundsätzlich verschiedene Integrationsmöglichkeiten zu unterscheiden (Abb. 18 I, A-C). Die chromosomale DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten und mit den Sonden 5'*wbeL* und pKEK229 hybridisiert (Abb. 18 I C). Bei der Hybridisierung mit der Sonde 5'*wbeL* war eine 1,9 und 2,6 kb große Bande zu erkennen (Abb. 18 II A, Spur 3) und mit der Sonde pKEK229 erneut die 2,6 kb und eine 5,4 kb große Bande (Abb. 18 II B, Spur 3). Aufgrund des Hybridisierungsmusters sollte die Integration des Plasmides pKEK Δ *wbeL* wie in Abb. 18 I C dargestellt, erfolgt sein. Dieses Ergebnis deutet an, daß die Gene *wbeK* und *wbeL* noch von ihrem natürlichen Promotor aus abgelesen werden können. Die Transkription der Gene *wbeMNO* ist nach Integration des Plasmides

I



IIA



IIB

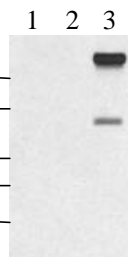


Abb. 18: Integration des Plasmides *pKEKΔwbeL* im Chromosom des Stammes P27459.

I. Dargestellt sind drei verschiedene Möglichkeiten der Integration des Suizidplasmides *pKEKΔwbeL* (A-C). Nach der zweiten homologen Rekombination ist ein Teil der *wbeL*-kodierenden Sequenz im Stamm P27459Δ*wbeL* deletiert und das Plasmid nicht mehr im Chromosom vorhanden (D). Das Plasmid *pKEK229ΔwbeL* besitzt im PCR-generierten Insert eine Punktmutation in der *EcoRI*-Schnittstelle (markiert als durchgestrichene *EcoRI*-Schnittstelle). II. Southernblot-Analysen der mit *EcoRI* verdauten chromosomalen DNA. Der Blot wurde in A mit dem PCR-Produkt 5' *wbeL* als Sonde hybridisiert. Derselbe Blot wurde mit dem Plasmid *pKEK229* (B) als Sonde rehybridisiert. Spur 1: P27459; 2: P27459Δ*wbeL*; 3: P27459Δ*wbeL*pKEK.

(Abb. 18, C) dagegen nicht unbedingt gewährleistet, da eigentlich kein Promotor vorgeschaltet ist. Es ist noch anzumerken, daß zwei weitere, unabhängig entstandene pKEK Δ wbeL-Integrianten untersucht wurden. Diese verhielten sich phänotypisch (einschließlich LPS-Immunoblot-Analysen) wie der Stamm P27459 Δ wbeLpKEK und waren laut Southernblot-Analysen ebenfalls an derselben Stelle in das Chromosom integriert.

Die genetischen Analysen waren nicht geeignet, um zweifelsfrei zu zeigen, daß Mutanten mit verändertem O-Antigen kein Tetronat mehr besitzen. Die Evidenz, daß Perosamin alleine exprimiert werden kann, ist damit nicht sehr stark. Um dies endgültig zu klären müßte eine Analyse der Kohlenhydrat-Zusammensetzung oder der Struktur des veränderten O1-Antigens in der spontan phagenresistenten Mutante und den Integrianten erfolgen.

5. Spontan phagenresistente R-LPS-Mutanten und das *waa*-Gencluster

Unter den spontan phagenresistenten R-LPS-Mutanten befanden sich zwei Isolate, P27459res46 und P27459res118, die im PAA-Gel einen Unterschied im Laufverhalten des Kernoligosaccharid-Bereiches aufwiesen (Abb. 20, Spur 4 und 5). Die Mutante P27459res118 war O-Antigen negativ, während in der Mutante res46 noch schwach das O-Antigen zu erkennen war. Denkbar ist, daß im Stamm res46 das Saccharid, an das das O-Antigen angehängt wird, fehlt und die O-Antigen-Ligase ineffizient die Bindung des O-Antigens an ein anderes Saccharid katalysiert. Eine andere Möglichkeit wäre, daß das modifizierte Kernoligosaccharid nicht mehr richtig mit der O-Antigen-Ligase interagieren kann und dadurch die Ligation ineffizient wird, obwohl das Saccharid zur O-Antigen Anhaftung noch vorhanden ist. Diese Art der Mutation führte z.B. in *E. coli* und *S. enterica* zu O-Antigen negativen R-LPS-Mutanten (87). Diese Mutante wurde jedoch nicht weiter durch genetische Analysen untersucht.

Die Struktur des Kernoligosaccharids der *V. cholerae* Serogruppen O1 und O139 wurde aufgeklärt und ist nahezu identisch (121, 216) (dargestellt in Abb. 19, B). Allerdings konnte nur für die Serogruppe O139 die Bindung des O139-Antigens an den α -HepIII-Rest des Kernoligosaccharides gezeigt werden (121), für die Serogruppe O1 war dies bisher experimentell nicht möglich (216). Genetisch und biochemisch wurde die Biosynthese des Kernoligosaccharids bisher kaum charakterisiert. Es wurde lediglich *gmnD* beschrieben, das stromabwärts des *rfb*-Genclusters lokalisiert ist (Abb. 11) und wahrscheinlich an der Heptosebiosynthese beteiligt ist, da GmnD hohe Homologien zu ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-Epimerasen aufweist. Bemühungen *gmnD* zu inaktivieren waren nicht erfolgreich, daher wurde vermutet, daß heptoselose *V. cholerae* Mutanten nicht lebensfähig sind (60, 202). Unter Berücksichtigung der bekannten Daten und der präsentierten LPS-Analysen könnte es sich bei dem phagenresistenten Stamm P27459res118 um eine Mutante in der Heptosyltransferase II handeln (Abb. 19 B).

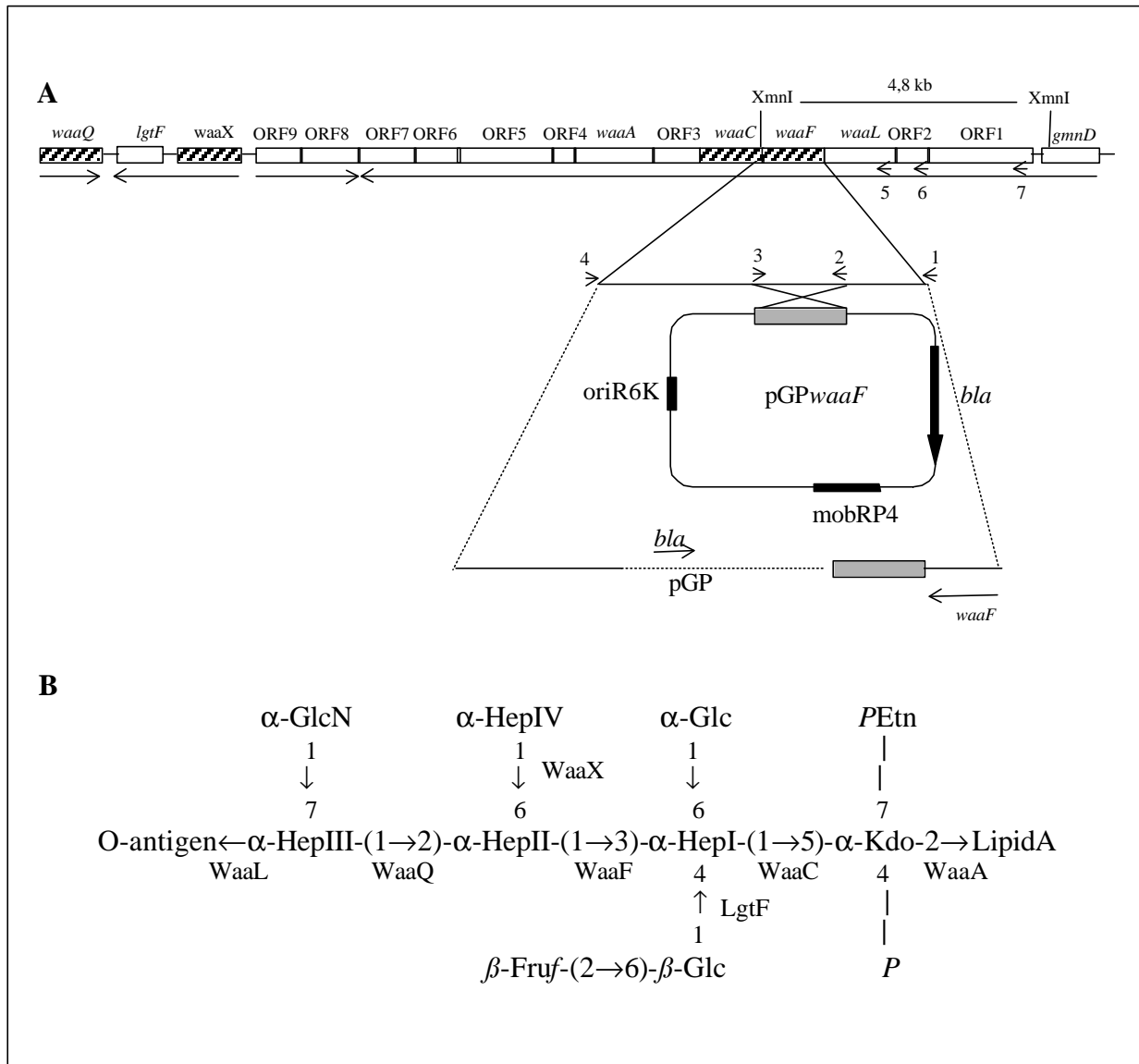


Abb. 19: LPS-Kernoligosaccharid-Region von *V. cholerae*.

A. Das *waa*-Gencluster: Die Sequenzinformation stammte aus dem *V. cholerae* Genomprojekt (96) und wurde mit den Programmen OrfFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) und Blast Search (3) ausgewertet. Die Inaktivierung von *waaF* durch Integration des Suizidvektors pGP*waaF* ist schematisch dargestellt. Die verwendeten Primer sind schematisch eingezeichnet; 1: *waaF*PstI, 2: *waaF*SaII, 3: *waaF*EcoRI, 4: *waaF*FspI, 5: *waaL*NsiI, 6: *waaORF2*, 7: *waaORF1* (vgl. auch Tab. 4). Die Transkriptionsrichtung der Gene wurde durch Pfeile angegeben.

B. Struktur der LPS Kernregion. Die Darstellung erfolgte nach den Daten von Knirel et al. (121) und Vinogradov et al. (216). Die möglichen Funktionen der Transferasen mit Sequenzähnlichkeiten sind eingezeichnet. Weitere Erklärungen vgl. Text. Hep: *L-glycero-D-manno-heptose*; Kdo: *3-deoxy-D-manno-octulosonic acid*; *PEtn*: *2-Aminoethylphosphat*.

In der *V. cholerae* Genomdatenbank konnten aufgrund von Proteinsequenzähnlichkeiten vier potentielle Heptosyltransferasen identifiziert werden. Die korrespondierenden Gene sind auf dem größeren Chromosom in einem Gencluster lokalisiert, das für Proteine kodiert, die aufgrund von Ähnlichkeiten zu bekannten Enzymen an der Biosynthese des Kernoligosaccharides beteiligt sein könnten. Dieses Gencluster, das stromaufwärts des *rfb*-Genclusters lokalisiert ist, wird im

folgenden, in Anlehnung an die Nomenklatur für LPS-Kernbiosynthese-Gencluster von Gram-negativen Bakterien (172), *waa*-Gencluster genannt und ist in Abb. 19 A dargestellt. Gene, die vermutlich für Heptosyltransferasen kodieren, sind schraffiert dargestellt. *waaF* kodiert für ein Protein, das über den gesamten Bereich hohe Identität zu Heptosyl-II-Transferasen aufweist (Anhang Tab. 14). Die Identitäten zu Heptosyl-I-Transferasen Gram-negativer Bakterien sind bei der potentiellen *V. cholerae* Heptosyl-I-Transferase *WaaC* konserviert, aber nicht sehr hoch (Anhang Tab. 14). *WaaQ* ist zu 55 % identisch mit der Heptosyltransferase III (*WaaQ*) von *Haemophilus ducreyi*, die eine α -Hep(1 \rightarrow 2) α -Hep-Verknüpfung katalysiert (61). *WaaX* besitzt geringe Homologie zu verschiedenen Heptosyltransferasen (Anhang Tab. 14).

Weitere Proteine, die Ähnlichkeiten zu Enzymen mit bekannter Funktion in der Biosynthese des Kernoligosaccharides aufweisen, sind die potentielle Kdo-Transferase *WaaA* mit konservierter Homologie zu verschiedenen Kdo-Transferasen Gram-negativer Bakterien (Anhang Tab. 14) und *LgtF* mit 67 % Identität zu *LgtF* von *Haemophilus ducreyi*, das die β Glc(1 \rightarrow 4) α -Hep-Verknüpfung katalysiert (61). Die möglichen Funktionen der beschriebenen Proteine in der Biosynthese des Kernoligosaccharides von *V. cholerae* der Serogruppe O1 sind in Abb. 19 B eingezeichnet. Proteine, kodiert von den durchnummerierten ORFs (Abb. 19 A), wiesen nur sehr geringe Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen auf, die allerdings häufig an der Synthese von Polysacchariden beteiligt sind. Manche besitzen auch hohe Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen mit unbekannter Funktion (Anhang Tab. 14). Aufgrund der Genanordnung liegt die Vermutung nahe, daß die Genprodukte dieser ORFs ebenfalls an der Biosynthese des Kernoligosaccharides beteiligt sind.

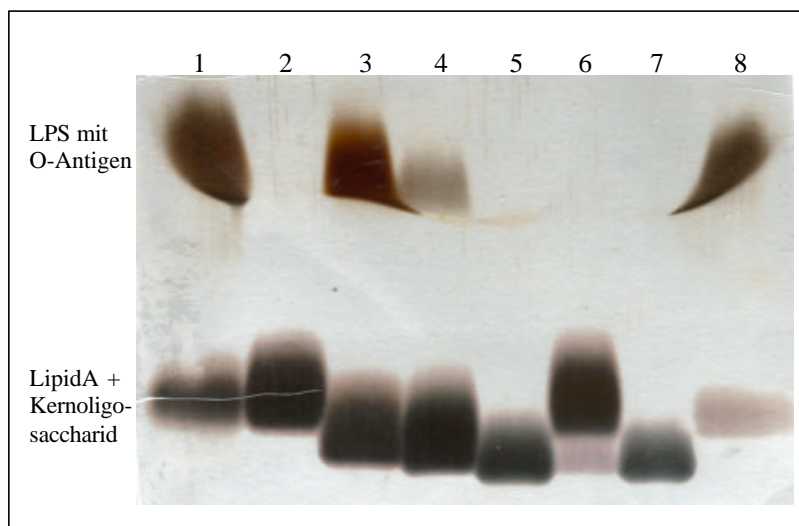


Abb.20: LPS Laufverhalten von R-LPS Mutanten im PAA-Gel.

- 1: P27459
- 2: P27459 Δ wbeW
- 3: P27459res29
- 4: P27459res46
- 5: P27459res118
- 6: P27459res118/pACYC*waaF*
- 7: P27459*waaF*/pTrcAkan
- 8: P27459*waaF*/pACYC*waaF*

Die funktionelle Analyse der Genprodukte des *waa*-Genclusters wurde mit der Inaktivierung von *waaF* durch Integration eines Suizidplasmides begonnen (vgl. Abb. 19 A, Konstruktion: III 4.1. und 5.9.2.). Aus dem Stamm P27459*waaF* präpariertes LPS, migrierte im PAA-Gel gleich wie LPS des Stammes P27459res118 (Abb. 20, Spur 5, 7). Ein Plasmid, das für *WaaF* kodiert

(III 5.9.1.) wurde in beide Stämme transformiert. Das Plasmid pACYC*waaF* komplementierte in trans die Biosynthese des LPS im Stamm P27459*waaF* (Abb. 20, Spur 8). Die Integration des Suizidplasmides hatte damit keinen polaren Effekt auf die Transkription weiterer Gene des *waa*-Genclusters. Im Stamm P27459res118 konnte durch die Expression von *waaF* in trans nur die Kernoligosaccharid-Synthese wiederhergestellt werden, nicht aber die Synthese des O-Antigens (Abb. 20, Spur 6). Diese Beobachtung ließ vermuten, daß nicht nur ein Gen im Stamm P27459res118 mutiert war. Deshalb wurden zunächst durch Southernblotanalysen die stromaufwärts von *waaF*-liegenden DNA-Bereiche überprüft. Dazu wurde die chromosomale DNA der Stämme P27459 und P27459res118 mit dem Enzym *Xmn*I verdaut und mit der Sonde *waaF* (generiert durch die Primer *waaFPst*I und *waaFFsp*I, Abb. 19A) hybridisiert. Im Wt Stamm P27459 hybridisierte das erwartete 4,8 kb große *Xmn*I-Fragment, während das Restriktionsfragment im Stamm P27459res118 deutlich kleiner war (Abb. 21 A). Daraufhin wurde diese Region durch PCR-Analysen näher untersucht. Mit den Primerkombinationen *waaFFsp*I/*waaFPst*I, *waaFFsp*I/*waaL*NsiI, *waaFFsp*I/*waaORF2* und *waaFFsp*I/*waaORF1* (Abb. 19 A) wurde jeweils eine PCR mit chromosomaler DNA der Stämme P27459 und P27459res118 als Template durchgeführt. Das *waaFFsp*I/*waaL*NsiI-Fragment des Stammes P27459res118 war um etwa 500 bp kürzer als das des Wt Stammes P27459 (Abb. 21, B), während mit der Primerkombination *waaFFsp*I/*waaFPst*I in der Mutante kein Produkt erhalten wurde.

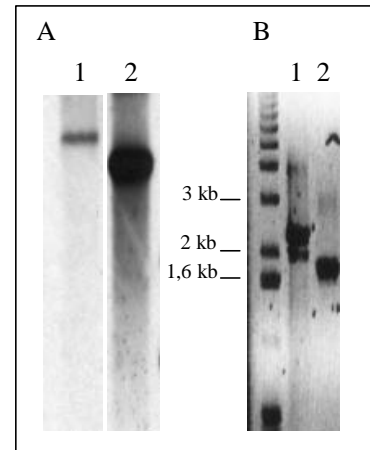


Abb. 21: **Deletion eines DNA-Fragmentes im Stamm P27459res118.** (vgl. Text)
 A. Southernblot-Analysen.
 B. PCR-Produkte amplifiziert mit *waaFFsp*I/*waaL*NsiI.
 1: P27459; 2: P27459res118.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die Deletion im 5' Bereich von *waaF* erfolgt war, und eventuell auch den stromaufwärts liegenden ORF betrifft. Deshalb wurden zwei Sequenzieroligonukleotide ausgewählt (*waaF*seq, *waaL*seq; Anhang Abb. 31) und das *waaFFsp*I/*waaL*NsiI-PCR-Produkt des Stammes P27459res118 sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, daß in der spontan phagenresistenten Mutante P27459res118 eine Deletion von 546 bp erfolgt war, die die beiden Gene *waaL* und *waaF* betrifft (Anhang Abb. 31). Damit sind 72 AS im C-Terminus des Proteins WaaL und 109 AS im N-Terminus des Proteins WaaF deletiert, zudem entsteht ein Hybridprotein, das nicht mehr im Leseraster von WaaF ist (Anhang Abb. 31). Die präsentierten Daten zu der Spontanmutante P27459res118 deuten an, daß es sich bei WaaL um die O-Antigen-Ligase handelt. WaaL zeigt zwar nur geringe Homologie zu einer O-Antigen-Ligase, der Lipid-A-core:surface-polymer-Ligase WaaL von *E. coli* (Anhang Tab. 14), aber die Beobachtung, daß der Stamm P27459res118 in Gegenwart des Komplementationsplasmides pACYC*waaF* zwar das Kernoligosaccharid wieder synthetisiert, nicht aber das O-Antigen, unterstützt diese Vermutung. Die Komplementation beider Gene (*waaL* und *waaF*) in trans im Stamm P27459res118 sowie die Charakterisierung der O-Antigen-Ligase wurde innerhalb dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

Die spontan phagenresistente R-LPS-Mutante P27459res118 war durch eine Deletion entstanden, die zur Inaktivierung der putativen Heptosyltransferase II und der putativen O-Antigen-Ligase führte. Die Mutation in *waaL* ist dabei rezessiv, da bereits durch den Ausfall von WaaF nur noch ein kryptisches Kernoligosaccharid ohne O-Antigen synthetisiert werden kann. Wie es zur Deletion der 546 bp kam, ist nicht bekannt, da keine auffälligen DNA-Strukturen gefunden wurden, die den Mechanismus erklären könnten.

6. LPS-Kernoligosaccharid-Defekt und *gal*-Gene

6.1. Identifizierung von spontan phagenresistenten Stämmen mit verändertem Kernoligosaccharid und intaktem O1-Antigen als *galU*-Mutanten

Phagenresistente Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid aber intaktem O-Antigen könnten hypothetisch ebenfalls in einer durch das *waa*-Gencluster kodierten Transferase mutiert sein. Die Beobachtung, daß diese Art von Mutanten zwar auf Minimalmedium-Platten mit Glukose, Fruktose oder Maltose, aber nicht mehr mit Glycerin oder Galaktose als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen konnten, widersprach aber dieser Theorie und ließ eher vermuten, daß die Synthese eines aktivierten Zuckers beeinträchtigt ist. Um diesen Zusammenhang zu klären, wurden zunächst Spontanmutanten des Stammes P27459res29 untersucht, die entweder wieder auf Glycerin oder auf Galaktose wachsen konnten (III 4.3.). 12 Stämme, die wieder auf Glycerin wuchsen, hatten immer noch ein verändertes LPS, waren phagenresistent und konnten nicht auf M9-Galaktose-Platten wachsen (Tab. 8). Es handelte sich hier also um Suppressormutanten des Stammes P27459res29, die lediglich das Wachstum auf M9-Glycerin ermöglichten. Dagegen waren 18 untersuchte Stämme, die nach Selektion auf M9-Galaktose-Wachstum erhalten worden waren, Revertanten, da alle Wt LPS exprimierten, phagensensitiv waren und auch wieder auf M9-Glycerin wuchsen (Tab. 8). Diese Beobachtungen zeigten eine klare Kopplung der Mutation des Stammes P27459res29 mit dem Galaktosestoffwechsel.

Da in der LPS-Kernregion Glukose-, aber keine Galaktosereste nachgewiesen wurden (106, 112, 216), lag aufgrund des Wissens über die LPS-Biosynthese und des Galaktosestoffwechsels in *E.coli* und *S. typhimurium* nahe, daß es sich um *galU*-Mutanten handeln könnte (129, 170). In *E. coli* können *galU*-Mutanten UDP-Glukose, ein Substrat für Transferasen, nicht mehr synthetisieren und haben einen Wachstumsdefekt in M9-Galaktose-Medien (129). Diese Hypothese wurde überprüft, indem ein Plasmid konstruiert wurde, das *galU* exprimiert (III 5.9.1.). Im Stamm P27459res29 wurden alle Phänotypen in Gegenwart des Plasmides pACYC*galU*, aber nicht in Gegenwart des Ausgangsplasmides pACYC177 komplementiert (Tab. 8). Der Stamm P27459res29/pACYC*galU* verhielt sich wie die gerade beschriebenen M9-Galaktose positiven Revertanten und der Wt. Damit konnte gezeigt werden, daß es sich bei den phagenresistenten Stämmen mit O-Antigen aber verändertem Kernoligosaccharid um *galU*-Mutanten handelt. Die Kopplung zum Glycerinstoffwechsel ist bisher unklar.

6.2. Konstruktion und Charakterisierung von *gal*-Mutanten

Um den Galaktosestoffwechsel in *V. cholerae* zu charakterisieren und um *gal*-Mutanten in Bezug auf Virulenz vergleichen zu können, wurden durch genetische Manipulation neben *galU* noch zwei weitere *gal*-Gene, *galE* und *galK*, inaktiviert. Die benötigte Sequenzinformation wurde aus der *V. cholerae* Genomdatenbank (TIGR) entnommen. Dazu wurde in der Genomsequenz nach Genprodukten gesucht, die Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen des Gal-Stoffwechsels aufwiesen (vgl. III 9.).

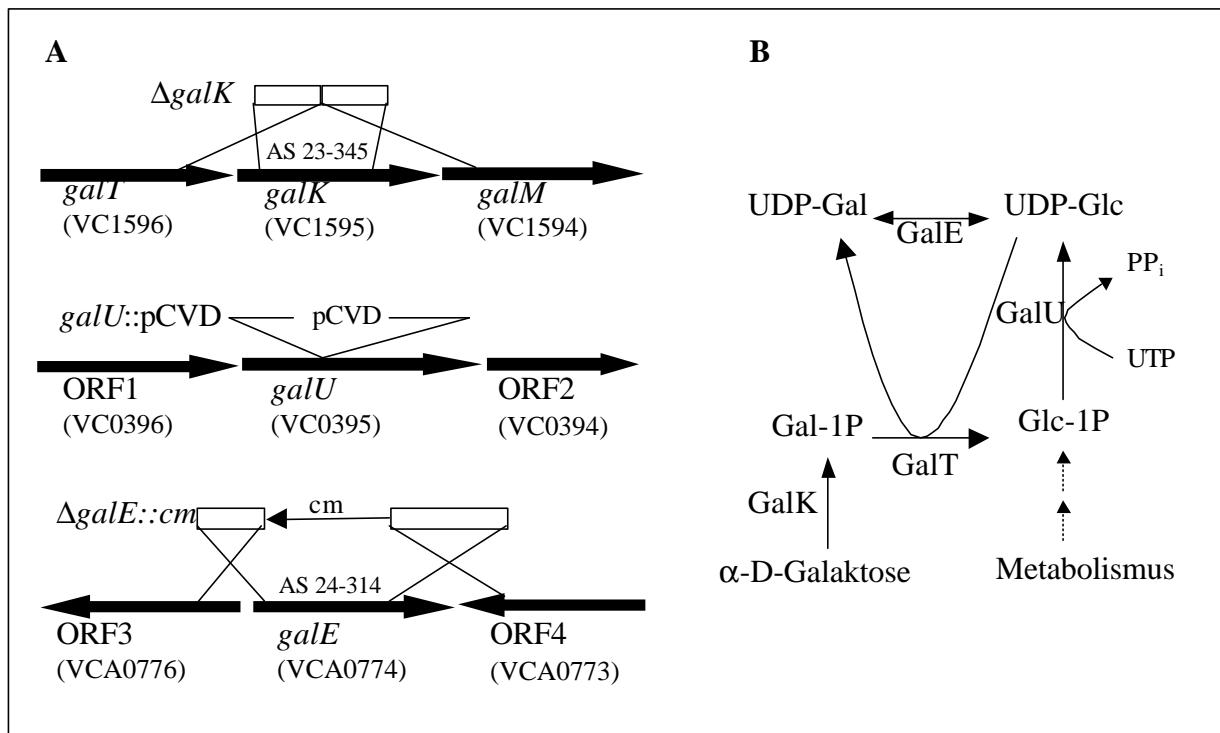


Abb. 22: Enzyme und korrespondierende Gene des Galaktosestoffwechsels.

A. Anordnung der Gene im *V. cholerae* Chromosom. Das *galTKM*-Operon und *galU* sind auf Chromosom 1 lokalisiert, während *galE* auf Chromosom 2 liegt. ORF1 besitzt Homologien zur LuxR-Familie der Transkriptionsregulatoren. ORF2 (914 AS) weist dagegen 81 % Identität zu der Excinuclease ABC-Untereinheit A von *S. typhimurium* auf, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Accession-Nr. P37434). ORF3 und 4 besitzen nur sehr geringe Homologien zu bekannten Proteinen, deren Funktion noch nicht geklärt ist.

Anmerkung: Die Auswertung der *V. cholerae* Genomsequenz wurde in der Zwischenzeit veröffentlicht. Die ORFs wurden verglichen und die offizielle Bezeichnung der ORFs wurde zur Vereinfachung in Klammern eingefügt.

B. Galaktosekatabolismus Gram-negativer Bakterien (129). GalK: Galaktokinase; GalT: Galaktose-1-P Uridyltransferase; GalU: UDP-Glukose Pyrophosphorylase; GalE: UDP-Glukose-4-Epimerase.

Das identifizierte Enzym Galaktokinase (GalK, 386 AS) besaß 64 % Identität (78 % Ähnlichkeit) zu GalK von *E. coli* (Accession-Nr. P06976). Das korrespondierende Gen *galK* liegt auf dem größeren Chromosom und wird vermutlich in einem Operon mit *galT* und *galM* transkribiert (Abb. 22 A). Die Sequenzähnlichkeiten von GalT (Galaktose-1-P-Uridyltransferase, Abb. 22 B) und GalM sind mit 72 % Identität (82 % Ähnlichkeit) zu GalT von *E. coli* (Accession-Nr. CAA29574) und 49 % Identität (63 % Ähnlichkeit) zu GalM von *E. coli*

(Accession-Nr. P40681) ebenfalls sehr konserviert. *galM* kodiert in *E. coli* für eine Aldose-1-Epimerase (Mutarotase), die nach Laktosespaltung die entstehende β -D-Galaktose in die verstoffwechselbare α -D-Galaktose umwandelt (24). Ob GalM ein Relikt ist oder in *V. cholerae* eine Funktion besitzt, muß erst noch geklärt werden, da *V. cholerae* keine Laktose verstoffwechseln kann ((107) und eigene Beobachtungen). *galU* ist auf dem größeren Chromosom und *galE* auf dem kleineren Chromosom lokalisiert (Abb. 22 A). GalE (338 AS) ist zu 65 % identisch (79 % ähnlich) mit GalE von *E. coli* (Accession-Nr. P09147), während GalU zu 74 % identisch (86 % ähnlich) mit GalU von *Pseudomonas aeruginosa* (Accession Nr. CAA09328) ist. Die Proteine, die von den zu *galE* und *galU* unmittelbar benachbarten Genen kodiert werden, sind nach Homologievergleichsanalysen weder am Galaktosestoffwechsel noch an der LPS-Biosynthese beteiligt.

Die Gene *galK* und *galE* wurden durch Deletion eines Stückes der kodierenden Region inaktiviert. Im Falle der *galE*-Deletion wurde zusätzlich ein Antibiotikaresistenzmarker eingesetzt, so daß *galE* negative Stämme Chloramphenicolresistent sind. Zusätzlich wurde auch eine *galEK*-Doppelmutante konstruiert. *galU* wurde durch Insertion eines Suizidplasmides inaktiviert. Die eingeführten Mutationen in die *gal*-Gene sind in Abb. 22 A schematisch dargestellt. Es wurde auch ein Plasmid konstruiert, das *galE* konstitutiv vom *bla*-Promotor exprimiert. Die Konstruktion der Deletionsstämme sowie der Suizid- bzw. Komplementationsplasmide ist in Kapitel III (4.1.; 5.9.1.; 5.9.2.; 5.9.3.) beschrieben.

Stamm	Wachstum auf Minimalmedium			Wachstum, LB 2% Galaktose	LPS-Laufverhalten im PAA-Gel ¹⁾
	Glukose	Glycerin	Galaktose		
P27459 (Wt)	+	+	+	+	Wt
P27459res29	+	-	-	+/- ²⁾	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver 3)}
P27459res29supGlyc# 1-12	+	+	-	n.d. ⁴⁾	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}
P27459res29revGal # 1-18	+	+	+	n.d.	Wt
P27459res29pACYC177	+	-	-	+/-	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}
P27459res29pACYC <i>galU</i>	+	+	+	+	Wt
P27459 <i>galU</i>	+	-	-	+/-	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}
P27459 <i>galU</i> /pTrcAkan	+	-	-	+/-	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}
P27459 <i>galU</i> /pACYC <i>galU</i>	+	+	+	+	Wt
P27459 Δ <i>galE::cm</i>	+	n.d.	-	-	Wt
P27459 Δ <i>galE::cm</i> pACYC177	+	n.d.	-	-	Wt
P27459 Δ <i>galE::cm</i> pACYC <i>galE</i>	+	+	+	+	Wt
P27459 Δ <i>galK</i>	+	n.d.	-	+	Wt
P27459 Δ <i>galK</i> Δ <i>galE</i>	+	n.d.	-	+	Wt

Tabelle 8: **Wachstumsverhalten und LPS-Migration im PAA-Gel verschiedener *gal*-Mutanten.** 1) Der Nachweis des LPS im PAA-Gel erfolgte durch Färbung mit Silber bzw. das O1-Antigen wurde immunologisch mit einem O1-spezifischen Antiserum nachgewiesen. 2) Die Stämme wuchsen zunächst auf diesen Platten an, dann war aber Lyse zu beobachten. 3) LPS mit intaktem O-Antigen, aber verändertem (ver) Kernoligosaccharid (vgl. auch Abb. 20, Spur 3). 4) n.d.: Nicht getestet.

Das LPS sowie das Wachstum der konstruierten *gal*-Stämme in Gegenwart von Galaktose wurde analysiert, die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefaßt. *galE*, *galK* und *galU*-Mutanten konnten Galaktose nicht mehr verstoffwechseln. Zudem waren *galE*- und *galU*-Mutanten nicht mehr in der Lage in Gegenwart hoher Galaktosekonzentrationen zu wachsen. Dieser Phänotyp wurde bereits gut für *E.coli* und weitere Gram-negative Bakterien untersucht. Aus diesen Arbeiten ist bekannt, daß sich in *galE*-Mutanten die toxischen Produkte Gal-1-P und UDP-Gal anhäufen, während in *galU*-Mutanten nur Gal-1-P akkumuliert wird. Diese Produkte führen zur Lyse der Zellen (129). Die *galEK*-Doppelmutante wächst dagegen sehr gut in Gegenwart hoher Galaktosekonzentrationen, da hier Gal-1-P nicht gebildet wird (Abb. 22 B). Aufgrund dieser Wachstumsphänotypen und der hohen Ähnlichkeiten der Proteine zu bekannten Proteinen des Galaktosestoffwechsels von *E.coli*, kann man auch für *V. cholerae* einen ähnlichen Galaktoseabbauweg postulieren (Abb. 22 B). Alle Phänotypen der *galU*- und *galE*-Mutanten konnten in trans durch Plasmide, die das entsprechende Gen exprimierten, komplementiert werden (Tab. 8).

Die Analyse des LPS durch SDS-PAGE ergab die *galU*-Mutante die bereits beschriebene Strukturveränderung des Kernoligosaccharides ohne erkennbare Beeinträchtigung des O1-Antigens, während die *galE*-, *galK*- und *galEK*-Mutanten keine sichtbaren LPS-Defekte aufwiesen. Für ein intaktes LPS spricht auch, daß *galE* und *galK* Mutanten sowie die *galEK*-Doppelmutante im Gegensatz zu *galU*-Mutanten sensitiv gegen den Phagen K139.cm9 waren. Damit wurde auch genetisch gezeigt, daß im LPS von *V. cholerae* O1 keine Galaktose vorhanden ist, da *galEK*-Mutanten nicht mehr in der Lage sein sollten UDP-Galaktose, das Substrat für Galaktosetransferasen, zu synthetisieren.

7. Virulenzeigenschaften von LPS- und *gal*-Mutanten

Da nun geeignete Mutanten mit unterschiedlichen LPS-Strukturen vorlagen, wurde untersucht, ob sie noch virulent sind bzw. im Darm persistieren können. Die Kolonisierungsfähigkeit der Mutanten wurde in neugeborenen Mäusen (5-6 Tage alt) getestet, da dieses Tiermodell in Bezug auf Dünndarmkolonisierung relativ gut auf den Menschen übertragbar ist (118). Um herauszufinden, welche LPS-Substrukturen essentiell sind für den Kolonisierungsprozeß, wurde ein O-Antigen negativer Stamm mit einer R-LPS Mutante (O-Antigen⁻, verändertes Kernoligosaccharid) und der *galU*-Mutante (O-Antigen⁺, verändertes Kernoligosaccharid) verglichen. Da *galU*-Mutanten nicht nur in der LPS-Struktur, sondern auch im Gal-Stoffwechsel beeinträchtigt sind, wurden *galE* und *galEK* Mutanten ebenfalls auf ihre Kolonisierungsfähigkeit getestet. Dies war notwendig, da nicht sicher ist, ob freie Galaktose im Dünndarm vorkommt und *galU*- wie *galE*-Mutanten sensitiv gegen hohe Konzentrationen an Galaktose sind. *galEK*-Mutanten sind dagegen nicht sensitiv gegenüber Galaktose (IV 6.2.). In „in vitro“ Assays wurden untersucht, ob in den Mutanten andere Virulenzfaktoren beeinträchtigt

sind. Zusätzlich wurde die Fähigkeit der Mutanten untersucht, in Gegenwart von Substanzen zu überleben, die im menschlichen Darm vorkommen (IV 7.3. und 7.4.).

7.1. Kolonisierung der Mutanten im Dünndarm von neugeborenen Mäusen

In einem sogenannten „competition assay“ wurden die Mutanten (*lacZ*⁺) mit dem isogenen Wt P27459*lacZ*, der eine Mutation in *lacZ* besaß, verglichen. In jeder Maus wurde die Kolonisierungsfähigkeit des Wt mit einer Mutante verglichen. Dadurch konnten unspezifische Effekte, die auf eventuelle Variationen in der Kolonisierungsfähigkeit von Tier zu Tier zurückzuführen wären, ausgeschlossen werden. Die Fähigkeit der LPS- und Gal-Mutanten den Dünndarm zu kolonisieren wurde durch den „competitive index“ (CI) ausgedrückt, der definiert ist als das Verhältnis von Mutanten zu Wt im Dünndarmhomogenat geteilt durch das Verhältnis von Mutanten zu Wt im Inokulum.

Stamm	LPS-Struktur	Anzahl der Mäuse	CI (competitive index) ¹⁾	
			„in vivo“	„in vitro“
P27459-S (<i>lacZ</i> ⁺)	Wt	3	1,6	1
P27459Δ <i>wbeW</i>	O-Antigen ⁻	5	0,024	n.d. ²⁾
P27459Δ <i>wbeW</i> /pJN <i>wbeW</i>	Wt	4	0,8	n.d.
P27459res46 (R-LPS)	O-Antigen ⁻ , Kern ^{ver 3)}	5	< 10 ^{-4 4)}	0,09
P27459res29	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	6	0,01	0,7
P27459res29/pACYC177	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	6	0,01	4,7
P27459res29/pACYC <i>galU</i>	Wt	5	1,94	3
P27459 <i>galU</i>	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	5	0,03	1
P27459Δ <i>galE::cm</i>	Wt	6	0,96	n.d.
P27459 Δ <i>galKΔgalE::cm</i>	Wt	7	1,2	n.d.

Tabelle 9: **Kolonisierung von LPS- und Gal-Mutanten in neugeborenen Mäusen.** 1) Der „in vivo CI“ drückt die Kolonisierungsfähigkeit der Mutanten verglichen mit dem Wt in 5-6 Tage alten CD1 Mäusen aus. Die Stämme P27459Δ*wbeW*, P27459res46, P27459res29, P27459res29/pACYC177, P27459*galU* besaßen signifikante Kolonisierungsdefekte gegenüber dem Wt (Students zweiseitiger T-Test p<0,01), während alle anderen Stämme keine signifikanten Unterschiede zeigten (p>0,01). Der „in vitro“ CI wurde parallel bestimmt, indem ein Aliquot vom Input in 5 ml LB ÜN bei 37° C inkubiert und davon eine Verdünnungsreihe auf LB-Platten mit XG ausplattiert wurde. 2) n.d.: Nicht getestet. 3) verändertes Kernoligosaccharid. 4) R-LPS-Mutanten konnten aus keiner Maus isoliert werden, der CI ist dadurch unendlich klein.

Wie aus Tab. 9 ersichtlich ist, kolonisierte der O-Antigen negative Stamm (*wbeW*) signifikant schlechter als der Wt. Dieses Verhalten wurde auch schon für zwei andere O-Antigen negative Mutanten beschrieben (*gmd*, O1 klassisch (219); *manB*, O1 El Tor (33)). Der beobachtete Kolonisierungsdefekt wurde in Gegenwart eines *wbeW* exprimierenden Plasmides in trans wieder aufgehoben (P27459Δ*wbeW*pJN*wbeW*). Die R-LPS-Mutante (P27459res46) konnte überhaupt nicht mehr kolonisieren, im Dünndarmhomogenat waren ausschließlich Wt Bakterien nachzuweisen. Diese Mutante besaß allerdings auch im „in vitro competitive assay“ ein Wachstumsnachteil gegenüber dem Wt.

Die Kolonisierungsfähigkeit der *galU*-Mutanten mit einem veränderten Kernoligosaccharid aber intaktem O-Antigen war gegenüber dem Wt zwischen 50fach und 100fach herabgesetzt. In Anwesenheit von *galU* in trans (auf Plasmid pACYC*galU*) war die spontane *galU*-Mutante wieder in der Lage im Dünndarm zu kolonisieren. Der Kolonisierungsdefekt ist also direkt auf die Mutation in *galU* zurückzuführen und wurde nicht durch eine sekundäre Mutation ausgelöst. Weiterhin besaßen *galU*-Mutanten „in vitro“ keinen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wt, was andeutet, daß diese Art der Mutanten entweder im Dünndarmmilieu nicht genügend persistieren oder durch einen spezifischen Defekt nicht mehr ausreichend adhären können. *galE*- sowie *galEK*-Mutanten konnten dagegen den Dünndarm besiedeln. Damit wurde zum einen gezeigt, daß in diesem Tiermodell die Galaktosesensitivität bzw. die Unfähigkeit der diversen *gal*-Mutanten, Galaktose zu verstoffwechseln, die Kolonisierung nicht beeinträchtigt. Zum anderen deutet dieses Ergebnis auch an, daß keine galaktosehaltigen Oberflächenstrukturen an der Kolonisierung beteiligt sind, da *galEK*-Mutanten nicht mehr in der Lage sein sollten UDP-Galaktose zu bilden (Abb. 22 B).

7.2. Außenmembranintegrität von LPS und *gal*-Mutanten

LPS ist ein Hauptbestandteil der asymmetrischen Lipiddoppelschicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und ist an der Stabilität und Funktionalität der AM beteiligt (159). Mutationen, die die Struktur des Kernoligosaccharides verändern, können unter Umständen z.B. die Sekretion und Aktivität extrazellulärer Proteine beeinflussen (13, 143, 223). Auch die korrekte Faltung von AM-Proteinen und Oberflächenstrukturen (Flagelle, Pili) ist in manchen LPS-Mutanten nicht mehr gewährleistet (46, 187). Um Hinweise zu erhalten, ob die Mutationen in den *V. cholerae* LPS- und *gal*-Mutanten solche pleiotropen Effekte hervorgerufen hatten, die eventuell auch die Kolonisierungsdefekte erklären würden, wurden „in vitro“ verschiedene Parameter untersucht.

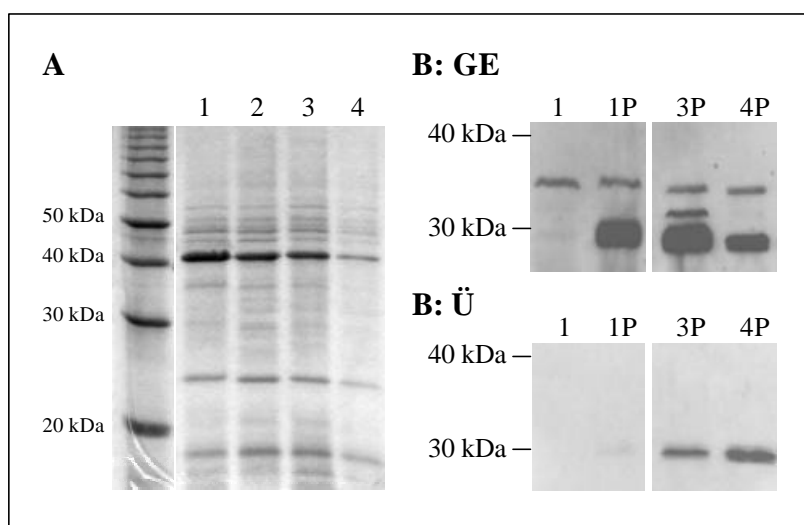


Abb. 23: **Zusammensetzung der AM-Proteine und Membranintegrität von LPS-Mutanten.**

A. Auftrennung der AM-Proteine in einem 12%igen PAA-Gel durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung.

B. Immunodetektion von BlaM in Westernblotanalysen (15%iges Gel). Methode vgl. III 6.8. GE: Gesamtzellextrakt, Ü: Überstand. Die Zellsuspensionen wurden auf dieselbe OD_{600} eingestellt.

1: P27459; 2: P27459 Δ *wbeW*; 3: P27459res29; 4: P27459res118. P: Stämme enthielten Plasmid pBR322.

Zunächst wurde die Zusammensetzung der AM-Proteine von Wt und LPS-Mutanten analysiert (vgl. III 6.7.). Nach Auftrennung der Proteine in einem eindimensionalen Gel und Coomassiefärbung konnten keine offensichtlichen Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der AM detektiert werden (Abb. 23 A), auch nicht, nachdem das Gel mit Silber nachgefärbt wurde (Daten nicht gezeigt). Allerdings war in der R-LPS Mutante (P27459res118, Abb. 23 A, Spur 4) die Konzentration aller Proteine geringer. Dies ist häufig ein Kennzeichen für sogenannte tiefrauhe Mutanten (214). Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Präparation der AM-Proteine in dieser Mutante ineffektiv war (Präparation erfolgte 2 x unabhängig). Die Motilität war in keiner der untersuchten Mutanten beeinträchtigt, was für eine intakte Ausbildung der Flagelle spricht (Tab. 10). Die Synthese funktioneller TCP Pili, die essentiell für die Kolonisierung des Dünndarms sind (208), wurde durch Phagentransduktionsexperimente überprüft. Der filamentöse Phage CTX-Km Φ , eine Km^f transduzierende Mutante des Cholera-toxinphagen, nutzt diesen Pilus als Rezeptor. Der Wt sowie die LPS- und Gal-Mutanten konnten mit der gleichen Frequenz mit diesem Phagen infiziert werden (Tab. 10). Dies spricht dafür, daß in den Mutanten zumindest in Bezug auf die Phageninfektion funktionsfähige Pili ausgebildet werden können.

Stamm	LPS-Struktur	CTX-Km Φ -Transduktion ¹⁾	CT ²⁾	HAP ³⁾	Motilität ⁴⁾
P27459-S (<i>lacZ</i> ⁺)	Wt	+	+	+	+
P27459res30	O-Antigen ⁻	+	+	+	n.d. ⁵⁾
P27459 Δ <i>wbeW</i>	O-Antigen ⁻	+	+	+	+
P27459res144	O-Antigen ^{ver 6)}	+	+	+	n.d.
P27459res118 (R-LPS)	O-Antigen ⁻ , Kern ^{ver 7)}	+	+	+	n.d.
P27459res29	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	+	+	+	+
P27459 <i>galU</i>	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	+	+	+	+
P27459 Δ <i>galE::cm</i>	Wt	+	+	+	n.d.
P27459 Δ <i>galK</i> Δ <i>galE::cm</i>	Wt	+	+	+	n.d.
P27459 Δ <i>toxR</i> ⁸⁾	Wt	-	-	n.d.	n.d.

Tabelle 10: **Charakterisierung von Virulenzdeterminanten in LPS- und Gal-Mutanten.** 1) Die Stämme wurden unter induzierenden Bedingungen in AKI-Medium (III 3.) angezogen. Die Phagentransduktionsexperimente (III 4.4.4.) wurden 3 x unabhängig durchgeführt. Die Frequenz an Km^f-Stämmen betrug zwischen 10⁻⁴ und 10⁻⁵, mit keinen signifikanten Unterschieden zwischen Wt und den untersuchten LPS- und Gal-Mutanten. 2) Die Konzentration an CT im Kulturüberstand wurde von denselben Kulturen, die für die CTX Φ -Phagentransduktion eingesetzt worden waren, zweimal unabhängig im G_{M1}-ELISA gemessen (III 6.6.). Die Konzentrationen betragen zwischen 0,5 und 2 μ g x ml⁻¹/OD₆₀₀ mit keinen signifikanten Unterschieden zwischen Wt und den untersuchten LPS- und Gal-Mutanten. 3) Die Aktivität der HA-Protease im Kulturüberstand wurde auf LB-Platten mit 1 % Milchpulver als klarer Hof um die Kolonien detektiert. 4) Die Motilität wurde in Schwarmagarplatten überprüft (III 7.1.). 5) n.d.: Nicht getestet. 6) verändertes O-Antigen. 7) verändertes Kernoligosaccharid. 8) Eine *toxR*-Mutante kann weder das Cholera-toxin noch die TCP-Pili exprimieren. Deshalb wurde *toxR* im Stamm P27459 inaktiviert (vgl. III 4.1.) und diese Mutante als Kontrolle verwendet.

Das Cholera-toxin und weitere extrazelluläre Proteine, wie z.B. die HA-Protease, werden über das TypII-Sekretionssystem EPS in das extrazelluläre Milieu sekretiert (181). Um die Funktionsfähigkeit des EPS-Systems zu überprüfen, wurde die Konzentration an CT und die Aktivität der HAP im Kulturüberstand bestimmt. Diese Untersuchungen ergaben vergleichbare Mengen an CT im Überstand von Wt, LPS- und Gal-Mutanten (Tab. 10). In allen untersuchten Stämmen konnte zudem aktive HA-Protease nachgewiesen werden (Tab. 10). Allerdings bestand die Möglichkeit, daß die Proteine aufgrund einer instabilen AM nicht aktiv nach außen transportiert wurden, sondern einfach aus dem Periplasma nach außen diffundiert waren. Deshalb wurde in Mutanten mit einer veränderten Kernoligosaccharid-Struktur (P27459res118 und P27459res29) zusätzlich die Lokalisation des periplasmatischen Proteins β -Lactamase (BlaM) untersucht. Dazu wurde das Plasmid pBR322, das u.a. für BlaM kodiert, in den Wt und die LPS-Mutanten transformiert. Aus früh stationären Kulturen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und die Proteine aus dem Kulturüberstand gefällt (vgl. III 6.8.). Anschließend wurde in Westernblot-Analysen das Protein BlaM mit einem polyklonalen Antiserum (Tab. 1) detektiert.

BlaM war im Überstand (Abb. 23 B: Ü) des Wt nur in einer äußerst geringen (Spur 1P), in der *galU*-Mutante in einer leicht erhöhten (Spur 3P) und in der R-LPS-Mutante in einer erhöhten Konzentration (Spur 4P) nachzuweisen. In den zellulären Fraktionen (Abb. 23: GE) waren in Wt (Spur 1P) und in der *galU*-Mutante P27459res29 (Spur 3P) die Konzentration an BlaM in etwa vergleichbar. In der R-LPS-Mutante (Spur 4P) war zellulär weniger BlaM zu detektieren, was mit der Zunahme im Überstand korrelierte. Mit verfügbaren Methoden (visuelle Beobachtung des Wachstums in der Suspension, Nachweis des cytoplasmatischen Proteins β -Galaktosidase im Überstand) wurde bisher kein Hinweis gefunden, daß das Vorhandensein von BlaM im Überstand auf eine verstärkte Lyse der Zellen zurückzuführen ist. Die präsentierten Ergebnisse deuten an, daß in *galU*- und hauptsächlich in R-LPS-Mutanten Proteine auch durch passive Diffusion in das extrazelluläre Milieu gelangen können.

7.3. Sensitivität gegenüber anionischen hydrophoben Substanzen und organischen Säuren

Die freie Diffusion hydrophober Substanzen mit geladenen Gruppen über die AM Gram-negativer Bakterien, deren Lipiddoppelschicht aus LPS und Phospholipiden besteht, wird effektiv durch den LPS-Kernoligosaccharid-Anteil vermindert (159). Solche Substanzen, z.B. Gallensäuren, kommen auch im menschlichen Darmtrakt vor. Die Konzentration an Gallensäuren hängt dabei vom Ernährungsstatus des Menschen ab, wird aber durchschnittlich auf ungefähr 1 % geschätzt (95). Die Resistenz von *V. cholerae* gegenüber Gallensäuren kann relativ einfach auf TCBS-Platten, dem Selektivmedium für *Vibrio* Spezies, überprüft werden. Diese Platten enthalten neben Thiosulfat, Citrat und Saccharose auch 0,8 % Gallensalze. Wie in Abb. 24 zu erkennen ist, konnten LPS-Mutanten mit einem veränderten Kernoligosaccharid (spontane *galU*-Mutante P27459res29 und spontane R-LPS-Mutante P27459res118) nicht mehr auf diesem Medium wachsen. Die *galU*-Mutante konnte gut auf denselben Platten ohne

Gallensalze wachsen, während die R-LPS-Mutante auch auf diesem Medium ein Wachstumsdefizit zeigte. In Anwesenheit des Komplementationsplasmides pACYCgalU war die spontane galU-Mutante P27459res29 wieder in der Lage in Gegenwart von Gallensalzen zu wachsen. O-Antigen negative Stämme, sowie galE-Mutanten besaßen dagegen keinen Wachstumsdefekt auf TCBS-Platten.

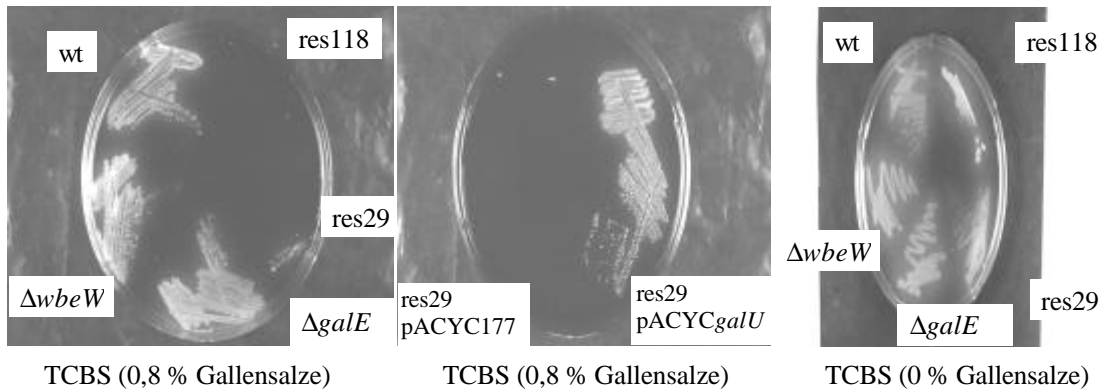


Abb. 24: Wachstumsverhalten des Wt sowie der LPS- und Gal-Mutanten in Gegenwart von Gallensäuren. Die Stämme wurden auf TCBS-Platten mit den angegebenen Konzentrationen an Gallensalzen ausgestrichen.

Stamm	LPS-Struktur	MHK Novobiocin	MHK SDS
P27459-S (<i>lacZ</i> ⁺)	Wt	0,75	300
P27459res30	O-Antigen ⁻	0,75	300
P27459Δ <i>wbeW</i>	O-Antigen ⁻	0,75	300
P27459res144	O-Antigen ^{ver}	0,75	300
P27459res118 (R-LPS)	O-Antigen ⁻ , Kern ^{ver 1)}	0,047	150
P27459res29	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	0,187	150
P27459res29/pACYC177	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	0,187	150
P27459res29/pACYCgalU	Wt	0,75	300
P27459galU	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	0,187	150
P27459galU/pTrcAkan	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	0,187	150
P27459galU/pACYCgalU	Wt	0,75	300
P27459Δ <i>galE::cm</i>	Wt	0,75	300
P27459 Δ <i>galKΔgalE::cm</i>	Wt	0,75	300

Tabelle 11: Sensitivität der LPS- und Gal-Mutanten gegenüber anionischen hydrophoben Agentien. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Novobiocin bzw. SDS in μg/ml wurde dreimal unabhängig durchgeführt (III 4.5.). 1) Kern^{ver}: verändertes Kernoligosaccharid.

Dies war nun der erste Hinweis, daß galU (O-Antigen⁺, veränderter Kern) und R-LPS-Mutanten (O-Antigen⁻, veränderter Kern) sensitiver gegenüber anionischen Detergentien sind als der Wt und O-Antigen negative Mutanten. Dieses Ergebnis konnte noch durch Untersuchung weiterer hydrophober Substanzen mit geladenen Gruppen (SDS, Novobiocin) bestätigt werden.

Wie aus Tab. 11 ersichtlich ist, war ausschließlich bei Mutanten mit verändertem LPS-Kernoligosaccharid (*galU*, R-LPS) die minimale Hemmkonzentration (MHK) dieser Substanzen niedriger. In Anwesenheit des *galU*-exprimierenden Plasmides konnte dieser Defekt aufgehoben werden. O-Antigen negative Stämme, der Stamm mit verändertem O-Antigen sowie *galE*- und *galEK*-Mutanten waren dagegen genauso resistent gegenüber diesen Substanzen wie der Wt.

Schwache kurzkettige organische Säuren kommen ebenfalls in hoher Konzentration im menschlichen Darm vor (42). Bei physiologischem pH liegen sie in der anionischen Form vor, während sie im sauren pH-Bereich protoniert sind und ins Cytoplasma Gram-negativer Bakterien diffundieren können. Abhängig vom intrazellulären pH wird das Proton abgespalten, was zur Ansäuerung des intrazellulären pH führen kann. Andererseits kann die anionische Form der kurzkettigen Säuren, die nun nicht mehr nach außen diffundieren kann, intrazellulär akkumulieren. Dies ist für die Zelle schädlich, da es zur Erhöhung des osmotischen Druckes kommt (66, 176). Erst kürzlich wurde gezeigt, daß sich *V. cholerae* O1 El Tor Stämme durch induzierbare Mechanismen gegenüber solchen organischen Säuren schützen können. Diese als ATR („acid tolerance response“) bezeichnete Antwort wird im sauren Milieu (z.B. in vitro LB pH < 6) induziert (142).

Die Überlebensfähigkeit der 3 verschiedenen LPS-Mutanten in Gegenwart von Essig-, Propan- und Butansäure wurde „in vitro“ getestet. Es wurden dabei Bedingungen gewählt, unter denen die Säuren vermutlich vollständig protoniert vorlagen (pH 4,4) und die Zellen wahrscheinlich keine ATR-Systeme angeschaltet hatten (Wachstum vor dem Säureschock in LB pH 7 = nichtadaptierte Zellen). Unter diesen Bedingungen konnte auch der Wt-Stamm nicht besonders gut überleben (Abb. 25), allerdings wurden bei der *galU*-Mutante nach 1 h Inkubation in LB pH 4,4 (8,7 mM Essigsäure, 2,5 mM Butansäure, 3,7 mM Propionsäure) ungefähr 75fach weniger und in der R-LPS-Mutante keine überlebenden Zellen gefunden, während sich der O-Antigen negative Stamm wie der Wt verhielt.

Wurden die Stämme vor dem Schock mit organischen Säuren für 1 h in LB pH 5,7 adaptiert (= Anschalten der ATR-Mechanismen), so überlebten nach 1 h alle Zellen des Wt und der Mutanten, nach etwa 2 h waren aber bei der R-LPS Mutante ungefähr 50fach weniger überlebende Zellen zu finden. Wurden die Stämme nur in LB pH 4,4 (ohne organische Säuren) geschockt, unterschied sich die Überlebensfähigkeit der Mutanten nicht vom Wt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten an, daß eine intakte LPS Kernoligosaccharid-Region, unabhängig von den induzierbaren ATR-Mechanismen, wichtig für einen ausreichenden Schutz gegen schwache kurzkettige organische Säuren ist.

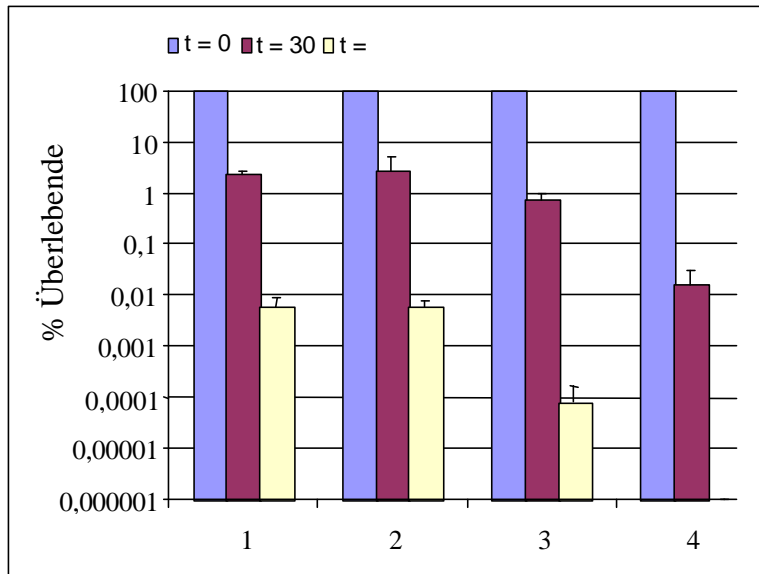


Abb. 25: **Überleben des Wt und der LPS-Mutanten in Gegenwart von kurzkettigen organischen Säuren.** Die Stämme wurden in LB pH7 angezogen und dann für 30 Min bzw. 1 h in LB pH 4,4 mit 8,7 mM Essigsäure, 2,5 mM Butansäure und 3,7 mM Propionsäure inkubiert. Pro Experiment wurden ungefähr 10^9 CFU/ml eingesetzt. Der prozentuale Anteil überlebender Zellen wurde errechnet, indem die Zellzahl in Bezug zu den eingesetzten Zellen zum Zeit-punkt t=0 (vor dem Schock) gesetzt wurden. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. 1: P27459; 2: P27459 Δ wbeW; 3: P27459res29; 4: P27459res118.

7.4. Überleben in Gegenwart von Komponenten des angeborenen Immunsystems

Im menschlichen Darmtrakt kommen noch weitere antimikrobielle Substanzen vor. Darunter auch Komponenten des Komplementsystems und kationische Peptide, die dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben werden. Paneth-Zellen des Dünndarms produzieren mindestens zwei verschiedene Defensine, die kationischen Peptide der Säugetiere (135). Die Wirkungsweise aller kationischen Peptide ist ähnlich: Nach Bindung über elektrostatische Wechselwirkung an negativ geladene Oberflächenstrukturen Gram-negativer Bakterien lagern sich die kationischen Peptide zunächst in die AM ein und zerstören damit deren Integrität. Es wird aber vermutet, daß sie sich danach auch in die IM einlagern und diese damit depolarisieren (54). Das LPS hat in einigen pathogenen Bakterien eine wichtige Funktion für die Resistenz gegenüber diesen Peptiden. Dabei spielt vor allem die Ladung der Kernoligosaccharidregion, die Fettsäure-Zusammensetzung im LipidA-Anteil und die Konzentration an LPS eine wichtige Rolle (80, 81).

Aus diesem Grund wurde die Sensitivität des *V. cholerae* Wt und der LPS- und Gal-Mutanten gegenüber zwei käuflichen kationischen Peptiden durch Bestimmung der MBK getestet (Tab. 12). O-Antigen negative Stämme und der Stamm mit dem veränderten O-Antigen waren sensitiver gegenüber PolymyxinB und Protamine. Bei beiden Substanzen reichte die halbe Konzentration aus um alle Zellen abzutöten, während in Anwesenheit eines Komplementationsplasmides im Δ wbeW-Stamm wieder dieselbe Konzentration an PolymyxinB bzw. Protamine wie im Wt nötig war, damit keine Zellen mehr überleben konnten. Bei Mutanten mit verändertem Kernoligosaccharid waren bei noch deutlich niedrigeren Konzentrationen an kationischen Peptiden keine überlebenden Zellen mehr zu finden. Dabei war die spontane R-LPS Mutante am sensitivsten. *galU*-Mutanten waren in Gegenwart eines *galU*-exprimierenden Plasmides wieder so resistent wie der Wt. *galE*- und *galEK*-Mutanten mit keinem offensichtlichen LPS-Defekt verhielten sich dagegen wie der Ausgangsstamm P27459.

Das C3-Protein, dessen Bindung an mikrobielle Oberflächen die alternative Aktivierung des Komplementsystems einleitet, wird auch von Darmepithelzellen produziert (5). Allgemein wurde für einige Gram-negative Bakterien gezeigt, daß das O-Antigen sowie die Dichte der LPS-Moleküle an der Oberfläche wichtige Faktoren für die Resistenz gegenüber dem alternativen Weg des Komplementsystems darstellen (105). Für *V. cholerae* O1 klassische Stämme ist bekannt, daß O-Antigen negative sowie TCP-Mutanten sensitiv gegenüber dem Komplementsystem werden (34, 164, 219). Die Resistenz des O1 El Tor Wt Stammes P27459 sowie der LPS- und Gal-Mutanten wurde in einem Serumresistenzassay getestet. *galU* Stämme mit veränderter Struktur des Kernoligosaccharides, waren signifikant sensitiver gegenüber dem Komplementsystem (Tab. 12). Dieser Defekt wurde in Gegenwart des Komplementationsplasmides pACYC*galU* wieder aufgehoben. Stämme ohne O-Antigen (R-LPS, O-Antigen negativ) waren nochmal ungefähr 100fach sensitiver als *galU*-Mutanten. Wie Komplementationsstudien zeigten, korrelierte in der $\Delta wbeW$ -Mutante dieser Phänotyp ebenfalls direkt mit der Mutation in *wbeW* (Tab. 12). Der Stamm mit dem veränderten O-Antigen (P27459res144) besaß ebenfalls keinen ausreichenden Schutz mehr gegenüber der bakterioziden Wirkung des Serums, während die *galE*-Mutante ähnlich resistent war wie der Wt.

Stamm	LPS-Struktur	MBK ¹⁾ PolymyxinB	MBK Protamine	Serumresistenz % Überleben ²⁾
P27459-S (<i>lacZ</i> ⁺)	Wt	12,5	337	85 ± 13 (5)
P27459res30	O-Antigen ⁻	6,25	n.d.	0,06 ± 0,1 (3)
P27459 $\Delta wbeW$	O-Antigen ⁻	6,25	168	0,006 ± 0,0056 (2)
P27459 $\Delta wbeW$ /pACYC177	O-Antigen ⁻	6,25	168	0,001 ± 0,0019 (2)
P27459 $\Delta wbeW$ /pJN <i>wbeW</i>	Wt	12,5	337	100 (2)
P27459res144	O-Antigen ^{ver}	6,25	168	0,17 ± 0,29 (3)
P27459res118 (R-LPS)	O-Antigen ⁻ , Kern ^{ver 3)}	0,78	21	0,0003 ± 0,0004 (2)
P27459res29	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	1,56	84	0,6 ± 1 (4)
P27459res29/pACYC177	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	n.d.	n.d.	1,1 ± 1,6 (2)
P27459res29/pACYC <i>galU</i>	Wt	12,5	337	100 (3)
P27459 <i>galU</i>	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	1,56	84	n.d.
P27459 <i>galU</i> /pTrcAkan	O-Antigen ⁺ , Kern ^{ver}	1,56	n.d.	0,21 (1)
P27459 <i>galU</i> /pACYC <i>galU</i>	Wt	12,5	337	100 (3)
P27459 $\Delta galE::cm$	Wt	12,5	337	81 ± 26 (2)
P27459 $\Delta galK\Delta galE::cm$	Wt	12,5	337	n.d.

Tabelle 12: **Resistenz der LPS- und Gal- Mutanten gegenüber kationischen Peptiden und dem Komplementsystem.** 1) Die MBK für die kationischen Peptide Protamine und Polymyxin B in µg/ml wurde dreimal unabhängig bestimmt. 2) Die Stämme wurden für 1 h in 20 % menschlichem Serum und parallel in 20 % hitzeinaktiviertem menschlichem Serum inkubiert. Die Anzahl der überlebenden Zellen in den parallelen Ansätzen wurde durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsreihen bestimmt (III 7.3.). Der prozentuale Anteil überlebender Zellen wurde folgendermaßen berechnet: 100 x CFU nach Inkubation in 20 % Serum / CFU nach Inkubation in 20 % hitzeinaktiviertem Serum. Angegeben ist der Mittelwert aus der Anzahl der in Klammern angegebenen unabhängigen Experimente ± die Standardabweichung. 3) Kern^{ver}: verändertes Kernoligosaccharid.

Diese Studien zeigten, daß beide LPS Substrukturen, O-Antigen und Kernoligosaccharidregion, für einen ausreichenden Schutz gegenüber den untersuchten bakterioziden Substanzen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle spielen. Ein intaktes O-Antigen ist dabei wichtiger für die Resistenz gegenüber dem Komplement, während eine intakte Kernregion wichtiger ist für die Resistenz gegenüber kationischen Peptiden.

7.5. Zusammenfassung über die Virulenzeigenschaften von LPS- und *gal*-Mutanten

galU-Mutanten zeigten ein signifikantes Defizit den Dünndarm von neugeborenen Mäusen zu besiedeln. Der Kolonisierungsdefekt ist definitiv nicht auf die Defekte im Galaktosestoffwechsel zurückzuführen. Es wurden bisher auch keine konkreten Hinweise gefunden, daß *galU*-Mutanten in der Adhärenz beeinträchtigt sein könnten. Die „in vitro“ Assays zeigten aber, daß diese Mutante sensitiver gegenüber im Darm vorkommenden bakterioziden Substanzen ist, was eher darauf schließen läßt, daß die Persistenz dieser Mutanten im Dünndarm unter den harschen Bedingungen herabgesetzt ist. Durch die vergleichenden Analysen mit weiteren LPS-Mutanten (R-LPS, O-Antigen negativ) wurden Hinweise gefunden, daß die Effekte der *galU*-Mutante direkt mit dem Defekt im LPS-Kernoligosaccharid gekoppelt sein könnten. Diese Untersuchungen ergaben weiterhin starke Evidenz, daß R-LPS-Mutanten durch ihr allgemeines Wachstumsdefizit nicht mehr in der Lage sind im Darm zu überleben. Die Mutante mit verändertem O-Antigen verhielt sich tendenziell wie ein O-Antigen negativer Stamm. Es wurde jedoch bisher noch nicht untersucht, ob dieser Stamm „in vivo“ noch kolonisieren kann.

8. Opakvarianten und Biofilmbildung

8.1. Kolonievarianten bilden Biofilme an abiotischen Oberflächen

Unter den spontan phagenresistenten Mutanten befanden sich auch mehrere Opak-Kolonievarianten. *V. cholerae* Opakvarianten von O1 El Tor und O139 Stämmen wurden bereits beschrieben. Die Autoren vermuteten, daß dieser Phänotyp verschiedene Ursachen haben könnte, und gaben als Grund Veränderungen in der Zusammensetzung der AM-Proteine, verändertes LPS und Produktion eines Kapselpolysaccharides an (63). Die Fähigkeit von *V. cholerae* Kolonievarianten zu bilden, ist schon recht lange bekannt, so wurden z.B. 1938 von White Varianten mit einer auffälligen, gekräuselten Koloniemorphologie beschrieben und als Rugose-Varianten bezeichnet (231). Kürzlich wurde für zwei O1 El Tor Kolonievarianten gezeigt, daß die Rugose-Koloniemorphologie mit der konstitutiven Produktion eines Exopolysaccharides (VPS) korreliert, das für die Biofilmbildung essentiell ist (217, 239). Charakteristisch für *V. cholerae* O1 El Tor scheint, daß nicht alle transluzenten Wt-Stämme in der Lage sind, einen Biofilm an abiotischen Oberflächen zu bilden, im Gegensatz zu den Rugose-Varianten, die alle diese Fähigkeit besitzen (227, 239). Die Biofilmbildung von Opakvarianten wurde bisher noch nicht untersucht.

Zunächst wurde geklärt, ob der Wt P27459 und die spontan phagenresistente Opakvariante P27459res105 einen Biofilm an abiotischen Oberflächen bilden können. Nach 48 h Inkubation der Kulturen in Borosilikat-Reagenzgläsern bei RT ohne schütteln, waren bei der Opakvariante dicht gepackte, schwimmende Zellen an der Oberfläche zu erkennen (Abb. 26, 1), während die Zellen des Wt P27459 als Suspension vorlagen (Abb. 26, 2). Nachdem die Kulturen ausgegossen worden waren, konnte man durch Färbung mit Kristallviolett nur in der Opakvariante adhärenente Bakterien nachweisen (Abb. 26, 1). Die Opakvariante ist also im Gegensatz zum Wt in der Lage einen Biofilm an Borosilikatglas zu bilden.

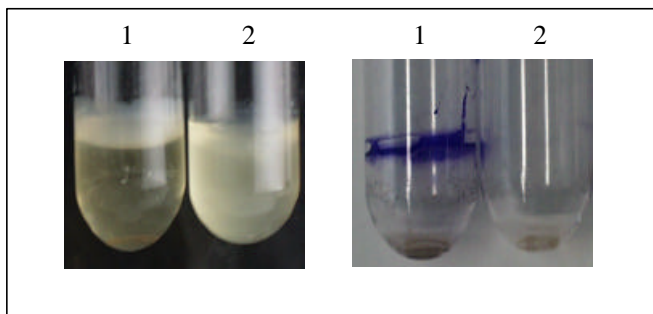


Abb. 26: **Biofilmbildung der Opakvariante an einer abiotischen Oberfläche.** Kulturen wurden für 48 h bei RT inkubiert (links). Nachdem die Kulturen ausgegossen worden waren, wurden die Borosilikatglas-Reagenzgläser mit Kristallviolett gefärbt (rechts). 1: Opakvariante P27459res105; 2: Wt P27459.

Die beiden Stämme wurden noch in weiteren phänotypischen Tests verglichen (Tab. 13). Der Stamm P27459res105 besaß noch HA-Protease-Aktivität. Damit ist es unwahrscheinlich, daß diese Opakvariante eine Mutation in *hapR* besitzt. *hapR*-Mutanten können die HA-Protease nicht mehr effektiv exprimieren, da HapR ein Transkriptionsaktivator für *hap* ist und bilden zudem Rugose-Kolonien (104). Der Stamm P27459res105 unterschied sich auch nicht vom Wt in der Expression der Hauptvirulenzfaktoren CT und TCP und dem Wachstum auf TCBS-Platten, die Gallensalze enthalten. Die Opakvariante war allerdings im Gegensatz zum Wt nicht-motil (Tab. 13). Da einige nichtflagellierte O1 El Tor und O139 Stämme Rugose-Varianten ausbilden (pers. Mitteilung K. Klose (228)), könnte dies eventuell auch die Ursache für die Koloniemorphologie der Opakvariante P27459res105 sein. Allerdings besaß eine von K. Klose zur Verfügung gestellte *flaA*-Mutante (P27459 Δ *flaA::cm*), die keine Flagelle mehr ausbilden kann (119), eine Rugose-Koloniemorphologie, die sich deutlich von der opaken Koloniemorphologie des Stammes P27459res105 unterschied. Die Motilität konnte im Stamm P27459 Δ *flaA* durch ein *flaA*-exprimierendes Plasmid (pKEK89) in trans komplementiert werden, während der Stamm P27459res105/pKEK89 nicht-motil blieb.

Die isolierte spontan phagenresistente Opakvariante P27459res105 besaß eine Koloniemorphologie die sich sowohl vom Wt, als auch von der Rugose-Variante P27459 Δ *flaA::cm* unterschied. Die Opak- und die Rugose-Variante, nicht aber der parentale Wt-Stamm der Mutanten, waren in der Lage einen Biofilm an Borosilikatglas zu bilden. Die Ergebnisse deuten an, daß sowohl die Opak- als auch die Rugose-Varianten konstitutiv das VPS exprimieren.

	P27459 (Wt, transluzent)	P27459res105 (opak)
Motilität	+	-
HAP-Aktivität	+	+
Kongorot-Platten ¹⁾	rote Kolonien	rote Kolonien
Choleratoxin-Export ²⁾	+	+
CTX-Km Φ -Phagentransduktion ³⁾	+	+
TCBS-Platten	+	+

Tabelle 13: **Phänotypischer Vergleich des transluzenten Wt mit einer Opakvariante.** 1) In manchen Bakterien z.B. *Staphylococcus epidermidis* kann man biofilmpositive von biofilmbnegativen Stämmen auf Kongorot-Platten unterscheiden (241). Die beiden *V. cholerae* Stämme konnten auf diesen Platten jedoch nicht unterschieden werden. 2) Die CT-Konzentration im Kulturüberstand wurde im G_{M1}-ELISA (III 6.6.) bestimmt. Die beiden Stämme unterschieden sich in 2 unabhängigen Experimenten nicht signifikant. 3) Die Anzahl der Km^r-Transduktanten pro OD₆₀₀ unterschieden sich in beiden Stämmen in 2 unabhängigen Experimenten nicht signifikant (III 4.4.4.).

8.2. GalE und GalU sind an der Biofilmbildung beteiligt

Aus zwei verschiedenen Rugose-Varianten wurde kürzlich das VPS-Material, das für die Biofilmbildung essentiell ist, isoliert. Wai et al. fanden ein Exopolysaccharid mit der Zusammensetzung N-Acetyl-D-Glukosamin, D-Mannose, 6-Deoxy-D-Galaktose und D-Galaktose (217), während Yildiz und Schoolnik die Monosaccharide Glukose, Galaktose, N-Acetylglukosamin, Mannose und Xylose nachwiesen (239). Da Galaktose in beiden Fällen ein Bestandteil des VPS zu sein scheint, wurde in der Opakvariante *galU* und *galE* inaktiviert (vgl. III 4.1.). Die Stämme P27459res105*galU* und P27459res105 Δ *galE*::*cm* bildeten transluzente Kolonien, die wieder opak wurden in Gegenwart der *galU* bzw. *galE* exprimierenden Plasmide pACYC*galU* und pACYC*galE*. Die *galU*-Mutation wurde auch in die Rugose-Variante P27459 Δ *fla*::*cm* eingeführt. Die *galUflaA*-Doppelmutante bildete ebenfalls transluzente Kolonien, die in Gegenwart des Komplementationsplasmides pACYC*galU* wieder rugose wurden.

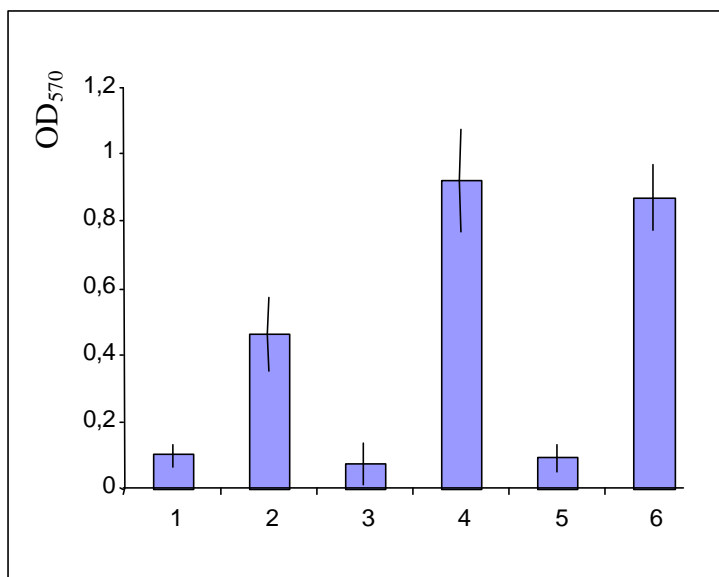


Abb. 27: **Quantitativer Biofilmassay.** Die adhärennten Bakterien wurden mit Kristallviolett gefärbt, das Kristallviolett mit Ethanol/Aceton solubilisiert und die optische Dichte in einem ELISA-Reader gemessen (III 7.5.). Die OD₅₇₀ ist damit proportional zur Anzahl der adhärennten Bakterien. Es wurden pro Stamm jeweils parallel drei Vertiefungen gemessen. Angegeben ist der Mittelwert \pm die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Messungen. 1: P27459; 2: P27459res105; 3: P27459res105*galU**; 4: P27459res105*galU*/pACYC*galU*; 5: P27459res105 Δ *galE*::*cm**; 6: P27459res105 Δ *galE*::*cm*/pACYC*galE*. *Mutanten mit und ohne Kontrollplasmid besaßen ähnliche Werte und wurden nicht extra aufgeführt.

Die Biofilmbildung der *galE*- und *galU*-Mutanten der Opakvariante wurde in einem quantitativen Biofilmmassay in Polystyrene-Mikrotiterplatten untersucht. Wie in Abb. 27 zu erkennen ist, waren *galE*- und *galU*- Mutanten des Stammes P27459res105 nicht mehr in der Lage einen Biofilm an Polystyrene zu bilden (3, 5). In Gegenwart der Komplementationsplasmide, aber nicht der Kontrollplasmide war die Biofilmbildung wieder möglich (4, 6). Damit konnte gezeigt werden, daß GalU und GalE für die Biofilmbildung an abiotischen Materialien essentiell sind. Die Ergebnisse deuten an, daß die Bildung von UDP-Galaktose via UDP-Glukose für die Synthese des Exopolysaccharides VPS und damit auch für die Biofilmbildung essentiell ist (Abb. 22 B).

8.3. Opakvarianten und K139.cm9 Phageninfektion

Die spontan phagenresistente Opakvariante P27459res105 exprimierte das O-Antigen und das gereinigte LPS konnte in Plaqueinhibitions-Studien mit dem Phagen K139.cm9 interagieren (Kap. IV 1.). Um zu klären, warum die Opakvariante phagenresistent ist, wurden die Stämme P27459 (Wt), P27459 $\Delta galE::cm$ (transluzent), P27459res105 (opak), P27459res105 $\Delta galE$ (transluzent) und P27459res105 $\Delta galE::cm/pACYCgalE$ (opak) zunächst im Kreuzstrich gegen den lytischen Phagen getestet. Die transluzenten Stämme P27459, P27459 $\Delta galE::cm$, und P27459res105 $\Delta galE::cm$ waren im Kreuzstrich phagensensitiv, während die Opakvarianten P27459res105 und P27459res105 $\Delta galE::cm/pACYCgalE$ resistent waren. Dies konnte auch durch Auftropfen eines hochtitrigen K139.cm9-Lysates (ca. 10^8 pfu/ml) auf den Zellrasen der entsprechenden Stämme bestätigt werden. Die Plaquebildung war in Opakvarianten, im Gegensatz zu den untersuchten transluzenten Stämmen, deutlich eingeschränkt. Allerdings wurde die Plaquebildung nicht, wie in einem parallel untersuchten O-Antigen negativen Stamm, komplett verhindert.

Die Daten deuten an, daß in der Opakvariante das VPS konstitutiv exprimiert wird und dadurch die Zugänglichkeit des Phagen K139 an seinen Rezeptor, das O-Antigen, herabgesetzt ist. Die Infektion des filamentösen Phagen CTX Φ war dagegen in der Opakvariante nicht beeinträchtigt (Kap. IV 8.1., Tab. 13).

