

**Identifizierung und Charakterisierung  
von Virulenzfaktoren bei  
*Burkholderia pseudomallei***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biochemikerin Beate Fehlhaber  
geboren am 4. Juli 1967 in Uelzen

2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis Dezember 2002 im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (Leitung: Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Referent: Professor Dr. Walter H. Müller

Koreferent: PD Dr. Ivo Steinmetz

Tag der Prüfung: 11.12.2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2. Summary</b> .....	2
<b>3. Einleitung</b> .....	3
3.1 Die Melioidose, eine Krankheit des tropischen Asiens.....	3
3.2 <i>Burkholderia pseudomallei</i> , der Erreger der Melioidose .....	5
3.3 Virulenzfaktoren und –mechanismen von <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	7
3.4 Die Bedeutung der systematischen Analyse bakterieller Genome.....	10
3.5 Der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> als Infektionsmodell.....	12
3.6 Zielsetzung.....	15
<b>4. Experimenteller Teil</b> .....	16
<b>4.1 Materialien</b> .....	16
4.1.1 Bakterienstämme .....	16
4.1.2 Medien für die Bakterienanzucht .....	16
4.1.3 Puffer und Lösungen .....	17
4.1.4 Molekularbiologische Fertigprodukte .....	18
4.1.5 Enzyme und Molekulargewichtsstandards.....	18
4.1.6 Oligonukleotide .....	18
4.1.7 Vektoren.....	18
4.1.8 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	19
4.1.9 Medien und Puffer für Arbeiten mit <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	19
4.1.10 Mäuse .....	19
4.1.11 Gebrauchsmaterialien .....	19
4.1.12 Geräte .....	20
4.1.11 Software.....	20
<b>4.2 Methoden</b> .....	21
4.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	21
4.2.1.1 Anzucht von Bakterien .....	21
4.2.1.2 Bestimmung von Wachstumskurven .....	21
4.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Bakteriensuspensionen.....	21
4.2.1.4 Bestimmung der KoloniegroÙe von Bakterien.....	21
4.2.1.5 Einfrieren und Entsorgen von Bakterien .....	22
4.2.1.6 Identifizierung von Bakterien durch das API-System .....	22
4.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	22
4.2.2.1 Präparation genomischer DNA.....	22
4.2.2.2 Agarosegelelektrophorese.....	22
4.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	23
4.2.2.4 Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren.....	23
4.2.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren.....	23
4.2.2.6 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren .....	24
4.2.2.7 Ligation von Nukleinsäuren .....	24
4.2.2.8 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ - und SM10-Zellen.....	24
4.2.2.9 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ - und SM10-Zellen .....	25
4.2.2.10 Midi-Plasmidpräparation.....	25
4.2.2.11 Quick & Dirty-Plasmidpräparation.....	26
4.2.2.12 Herstellung einer Cosmid-Genbank.....	26
4.2.2.13 Herstellung einer digoxigeninmarkierten DNA-Sonde.....	27
4.2.2.14 Durchführung eines Colony Blot .....	27
4.2.2.15 Southern Blot .....	28
4.2.2.16 Transposonmutagenese mit Tn5-OT182.....	29

4.2.2.17	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	29
4.2.2.18	Selbstklonierung von Transposonmutanten.....	30
4.2.2.19	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	31
4.2.2.20	Identifizierung des zerstörten Gens .....	31
4.2.2.21	<i>In trans</i> -Komplementation von Transposonmutanten .....	31
4.2.3	Arbeiten mit <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	32
4.2.3.1	Kulturerhaltung von <i>C. elegans</i> .....	32
4.2.3.2	Eipräparation zum Erhalt von synchronisierten Kulturen .....	32
4.2.3.3	Bestimmung von Sterbekinetiken von <i>C. elegans</i> durch <i>B. pseudomallei</i> .....	32
4.2.3.4	Screening von Transposonmutanten im <i>C. elegans</i> -Modell.....	33
4.2.3.5	Durchführung des Filter-Assays .....	33
4.2.3.6	Experimente zur Detektion des <i>B. pseudomallei</i> Exotoxins .....	33
4.2.4	Untersuchungen zur Virulenz von <i>B. pseudomallei</i> in der Maus .....	34
4.2.4.1	Infektion von Balb/c- und C57BL/6-Mäusen .....	34
4.2.4.2	Keimzahlbestimmung in infizierten Mäusen.....	34
4.2.5	Biochemische Methoden .....	35
4.2.5.1	Nachweis der Cyanidproduktion von Bakterien .....	35
4.2.5.2	Nachweis von Phospholipase im NPPC-Assay .....	35
4.2.5.3	Biochemisch-funktionelle Screening-Assays für Transposonmutanten.....	35
4.2.5.4	Präparation von Überständen und zellulären Extrakten für die 2D-gelelektrophoretische Proteinanalyse .....	36
4.2.5.5	Durchführung der 2D-gelelektrophoretischen Proteinanalyse.....	37
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
5.1	Transposonmutagenese des Genoms von <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	38
5.2	Biochemisch-funktionelles Screening der Mutantenbank.....	39
5.3	<i>In vivo</i> -Virulenzscreening der Mutanten im <i>C. elegans</i> -Assay .....	40
5.4	Identifizierung von potentiell virulenzreduzierten Mutanten.....	40
<b>5.5</b>	<b>Charakterisierung von Mutanten mit reduzierter Virulenz gegenüber <i>C. elegans</i></b> .....	<b>42</b>
5.5.1	Untersuchungen mit der Mutante P7:80 im <i>C. elegans</i> -Assay .....	42
5.5.1.1	Sterbeverhalten von <i>C. elegans</i> unter fast killing-Bedingungen mit P7:80 .....	42
5.5.1.2	Exotoxinproduktion von E8 WT im Filter-Assay .....	42
5.5.1.3	Exotoxinproduktion der Mutante P7:80.....	43
5.5.1.4	Untersuchungen zur Identität des Exotoxins.....	44
5.5.1.5	Sterbeverhalten von <i>C. elegans</i> im modifizierten fast killing-Assay und im slow killing-Assay mit P7:80 .....	45
5.5.1.6	Untersuchung zur Exotoxinproduktion unter slow killing-Bedingungen .....	45
5.5.2	Charakterisierung des Wachstumverhaltens von P7:80 .....	46
5.5.3	<i>In vivo</i> -Charakterisierung von P7:80 im Mausmodell .....	47
5.5.4	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante P7:80 .....	50
5.5.5	Komplementation von <i>stramp</i> in P7:80.....	53
5.5.6	Proteomanalyse von P7:80 .....	55
5.5.7	Untersuchungen mit der Mutante P10:21 im <i>C. elegans</i> -Assay .....	57
5.5.8	<i>In vivo</i> -Charakterisierung von P10:21 im Mausmodell .....	58
5.5.9	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante P10:21 .....	58
<b>5.6</b>	<b>Charakterisierung von motilitätsdefizienten Mutanten</b> .....	<b>59</b>
5.6.1	Untersuchungen mit der Mutante 102 im Motilitäts-Assay .....	59
5.6.2	<i>In vivo</i> -Charakterisierung der Mutante 102 im Mausmodell .....	60
5.6.3	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante 102 .....	62

5.6.4	Komplementation des Flagellins <i>fliC</i> der Mutante 102 .....	62
5.6.5	Untersuchungen mit den Mutanten P5:28 und P5:81 im Motilitäts-Assay .....	64
5.6.6	<i>In vivo</i> -Charakterisierung von P5:28 und P5:81 im Mausmodell .....	64
5.6.7	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutanten P5:28 und P5:81 .....	66
<b>5.7</b>	<b>Charakterisierung einer Mutante mit Defekt in der Sekretion von Lecithinase und Chitinase</b> .....	<b>67</b>
5.7.1	Untersuchungen mit der Mutante F12 im Lecithinase- und Chitinase-Assay .....	67
5.7.2	<i>In vivo</i> -Charakterisierung von F12 im Mausmodell .....	68
5.7.3	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante F12 .....	68
<b>5.8</b>	<b>Charakterisierung von Mutanten mit einem Defekt in der Synthese von Polyhydroxyalkanoaten</b> .....	<b>69</b>
5.8.1	Untersuchung der Mutanten P3:89 und P8:45 im Färbe-Assay .....	69
5.8.2	<i>In vivo</i> -Charakterisierung von P3:89 und P8:45 im Mausmodell .....	69
5.8.3	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutanten P3:89 und P8:45 .....	70
<b>5.9</b>	<b>Darstellung einer Cosmid-Genbank des Genoms von <i>B. pseudomallei</i></b> .....	<b>71</b>
5.9.1	Herstellung einer Cosmid-Genbank von <i>B. pseudomallei</i> E8 in <i>E. coli</i> .....	71
5.9.2	Bestimmung der Qualität der Cosmid-Genbank .....	71
<b>6. Diskussion</b>	.....	<b>73</b>
6.1	Transposonmutagenese des Genoms von <i>B. pseudomallei</i> zur Identifikation virulenzreduzierter Mutanten .....	73
6.2	<i>C. elegans</i> als Tiermodell zum Screening bakterieller Mutanten .....	74
6.3	Im <i>C. elegans</i> -Assay auffällige Mutanten sind auch im Mausmodell virulenzreduziert .....	75
6.4	Der Virulenzfaktor STRAMP ist eine membranständige Protease .....	77
6.5	Unbewegliche Mutanten bewirken keine wesentliche Virulenzreduktion .....	80
6.6	Ein Defekt im Typ-II-Sekretionsapparat verhindert die Sekretion von Enzymen .....	81
6.7	Ein Defekt in der Synthese von Polyhydroxyalkanoaten ist von Bedeutung für die Virulenz von <i>B. pseudomallei</i> .....	83
6.8	Ausblick .....	83
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	.....	<b>85</b>
<b>8. Anhang</b>	.....	<b>94</b>
8.1	Nukleotidsequenzen der gestörten Gene von <i>B. pseudomallei</i> -Mutanten .....	94
8.1.1	Mutante P7:80 .....	95
8.1.2	Mutante P10:21 .....	96
8.1.3	Mutante 102 .....	97
8.1.4	Mutante P5:28 .....	98
8.1.5	Mutante P5:81 .....	99
8.1.6	Mutante F12 .....	100
8.1.7	Mutanten P3:89 und P8:45 .....	101
Danksagungen	.....	102
Publikationsliste	.....	103
Lebenslauf	.....	104
Eidesstattliche Erklärung	.....	105

## Abkürzungsverzeichnis

- Abb.           Abbildung
- AP             Alkalische Phosphatase
- AS             Aminosäure
- BHI            Brain heart infusion
- Bp             Basenpaare
- BSA            Rinderserumalbumin
- CAS            Chrome Azurol S
- CHAPS         (3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat)
- CIAP          Calf intestinal alkaline phosphatase
- CSPD          3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)-phenylphosphat-dinatriumsalz
- DIG            Digoxigenin
- DMSO          Dimethylsulfoxid
- DNA           Desoxyribonukleinsäure
- dNTP          Desoxynukleosidtriphosphat
- DTT            1,4-Dithiothreitol
- EDTA          Ethyldiamintetraessigsäure
- ELISA         Enzyme-linked immunosorbent assay
- EPS            Exopolysaccharid
- EtOH          Ethanol
- g              Mittlere Erdbeschleunigung; 9.81 m/s<sup>2</sup>
- h              Stunde(n)
- HDTMA         Hexadecyltrimethylammoniumbromid
- IPG            Immobilized pH gradient gel
- kb             Kilobasen
- KDO           2-Keto-3-desoxy-D-manno-octulosonsäure
- LB             Luria Bertani (Medium)
- LBB            Luria Bertani Bouillon
- LPS            Lipopolysaccharid
- M              Molar
- min           Minute(n)
- MALDI         Matrix-assisted laser desorption ionisation
- MOPS          Morpholinopropansulfonsäure
- NC             Nitrocellulose
- NPL            Nasal-pharyngiale Lavage
- NPPC          *p*-Nitrophenylphosphorylcholin
- OD            Optische Dichte
- ORF           Offenes Leseraster (*open reading frame*)
- PBS            Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
- PCR           Polymerasekettenreaktion
- PFGE          Pulsfeldgelelektrophorese
- PIPES         1,4-Piperazinediethansulfonsäure
- RNA           Ribonukleinsäure
- s              Sekunde(n)
- SDS            Natriumdodecylsulfat
- SSC            Natriumchlorid/Trinatrium-Citrat-Puffer
- STRAMP       Ste24-ähnliche Transmembranmetalloprotease
- *stramp*       STRAMP-kodierendes Gen
- Taq            *Thermus aquaticus*
- TBE            Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
- TCA            Trichloressigsäure
- Tris           Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
- U              Unit
- ÜN            Über Nacht
- WT            Wildtyp

## 1. Zusammenfassung

Die Melioidose ist eine Infektionskrankheit tropischer Regionen und wird durch den gram-negativen Bodensaprophyten *Burkholderia pseudomallei* hervorgerufen. Zur Zeit ist weder ein Impfstoff noch eine zuverlässige antibiotische Therapie verfügbar. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Virulenzfaktoren von *B. pseudomallei*. Hierzu wurden Transposonmutanten von *B. pseudomallei* hergestellt, die sowohl mikrobiologisch/biochemischen Screening-Tests unterzogen wurden, als auch in einem Infektionsmodell mit *Caenorhabditis elegans* direkt auf eine Virulenzreduktion hin untersucht wurden. Die molekularbiologische Analyse mutierter Gene führte zur Identifizierung von potentiellen Virulenzfaktoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die verschiedenen Testsysteme acht Transposonmutanten mit einem auffälligen Phänotyp identifiziert und näher charakterisiert. Es wurden drei unbewegliche Mutanten mit Defekten in verschiedenen Genen des Flagellenapparates und eine Mutante mit einem Defekt im Typ-II-Sekretionsapparat identifiziert. Diese Mutanten zeigten im *C. elegans*- und im Mausinfektionsmodell keine bzw. im Fall des Flagellings nur eine minimal reduzierte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp. Zwei weitere Mutanten wiesen Defekte in einem Gencluster auf, der für Enzyme zur Biosynthese von Polyhydroxyalkanoaten kodiert. Das deutlich verlangsamte Versterben der Mäuse nach Infektion mit diesen Mutanten weist auf eine mögliche Rolle von Polyhydroxyalkanoaten im Rahmen der Pathogenese hin. Im *C. elegans*-Screening fielen die Mutanten P7:80 und P10:21 durch eine verzögerte Sterbekinetik der Nematoden auf. Beide Mutanten zeigten auch im Mausinfektionsmodell eine reduzierte Virulenz, wobei die Mutante P7:80 die größte Attenuierung aufwies. Die Infektionsexperimente lassen die Schlußfolgerung zu, daß die LD<sub>50</sub> von P7:80 in Balb/c-Mäusen in etwa um den Faktor 1000 über der des Wildtyps liegt. Während das in der Mutante P10:21 defekte Gen für ein unbekanntes Protein kodiert, wurde in P7:80 als gestörtes Gen *stramp* identifiziert, das für ein neues Mitglied der M48-Peptidasefamilie kodiert. Es handelt sich dabei um eine putative zinkabhängige membranständige Metalloprotease. Das Gen weist eine signifikante Homologie zu Ste24p auf, einer an der geschlechtlichen Fortpflanzung von *Saccharomyces cerevisiae* beteiligten Protease. Erste Vergleiche der Proteinmuster des *B. pseudomallei*-Wildtyps und der Mutante P7:80 mittels 2D-Gelelektrophorese ergaben deutliche Unterschiede in der Expression zahlreicher cytoplasmatischer und sekretorischer Proteine. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche regulatorische Funktion von STRAMP auf die Prozessierung von Virulenzfaktoren durch *B. pseudomallei* hin. Die in dieser Arbeit vorgestellten Resultate belegen, daß ein *in vivo*-Screening-Modell mit dem Nematoden *C. elegans* grundsätzlich geeignet ist, neue Virulenzgene mit Bedeutung für die Pathogenese der Melioidose bei Säugetieren zu detektieren.

Schlagworte: *Burkholderia pseudomallei*, Virulenzfaktor, *Caenorhabditis elegans*

## 2. Abstract

Melioidosis is an infectious disease predominantly occurring in Southeast Asia and is caused by the gram-negative saprophytic soil bacterium *Burkholderia pseudomallei*. To date, neither a vaccine nor an effective antibiotic therapy is available. In this thesis the identification of virulence factors of *B. pseudomallei* is reported. Utilizing transposon mutagenesis, a large pool of mutants was generated and subsequently screened for genes important for the pathogenesis of melioidosis. A variety of assays, in particular an *in vivo* *Caenorhabditis elegans* screening model, and molecular-biological techniques were used to identify and characterize virulence genes.

Eight mutants differing from wild-type *B. pseudomallei* were identified from the pool of transposon mutants. Among these, three non motile mutants having defects in genes related to the flagellar apparatus, and one exhibiting a defect in the type-II secretion system were found. These mutants did not or only slightly, as shown for the flagellin mutant, influence the bacterial virulence, as demonstrated by a practically unchanged survival of mutant-treated *C. elegans* and mice. The genes are thus not considered as virulence factors. Two further mutants were shown to contain the inserted transposon in a gene cluster encoding enzymes involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoates. These mutants caused a considerable increase in the survival of mice suggesting a role of polyhydroxyalkanoates in the pathogenesis of the disease. Finally, the mutants P7:80 and P10:21 causing an attenuated mortality of *C. elegans* were found by *in vivo* screening using the nematode model. A similar effect of these mutants on mortality was found in a mouse model of infection, where P7:80 was significantly less virulent than P10:21, as compared to wild-type bacteria. These data allow for the conclusion that the LD<sub>50</sub> of P7:80 is approximately 1000-fold higher than that of the wildtype. While for the transposon-mutagenized gene of the mutant P10:21 no sequence homology with known genes was found, the putative protein encoded by the defect gene of P7:80 termed *stramp* represents a new member of the M48 family of peptidases. Sequence analysis showed that *stramp* codes for a putative transmembrane and zinc-dependent peptidase with significant homology to Ste24p, a protease involved in the sexual reproduction of *Saccharomyces cerevisiae*. Initial experimental work investigating the protein pattern of cytoplasmic and secreted proteins by 2D gel electrophoresis revealed a significant difference in the protein expression by the mutant P7:80 compared to wild-type *B. pseudomallei*. Accordingly, STRAMP can be assigned a regulatory function for the processing of virulence factors of *B. pseudomallei*. The results reported here prove *C. elegans* to be a suitable animal model for the identification of genes that are linked to the virulence of *B. pseudomallei*, and thus for investigation of the pathogenesis of melioidosis in mammals.

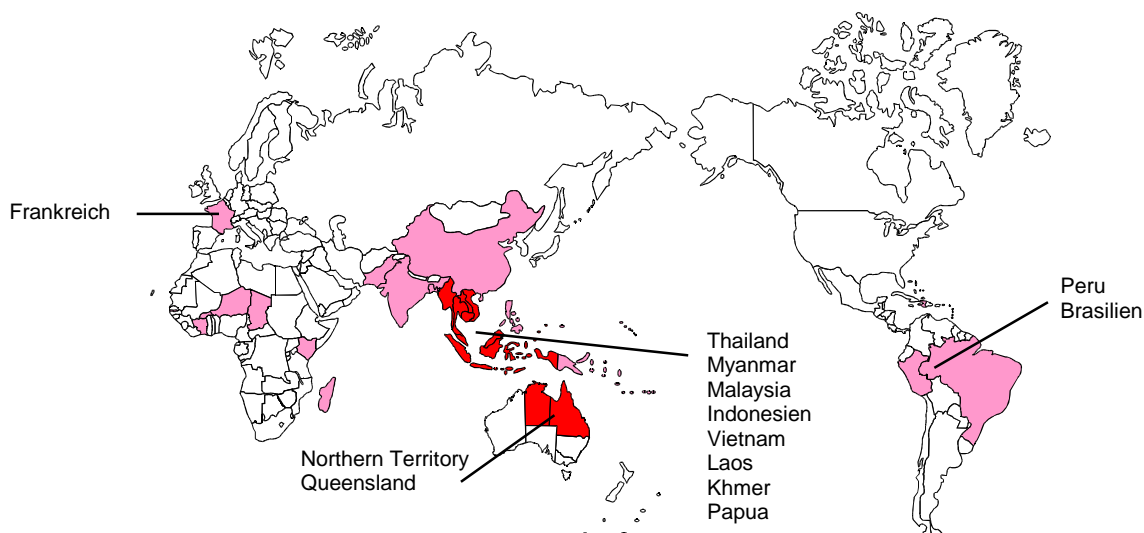
Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, virulence factor, *Caenorhabditis elegans*



### 3. Einleitung

#### 3.1 Die Melioidose, eine Krankheit des tropischen Asiens

Im Jahre 1912 wurde das Auftreten der potentiell tödlichen Infektionskrankheit Melioidose in Myanmar, dem damaligen Burma, von Whitmore und Krishnaswami zum ersten Mal beschrieben [155]. Die Bezeichnung Melioidose wurde 1925 eingeführt und leitet sich von dem griechischen Wort für eine Erkrankung von Pferden mit ähnlicher Symptomatik, dem Rotz (Erreger *Burkholderia mallei*), ab [135]. Seitdem ist über Pathogenese und Epidemiologie relativ wenig bekannt und dementsprechend sind Diagnose und Therapie nur unzureichend untersucht worden. Als Melioidose wird das äußerst vielfältige Krankheitsbild aller Infektionen von Mensch, diversen Säugern und Vögeln zusammengefaßt, das von dem bakteriellen Erreger *Burkholderia pseudomallei* hervorgerufen wird. Die Krankheit wird überwiegend als endemisch in bestimmten tropischen Gebieten Südostasiens beschrieben, muß aber mittlerweile als global auftretendes Gesundheitsproblem angesehen werden. Als Hauptverbreitungsgebiet gelten Thailand, Singapur und Malaysia, aber auch Vietnam, Kambodscha und Indonesien werden genannt [84, 27]. Nach dem zweiten Weltkrieg wurden auch Fälle in den nördlichen Regionen Australiens und in Papua-Neuguinea bekannt [24]. Gegenwärtig werden für Thailand, dem am besten untersuchten Endemiegebiet, jährlich 2000-3000 Fälle klinischer Melioidose bei einer Gesamtbevölkerung von 60 Millionen geschätzt, und eine Inzidenz von 3-5 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern berechnet [84]. In 80% aller thailändischen Kinder bis zum vierten Lebensjahr konnten Antikörper gegen



**Abbildung 1:** Globale Verbreitung der Melioidose. Rot dargestellt sind die vermutlichen Hauptverbreitungsgebiete Südostasiens sowie des nördlichen Australiens. Mit rosa sind Länder markiert, aus denen Fälle infizierter Menschen oder Tiere berichtet wurden, bzw. der Erreger der Melioidose aus dem Boden isoliert werden konnte. Keine farbige Unterlegung schließt ein Vorkommen der Melioidose in den jeweiligen Ländern nicht aus.

*B. pseudomallei* gefunden werden [71]. Einzelne Berichte über humane Erkrankungen, jedoch ohne Angaben einer Inzidenz, liegen u.a. auch für Laos [105], die Philippinen [43], Hongkong [132], China [88], Indien [67] und Fiji [23] vor. Der Nachweis von *B. pseudomallei* in Bodenproben aus Haiti, Brasilien und Peru [44] sowie Berichte über infizierte Tiere in Madagaskar [49], Niger [39], Burkina Faso [35] und der Elfenbeinküste [44] bestätigen ein globales Vorkommen des Erregers.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Melioidose durch die Erkrankung von über 300 Amerikanern während des Vietnamkrieges in den 70er Jahren zuteil [122]. Nur kurze Zeit später bestätigte der Ausbruch der Melioidose im Pariser Zoo die mögliche Ausbreitung der Krankheit auch in gemäßigten klimatischen Zonen. Während der vermutlich durch einen von Mao Tse-tung gestifteten infizierten Pandabären ausgelösten Epidemie erkrankten und verstarben über einen Zeitraum von mehreren Monaten zahlreiche Tiere im 'Jardin des Plantes' [98]. Aktuelles Interesse ruft die Berichterstattung von infizierten Reiserückkehrern aus Ländern wie z.B. Thailand und Nordaustralien hervor [148, 118, 162, 149].

Häufigster Infektionsweg für Mensch und Tier ist die direkte Inokulation von Wunden oder Schleimhäuten durch Schmutz oder Wasser [139]. Die relativ hohe Anzahl von infizierten Hubschrauberbesatzungen während des Vietnamkrieges läßt auch die Übertragung durch Aerosole möglich erscheinen [62]. Obwohl die Melioidose in verschiedenen Tierespezies beschrieben wurde, tritt eine Übertragung von Tier auf Mensch sehr selten auf und eine direkte Ansteckung von Mensch zu Mensch wird in der Literatur nur zweimal erwähnt [77]. Größter Risikofaktor für eine Infektion scheint der arbeitsbedingte Kontakt zu Boden und Wasser, wie etwa bei thailändischen Reisbauern, zu sein, wobei bestehende Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz und Tumore das Risiko erhöhen. Generell sind alle Altersstufen betroffen, wobei ein Häufigkeitsgipfel in der Altersgruppe der 40-60 jährigen auftritt und mehr Männer als Frauen (Verhältnis 3:2) erkranken [139, 19].

Ein großes Problem vor einer möglichen Therapie stellt die meist zeitaufwendige Diagnose dar. Bei Verdacht auf Melioidose erfordert eine sichere Bestätigung der Existenz des Erregers durch kommerziell erhältliche biochemische Fertigprodukte (API 20 NE) in Kombination mit Untersuchungen der Wachstumscharakteristika des Bakteriums etwa zwei Tage [29]. Da eine möglichst frühe Diagnose die Überlebenschancen der Erkrankten erheblich erhöht, stellt die schnelle, wenige Minuten dauernde Identifikation von *Burkholderia pseudomallei* durch Agglutination aufgrund eines monoklonalen an Latexkugeln gebundenen Exopolysaccharid-spezifischen Antikörpers eine signifikante Verbesserung dar [137, 108]. Ebenso haben sich direkte Immunfluoreszenzverfahren für die Schnelldiagnostik bewährt [150].

Das klinische Bild der Melioidose beim Menschen ist extrem vielfältig. Infektionen können akut oder chronisch, lokal oder disseminiert sein, wobei die eine Form der Krankheit in die jeweils andere übergehen kann. Die Mehrheit aller Infektionen scheint subklinisch zu verlaufen, während andere Fälle mit einer schweren Sepsis und hoher Mortalität einhergehen. Im Falle einer lokal beschränkten Melioidose ist die Lunge das am häufigsten befallene

Organ. Das Erscheinungsbild reicht von einer akuten Bronchitis bis hin zur schweren Pneumonie, die mit Tuberkulose verwechselt werden kann. Bei Kindern stellt die akute eitrige Parotitis die häufigste Erscheinungsform der Melioidose dar, wobei bei der lokalisierten Melioidose praktisch jedes Organ befallen werden kann [25, 62, 85, 108]. Typisch sind für diese Krankheit auch die latenten Infektionen, bei denen ein Ausbruch bis zu 26 Jahre nach der Infektion stattfinden kann [95, 20].

Die Therapie der Melioidose erweist sich aufgrund der intrinsischen Resistenz des Erregers gegenüber vielen Antibiotika, insbesondere gegen Aminoglykoside und Penicillin, als sehr problematisch. Ende der 80er Jahre lag die Mortalität trotz Behandlung mit Chloramphenicol, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol bei septischer Melioidose bei etwa 80%. Erst die Einführung des  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums Ceftazidim im Jahre 1989 führte zu einer Halbierung der Todesrate [153]. In den letzten Jahren wurden weitere Antibiotika wie Imipenem hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit untersucht, wobei ebenso Erfolge in der Senkung der Mortalität erreicht wurden. Auch die Rate der Rezidivfälle konnte durch eine langfristige orale Anschlußtherapie erniedrigt werden, doch von einer realisierbaren Heilung aller Erkrankten kann noch nicht gesprochen werden [129, 113, 18].

### 3.2 *Burkholderia pseudomallei*, der Erreger der Melioidose

Im Zuge der Erstbeschreibung der Infektionskrankheit Melioidose im Jahre 1912 [155] wurde auch ihr Erreger in der Literatur erwähnt. Aufgrund der Ähnlichkeit der hervorgerufenen Krankheit mit der Pferdekrankheit Rotz und dessen Erreger *Bacillus mallei* (heute *Burkholderia mallei*) nannte man ihn zunächst *Bacillus pseudomallei* [154]. Als die Erkrankung den Namen Melioidose erhielt, wurde das Bakterium nach seinem Entdecker in *Bacillus whitmori* umbenannt [136]. Nach einiger Verwirrung über die taxonomische Zugehörigkeit des Organismus wurde er in den 80er Jahren der Gattung der Pseudomonaden (rRNA Homologiegruppe II) zugeordnet [102]. Im Jahre 1992 schließlich erfolgte die endgültige Zuordnung dieser Homologiegruppe zur Gattung *Burkholderia* [159].

In den letzten Jahren wurde eine Typisierung von *B. pseudomallei* Stämmen aus 23 Ländern durch Restriktionsspaltung der rRNA-Loci durchgeführt. Dies ergab weltweit 44 Ribotypen, von denen zwei vorherrschen (Typ 1 und Typ 3). Die Analyse der DNA-Makrorestriktionsprofile durch Pulsfeldgelelektrophorese ergab eine sehr hohe Heterogenität selbst innerhalb der dominierenden Ribotypen. Diese Methodik ermöglicht nicht nur eine zuverlässige Unterscheidung einzelner *B. pseudomallei*-Stämme, sondern kann diese auch eindeutig von *Burkholderia thailandensis* abgrenzen [107].

*B. thailandensis* ist ein dem *B. pseudomallei* sehr ähnlicher Organismus, der erst seit 1998 als eigene Spezies betrachtet wird [13]. Der auffälligste Unterschied im biochemischen Profil der beiden Stämme liegt in ihrer Fähigkeit, das Monosaccharid L-Arabinose zu assimilieren. Während *B. pseudomallei* Arabinose-negativ ( $\text{Ara}^-$ ) ist, kann *B. thailandensis* den Zucker assimilieren ( $\text{Ara}^+$ ) [131]. Molekulargenetisch unterscheidet sich *B. thailandensis*

in 15 Nukleotiden der rRNA von *B. pseudomallei*, zusätzlich gibt es einige signifikante Unterschiede im genomischen Makrorestriktionsmuster [16]. Beide Stämme können aus Bodenproben verschiedener Regionen isoliert werden, die Analyse zahlreicher Patientensämme ergab jedoch ausschließlich arabinose-negativen *B. pseudomallei*. Die Hypothese, daß lediglich Ara<sup>-</sup>-*B. pseudomallei* virulent ist und zu einer Infektion beim Menschen führt, wurde schließlich tierexperimentell bestätigt [12, 131, 83].

Die vor wenigen Wochen am Sanger Institut, Cambridge, abgeschlossene Sequenzierung des *B. pseudomallei*-Stammes K96243 hat ergeben, daß das Genom eine Größe von 7.3 Mb hat und der Anteil von Guanin/Cytosin 68% beträgt. Das Genom besteht aus zwei Chromosomen, deren Größe mit 4.1 und 3.2 Mb angegeben wird.

*B. pseudomallei* ist ein gram-negatives Stäbchenbakterium und lebt als saprophytischer Bodenkeim vorwiegend im Erdboden und in Oberflächengewässern [26, 158]. In der Trockenzeit persistiert er vermutlich in festeren Bodenschichten und steigt während der Regenzeit in oberflächennahe Schichten auf [147]. Er ist aerob, beweglich, Oxidase-positiv und vermag Nitrat in Nitrit zu reduzieren [85]. Seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37 °C, wobei ein weiter Bereich von 5-42 °C toleriert wird [158]. Die Tatsache, daß *B. pseudomallei* bis zu drei Jahre in destilliertem Wasser überleben kann, unterstreicht seine Anspruchslosigkeit an die Umwelt [157]. Die Morphologie der einzelnen rund wachsenden Kolonien variiert je nach Stamm von glatt und schleimig bis zu rauh, uneben und faltig. Es gibt eine unterschiedliche Pigmentierung von grau/braun/gelb/weiß bis hin zu metallischem Glanz [17]. Typisch für alle Stämme ist der erdig-süßliche Geruch und die  $\alpha$ -Hämolyse auf Blutagarplatten [4].

*B. pseudomallei* ist ein fakultativ intrazellulärer Organismus mit der Fähigkeit sowohl in Phagozyten als auch in nicht-Phagozyten einzudringen und sich in ihnen zu vermehren [68]. Obwohl die Adhärenz- und Invasionsmechanismen bis heute nicht abschließend aufgeklärt sind, stellen diese Fähigkeiten des Bakteriums eine mögliche Erklärung für das Auftreten von z.T. sehr langen Latenzzeiten (26 Jahre) und einem hohen Anteil an Rückfällen dar. Die Mechanismen, die nach Ruhephasen zu klinischer Symptomatik führen, sind ebenso unbekannt wie das Habitat von *B. pseudomallei* vor dem Ausbruch. Weiterhin wurde gezeigt, daß *B. pseudomallei* in Wirtszellen die Fähigkeit besitzt, an einem Pol der Bakterienzellwand die Polymerisation eines Aktinschweifes zu induzieren. Dieser hat die Ausbildung von Aktin-assoziierten Membranausstülpungen zur Folge und stellt somit einen Mechanismus für die interzelluläre Ausbreitung dar. Weiterhin konnte durch so ausgelöste Zellfusionen die Induktion von Riesenzellen beobachtet werden [72].

Das relativ häufige Scheitern von Antibiotikatherapien und eine hohe Anzahl an Rezidivfällen bei verschiedenen mikrobiellen Erregern wird in jüngerer Zeit mit langsam wachsenden Subpopulationen bakterieller Pathogene, den *small colony variants* (SCVs), in Verbindung gebracht [54]. So konnten auch SCVs von *B. pseudomallei* nach Antibiotika-Behandlung aus der Wildtyppopulation isoliert werden, die signifikant erhöhte Resistenzen

gegenüber verschiedenen, strukturell nicht verwandten Antibiotikaklassen aufwies [109]. Bei gegenwärtigem Stand der Forschung ist es noch nicht möglich Aussagen darüber zu treffen, ob SCVs von *B. pseudomallei* auch tatsächlich mitverantwortlich sind für das Therapieversagen und die Rezidivneigung bei Melioidose.

Die ungewöhnliche intrinsische Resistenz von *B. pseudomallei* gegenüber vielen Antibiotika, besonders gegenüber den Aminoglycosiden, den frühen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sowie Cephalosporinen der 1. und 2. Generation, stellt das größte Problem für eine Therapie der Melioidose dar. Einige der spezifischen Eigenschaften von *B. pseudomallei* können für die Diagnostik genutzt werden. Zur Isolierung von *B. pseudomallei* aus Patientenmaterial auf dem Gentamycin-haltigen Selektivagar nach Ashdown wird beispielsweise diese für gram-negative Stäbchen ungewöhnliche Resistenz ausgenutzt. Außerdem enthält er Neutralrot und Kristallviolett, zwei der seltenen Farbstoffe, die von *B. pseudomallei*, nicht jedoch von anderen Organismen, beim Wachstum inkorporiert werden. Die zweite ungewöhnliche *B. pseudomallei*-typische Resistenz, nämlich die gegenüber Colistin, kann parallel zur Überprüfung der Identität genutzt werden.

Eine weitere Auffälligkeit von *B. pseudomallei* ist sein extrem breites Wirtsspektrum. Als ubiquitärer saprophytischer Bodenkeim stellen nicht nur Menschen, sondern auch die verschiedensten Tiere einen Wirt für *B. pseudomallei* dar. Es wurden Infektionen bei Nagern, Ziegen, Schafen, Pferden, Schweinen, Hunden, Affen, Katzen, Känguruhs, Koalabären, Kamelen, Pandabären und Vögeln beschrieben [21], während Geflügel, Rinder und Wasserbüffel als immun gegen *B. pseudomallei* gelten [130].

*B. pseudomallei* wird als Erreger der Infektionskrankheit Melioidose, die aufgrund von Migration und ansteigender Reisetätigkeit immer häufiger auch in westlichen Ländern diagnostiziert wird, mit zunehmendem Interesse im Rahmen medizinischer Forschungsvorhaben untersucht. Zur Aufklärung des Infektionsmechanismus und der Pathogenese der Krankheit wurden bislang verschiedene Tiermodelle (Maus, *C. elegans*) herangezogen. Als letzter Punkt muß erwähnt werden, daß *B. pseudomallei* aufgrund seiner bekannten Eigenschaften und besonders in Kombination mit der unvollständigen Kenntnis über Pathogenese und Therapie der Melioidose auch als mögliche Biowaffe zu betrachten ist [28]. Um so mehr sollte es Ziel der gegenwärtigen Forschung sein, das Wissen um Erreger und Krankheit zu vervollständigen, um baldmöglichst eine Entwicklung von Impfstoffen und eine zuverlässige Therapie zu ermöglichen.

### **3.3 Virulenzfaktoren und -mechanismen von *Burkholderia pseudomallei***

Bislang wurden verschiedene molekulare Komponenten von *B. pseudomallei* mit der Virulenz dieses Erregers in Verbindung gebracht. Hierbei handelt es sich zum einen um sezernierte Exoprodukte und zum anderen um zellassoziierte Strukturen, deren Funktionen in der Pathogenese der Melioidose bisher meist nur unzureichend geklärt sind.

Schon in den 50er Jahren wurde berichtet, daß sterile Filtrate von *B. pseudomallei* bei parenteraler Gabe eine lethale Wirkung auf Mäuse und Hamster zeigen können [99, 56, 55]. Im Jahre 1987 wurde ein 31 kDa-Protein mit entsprechender Wirkung beschrieben und charakterisiert [66], während zehn Jahre später die zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten auf ein 3 kDa-Peptid zurückgeführt wurde [51]. Eine molekulare Charakterisierung dieser thermolabilen Strukturen wurde jedoch nicht durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde kürzlich eine hitzestabile Substanz aus Kulturüberständen von *B. pseudomallei* charakterisiert, die zytotoxische und hämolytische Eigenschaften sowie eine ausgeprägte Säure- und Alkalistabilität aufweist [53]. Das gereinigte Glycolipid [2-(*O*- $\alpha$ -L-Rhap)- $\alpha$ -L-Rhap- $\beta$ -hydroxy-tetradecanoyl- $\beta$ -hydroxytetradecansäure; Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>] mit einer molekularen Masse von 762 Da übt seinen Effekt auf phagozytierende und nicht-phagozytierende Zellen in dosis- und zeitabhängiger Weise aus. Der tatsächliche Beitrag dieses Rhamnolipids zur Virulenz von *B. pseudomallei* ist jedoch noch unklar, da seine Wirkung durch Albumin neutralisiert wird. Neuere Arbeiten zeigen, daß die oben genannten lethalen Wirkungen steriler Kulturfiltrate von *B. pseudomallei* bislang nicht *in vivo* bestätigt werden konnten [12, 13].

Bei Untersuchungen mit 100 *B. pseudomallei*-Stämmen wurde gezeigt, daß weit über 90% positive Reaktionen in Assays zeigten, die den Nachweis sezernierter Exoprodukte wie Hämolsine, Proteasen, Lecithinasen und anderen Lipasen erlauben [4]. Obwohl diese als potentielle Virulenzfaktoren gelten, wurden bisher nur wenige Proteasen näher charakterisiert. Die ersten konkreten Daten wurden 1994 von Sexton et al. beschrieben, die eine 36 kDa-Protease im Überstand von *B. pseudomallei*-Kulturen nachwies. Diese wurde als Eisen-Metalloenzym mit einer maximalen Aktivität bei 60 °C und einem pH-Wert von 8.0 charakterisiert [124]. Bezüglich der Virulenz wurde vergleichend ein Stamm ohne Proteaseproduktion im Tiermodell mit Lungeninfektion eingesetzt. Es konnte belegt werden, daß dieser Stamm eine reduzierte Virulenz aufwies, aber eine Aussage zur charakterisierten Protease bzw. ihrem Beitrag zur Virulenz wurde nicht gemacht. Einige Jahre später wurden Transposonmutanten mit Defekten im Typ II-Sekretionssystem, das an der Sekretion von Proteasen, aber auch von Lecithinasen und Lipasen beteiligt ist, im Infektionsmodell mit dem Syrischen Hamster untersucht. Sie zeigten keinerlei signifikante Virulenzänderung [33].

Weiterhin wurden eine nicht-hämolisierende Phospholipase C [75] sowie eine Serinprotease mit einer molekularen Masse von etwa 50 kDa kloniert und charakterisiert [82]. Für beide gibt es keine Angaben bezüglich ihres Beitrages zur Virulenz von *B. pseudomallei*, da genetisch definierte Mutanten nicht existieren und so keine *in vivo*-Daten vorliegen. Seit einigen Jahren ist die Existenz einer sauren Phosphatase von *B. pseudomallei* bekannt [70, 73, 74]. Vor kurzem wurde das entsprechende Gen identifiziert sowie eine Defektmutante produziert [14]. Die entsprechende Analyse in Tiermodellen zur Untersuchung der Virulenz wurde bisher nicht durchgeführt.

Zu einer anderen Klasse von potentiellen Virulenzfaktoren gehören die Siderophore. Sie ermöglichen es dem Bakterium, die Eisenspeicher ihres Wirtes für die eigene Eisen-

versorgung zu nutzen, um eine erfolgreiche Infektion durchzuführen. Bei *B. pseudomallei* erfüllt das Siderophor Malleobactin diese Aufgabe, ein 1000 Da-Molekül der Hydroxamatklasse [161, 160]. Über weitere Funktionen und seinen eventuellen Beitrag zur Virulenz von *B. pseudomallei* ist bisher nichts bekannt.

Die bisher einzigen Strukturen von *B. pseudomallei*, bei denen ein Beitrag zur Virulenz tatsächlich experimentell nachgewiesen werden konnte, sind die Typ-1- und Typ-2-O-Seitenketten des Lipopolysaccharids (LPS). Es handelt sich dabei um strukturell unterschiedliche Seitenketten: beim Typ-1 ist es ein Homopolymer aus 1,3-verknüpften 2-O-acetylierten 6-Desoxy- $\beta$ -D-mannoheptoseeinheiten, beim Typ-2 dagegen ein unverzweigtes Heteropolymer aus einer Glucose- und 6-Desoxytalose-haltigen sich wiederholenden Einheit [104]. Im Gegensatz zum serumresistenten Wildtyp weisen Transposonmutanten von *B. pseudomallei*, die die Typ-2-O-PS-Kette nicht mehr produzieren können, nicht nur Serumsensitivität auf, sondern haben in verschiedenen Tiermodellen eine 10-100-fach erhöhte LD<sub>50</sub> [32]. Mutanten, in denen die Produktion der Typ-1-O-PS-Seitenkette gestört ist, zeigen im Gegensatz dazu keine Serumsensitivität, weisen aber eine Virulenzreduktion um den Faktor 10<sup>5</sup> auf [115].

Kapsel- oder Exopolysaccharide (EPS) stellen bei vielen pathogenen Bakterien ein Merkmal dar, das sie vor den Angriffen des Immunsystems des Wirtes schützt. Diese extrazellulären Strukturen gelten als Virulenzfaktoren, die z.B. die Komplementaktivierung verhindern oder die Phagozytose inhibieren. Von *B. pseudomallei* wurde 1995 das EPS I beschrieben [138]. Es handelt sich um ein lineares, unverzweigtes Polymer mit einer molekularen Masse von > 150 kDa aus sich wiederholenden Tetrasaccharideinheiten mit folgender Struktur: (-3)-2-O-Ac- $\beta$ -D-Galp-(1-4)- $\alpha$ -D-Galp-(1-3)- $\beta$ -D-Galp-(1-5)- $\beta$ -D-KDOp-(2-) [100]. Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper (Mak 3015 IgG1) mit Spezifität für dieses hochmolekulare Polysaccharid ergaben, daß *B. pseudomallei*-Stämme aus verschiedenen Teilen der Erde sowie Kulturen unterschiedlichster Morphologie im ELISA oder Immunoblot erkannt wurden. Damit ist die konstitutive Expression dieses Kapselantigens innerhalb der untersuchten Spezies belegt. In jüngster Zeit ist die Existenz eines zweiten hochmolekularen Exopolysaccharids von *B. pseudomallei* gezeigt worden (I. Steinmetz, persönliche Mitteilung). Es enthält Rhamnose, Mannose, Galaktose, Glucose und Gluconsäure, aber keine KDO. Für beide Strukturen gibt es bisher keine Daten aus Tierexperimenten, die den Beitrag zur Virulenz eindeutig belegen.

Eine weitere zellassoziierte Struktur, die oft mit der Virulenz von bakteriellen Pathogenen in Verbindung gebracht wird, sind die Flagellen [103, 97]. Sie ermöglichen die Beweglichkeit eines Organismus, die häufig mit der pathogenen Eigenschaft der Bakterien korreliert. Es ist bekannt, daß *B. pseudomallei* beweglich ist und eine polare Anordnung von zwei bis vier Flagellen besitzt [34]. Das Flagellin *fliC* von klinischen Isolaten von *B. pseudomallei* ist bekannt und innerhalb der klinischen Isolate hochkonserviert [156]. Bisherige Untersuchungen in Ratten- und Hamsterinfektionsmodellen nach systemischer

Infektion mit Transposonmutanten mit Defekt im Flagellin haben keinerlei Hinweise auf Virulenzunterschiede zum Wildtyp ergeben [34].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß in der gegenwärtig vorliegenden Literatur eine Anzahl von potentiellen Virulenzfaktoren angeführt wird, bisher allerdings lediglich für die beiden genannten Typ-1/Typ-2-O-Seitenketten des Lipopolysaccharides experimentelle Belege für einen tatsächlichen Beitrag zur Virulenz erbracht wurden. Die Bedeutung aller anderen sezernierten oder zellassozierten Strukturen bleibt Gegenstand der Forschung, bis ihre Funktionen in der Pathogenese der Melioidose geklärt sind.

### **3.4 Die Bedeutung der systematischen Analyse bakterieller Genome**

Mikroben sind 3 Milliarden Jahre älter als Pflanzen und Tiere, die sich aus ihnen entwickelt haben. Schätzungen zufolge machen sie etwa 60% der gesamten Biomasse der Erde aus. Weniger als 0.5% der vermuteten 2-3 Milliarden mikrobiellen Spezies gelten heute als identifiziert [41]. Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit waren seit 1995 etwa 60 komplette mikrobielle Genome publiziert. Die Sequenzierung weiterer etwa 150 Genome war in Bearbeitung und dürfte in wenigen Monaten verfügbar sein [63]. Zukünftig wird etwa alle zwei Monate mit einer klaren Tendenz zu kürzeren Abständen ein weiteres mikrobielles Genom sequenziert werden [41]. Unter Einsatz aller technischen Möglichkeiten der modernen biomedizinischen Forschung steht damit bereits heute eine umfassende Basis zur Verfügung, um die Physiologie und Evolution mikrobieller Spezies zu untersuchen und zu verstehen. Aus medizinischer Sicht stellen Infektionskrankheiten ein globales Gesundheitsproblem dar, das vor allem durch die zunehmende Resistenz pathogener Erreger höchste Bedeutung einnimmt [64]. Insbesondere zur antibiotischen Therapie bakterieller Infektionen stehen heute nur noch Medikamente mit nachlassender Wirksamkeit zur Verfügung. Als Beispiel für entsprechende Pathogene seien an dieser Stelle die multiresistenten Enterokokken, Staphylokokken und Pseudomonaden genannt, wobei die letzteren beiden letztlich für die Folgen der cystischen Fibrose verantwortlich sind. Zur Ausprägung resistenter Bakterienstämme trägt auch die Nahrungsmittelindustrie bei, indem sie beispielsweise Antibiotika als Futterzusatz verwendet, um höhere Erträge zu erwirtschaften. Darüberhinaus kommt es immer häufiger zu einem überraschenden Wiederauftreten von Infektionskrankheiten, die häufig bereits als stark eingedämmt betrachtet wurden.

Die heute verwendeten Antibiotika gehören sämtlichst Substanzklassen an, die im wesentlichen auf molekularen Grundstrukturen beruhen, die vor etwa 30-50 Jahren entwickelt wurden. Solche Antibiotika, z.B. Penicilline und Tetracycline, wirken nach bekannten Mechanismen, indem sie bestimmte intrazelluläre Synthesewege der bakteriellen Zelle blockieren und so zum Absterben der Erreger führen. Das mittlerweile geflügelte Wort *The bugs fight back* beschreibt treffend die Fähigkeit der Bakterien, sich auf verschiedenen Wegen den antibiotischen Substanzen derart anzupassen, daß sie keinen therapeutischen Effekt mehr erbringen und sogar in vielen Fällen die Resistenz verstärken. Es ist heute offensichtlich, daß



neu entwickelte Antibiotika, die auf den molekularen Strukturen der klassischen Antibiotika beruhen, keinen langfristigen Erfolg mehr erbringen können, da sie nach wie vor bakterielle Zielmoleküle angreifen, die mit der Möglichkeit der Resistenzbildung verknüpft sind. Ein weiterer Vorteil der mikrobiellen Erreger liegt in der Schnelligkeit ihrer genetischen Flexibilität, also der Fähigkeit zur Resistenzentwicklung. Sie ist deutlich höher als die durchschnittliche Entwicklungszeit eines Antibiotikums, die mit mindestens 10 Jahren kalkuliert werden muß.

Die pharmazeutische Forschung und Industrie hat dieses Problem aufgegriffen, indem in diesen Bereichen bedeutende Anstrengungen unternommen werden, um neue wirksame antibiotische Medikamente zu entwickeln und zu vermarkten. Als Hauptwerkzeug hierfür dienen die Sequenzinformationen, die der Analyse bakterieller Genome entnommen werden können [151, 41, 114]. In methodischer Hinsicht werden vollständige Genomsequenzen erhalten, indem bakterielle DNA isoliert und fragmentiert wird. Anschließend werden alle klonierten DNA-Fragmente sequenziert (random sequencing, shotgun), die Teilsequenzen werden zusammengesetzt, die Lücken geschlossen und abschließend wird eine Annotierung durchgeführt. Als erstes wichtiges Resultat wird die Anzahl der *open reading frames* (ORF) und dessen Prozentsatz bestimmt, der als kodierend betrachtet wird. Dieser korreliert letztlich mit der Anzahl der bakteriellen Proteine, die die weit überwiegende Mehrheit der Virulenzfaktoren stellen und neben Oberflächenoligosacchariden, regulatorischer DNA und bestimmten RNA-Spezies als eigentliche Zielmoleküle für Diagnose, Therapie und Impfung anzusehen sind. Von den kodierenden ORF haben etwa die Hälfte bekannte Funktionen, zumindest können sie bzw. deren Proteinprodukte einer Familie zugeordnet werden.

Mit den kompletten Genomsequenzen ist eine wichtige Grundlage geschaffen, mit denen Gene identifiziert werden können, die an mikrobiellen Virulenz- und Infektionsmechanismen beteiligt sind [145]. Hierfür hat in jüngster Vergangenheit der Einsatz von Transposons geführt, also von genetischen Elementen, die von einem Ort zu einem anderen springen können [69, 52, 86]. Transposons unterschiedlicher Struktur kommen grundsätzlich in allen Lebewesen vor. Bei Bakterien spielen die Tn-Transposons eine große Rolle. Sie bestehen typischerweise an den Enden der DNA aus sich wiederholenden Segmenten, kodieren eine Transposase und bewegen sich von einer Donorposition zu einer anderen, indem sie sich herausschneiden und an einem mehr oder weniger beliebigen anderen Ort wieder einfügen. Falls dieser Ort ein funktioneller ORF, d.h. ein proteinkodierender Bereich im bakteriellen Genom ist, so kann die normale Funktion dieses Gens gestört oder sogar völlig unterbunden sein. Eine derartige Mutante kann anschließend in verschiedensten Laborexperimenten daraufhin analysiert werden, ob das gestörte Gen in bestimmte bakterielle Funktionen eingebunden ist. Eine Transposonmutagenese äußert sich nicht zwangsläufig in einem veränderten Bakterium. Gene mit Transposoninsertionen am 5'- oder 3'-Ende können in vielen Fällen immer noch funktionelles Protein kodieren. Darüberhinaus dürfte sich die Störung eines duplizierten Gens oder eines Gens, das an redundanten Mechanismen beteiligt ist, kaum auswirken. Da Bakterien eine überschaubare Anzahl von ORF enthalten, in der

Regel zwischen etwa 500-5000 [41], ist mittlerweile eine systematische Transposonmutagenese des gesamten Genoms bei verschiedenen Bakterien durchgeführt worden. Mit dieser Technologie und ihren Varianten ist ein Hochdurchsatzscreening möglich, um die Identifizierung von Genen, die an der mikrobiellen Virulenz und Pathogenese beteiligt sind, zu ermöglichen.

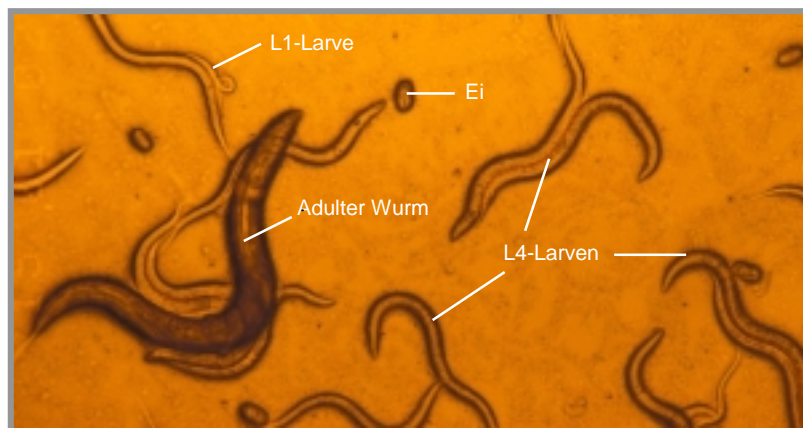
Die Transposonmutanten lassen sich, wenn keine essentiellen Gene zerstört wurden und sie somit lebensfähig sind, in den verschiedensten biologischen Assays systematisch auf beliebige Eigenschaften untersuchen. So sind z.B. Assays besonders geeignet, die die Abhängigkeit des Wachstums vom Medium analysieren, die Motilität oder Antibiotikaresistenz betrachten oder definierte Enzymaktivität messen. Durch molekularbiologische Standardtechniken lassen sich die transposongestörten Gene derart identifizierter Mutanten eindeutig bestimmen. Gen und Defekt der Mutante können somit korreliert werden. Durch die Techniken, die im Rahmen der Proteomik entwickelt wurden, erhalten die oben skizzierten Wege zur Identifizierung essentieller Gene effektive Unterstützung. Durch Anwendung hochauflösender 2D-Gelelektrophorese mit massenspektrometrischer Proteincharakterisierung ist es möglich, von einer Mutante mit bekanntem Defektgen auch Unterschiede in den exprimierten Genen, d.h. im existierenden Proteinstapel unter gegebenen Umständen zu erfassen [15]. Durch die Integration von Bakteriengenomik, systematischer Transposonmutagenese, funktioneller Analyse der Mutanten und Proteomik ergeben sich somit für die medizinische Mikrobiologie und andere Bereiche neue Möglichkeiten, mikrobielle Physiologie und Pathogenese zu verstehen.

### **3.5 Der Nematode *Caenorhabditis elegans* als Infektionsmodell**

Einen wichtigen Schritt zur Identifizierung bakterieller Virulenzfaktoren stellen verbesserte Technologien zur definierten oder systematischen Mutagenese dar, die eine große Zahl von Mutanten liefern. Diese müssen in hochdurchsatzgeeigneten biologischen Modellsystemen (high throughput screening) hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht werden. Während sich existierende Säugermodelle aufgrund des hohen Aufwandes, der daraus resultierenden Kosten und auch aus ethischen Gründen für diese Belange nicht eignen, hat sich in jüngerer Zeit der Nematode *Caenorhabditis elegans* als geeigneter Modellorganismus erwiesen. Eindrucksvoll belegt wird diese Tatsache durch den exponentiellen Anstieg von Publikationen in den letzten zwanzig Jahren, die sich mit *C. elegans* als genetischem Modell beschäftigen [38].

Die Argumente, die für die Etablierung eines *in vivo*-Pathogenesemodells mit *C. elegans* als Wirtsorganismus sprechen, sind ebenso einfach wie überzeugend: Als freilebender anspruchsloser Bodennematode der gemäßigten Zonen ist *C. elegans* problemlos im Labor auf Agarplatten mit *E. coli* als Nahrungsquelle zu halten. Aufgrund seiner geringen Größe von etwa 1 mm ist die Kultivierung einer großen Anzahl von Individuen auf kleinstem Raum möglich. Die Dauer der Entwicklung vom Ei bis zum reproduktionsfähigen Tier beträgt nur etwa drei Tage, die maximale Lebenszeit ca. drei Wochen. Jeder adulte, selbst-

befruchtende Hermaphrodit legt bis zu 300 Eier. Ebenfalls existierende männliche Würmer - weibliche Tiere gibt es nicht - lassen sich beliebig mit diesen paaren, was für die genetische Forschung von Bedeutung ist. Der Wurm ist mechanisch äußerst robust: er läßt sich schütteln, zentrifugieren, einfrieren und lebendig wieder auftauen. Die Basistechniken zur Kultivierung sind einfach und ohne besonderen Aufwand durchzuführen [60]. Das Genom von *C. elegans* ist relativ klein (etwa 20-mal so groß wie das von *E. coli*), die Anatomie übersichtlich (exakt 959 somatische Zellen bei Hermaphroditen, davon 302 Nervenzellen) und die Erscheinung unter dem Mikroskop transparent, was für die Erforschung innerer Vorgänge von großem Vorteil ist [117].



**Abbildung 2:** Ausschnitt einer Mischkulturplatte mit *C. elegans*: Es sind Eier, Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie ein adulter Wurm zu sehen. Sie werden bei Raumtemperatur gehalten, wobei ihnen zuvor bei 37 °C auf diesen Platten angezüchteter *E. coli* als Nahrungsquelle dient. Je nach Bedarf können synchronisierte Kulturen einer spezifischen Entwicklungsstufe hergestellt werden.

Diese Argumente veranlaßten schon 1965 den britischen Molekularbiologen Sydney Brenner, *C. elegans* als Modellorganismus in die Biologie einzuführen [10]. Seitdem gewann der Wurm zunehmend an Interesse. Bereits im Jahr 1998 war das Genom von *C. elegans* als erstem multizellulärem Organismus vollständig sequenziert [146]. Die bekannte Genomsequenz und die daraus folgende Möglichkeit, diese genetisch zu manipulieren, machen für die Aufklärung grundlegender biologischer Vorgänge auch ein Arbeiten mit definierten Wurmmutanten möglich. Insbesondere in Kombination mit bakteriellen Pathogenen, deren Genom ebenfalls bekannt ist, bieten sich optimale Bedingungen zur systematischen Analyse von Interaktionen zwischen einem bakteriellem Pathogen und einem eukaryotischem Wirt [143]. Das Genom von *C. elegans* umfaßt etwa 19000 Gene bei einer Größe von 97 Mb. *C. elegans* besitzt damit nach aktuellen Schätzungen mehr als halb so viele Gene wie der Mensch [65]. Mehr als 40% der nachgewiesenen und vorhergesagten Proteine finden signifikante Äquivalente in anderen Organismen wie dem Menschen und anderen Säugern [146]. Bisherige Arbeiten zeigen, daß trotz der großen evolutionären Distanz zwischen Mensch und

Nematode, *C. elegans* als ein auch auf den Säugetierwirt übertragbares Modell für infektionsbiologische Studien herangezogen werden kann [92].

Eine vielversprechende Anwendung des *C. elegans*-Modells ist das Screening von Mutantenbanken humanpathogener Bakterien auf reduzierte oder verstärkte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp. Die auf diesem Weg detektierten Mutanten können dann in geeigneten Säugetiermodellen detailliert untersucht werden, um z.B. eine Virulenzreduktion beim Säugetierwirt zu bestätigen. Voraussetzung und somit Limitation für ein derartiges Vorgehen ist, daß die zu untersuchenden Bakterien unter Laborbedingungen eine lethale Wirkung auf den Wurm haben. Dies wurde bislang lediglich für die gram-positiven Pathogene *Bacillus megaterium* [3], *Bacillus thuringiensis* [87], *Enterococcus faecalis* [48], *Microbacterium nematophyllum* [59], *Staphylococcus aureus* [48] und *Streptococcus pneumoniae* [48] sowie die gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* [142], *Pseudomonas fluorescens* [144, 31], *Burkholderia pseudomallei* [101], *Burkholderia thailandensis* [101], *Burkholderia cepacia* [101, 142], *Salmonella thyphimurium* [1, 80], *Serratia marcescens* [110, 79] und *Yersinia* ssp. [30] gezeigt. Eine weitere Limitation des Wurmmodells ist die Tatsache, daß die Expression vieler Virulenzfaktoren im Säugetierwirt durch das Wirtsmilieu oder spezifische Wirtsmoleküle induziert wird. So ist z.B. die konstante Säugertemperatur von 37 °C ein Schlüsselsignal, das im Wurm, der bei Raumtemperatur lebt, nicht gegeben ist. Weiterhin fehlt dem Nematoden ein adaptives Immunsystem, womit einigen Virulenzfaktoren ein potentieller Angriffspunkt genommen ist [40].

Die Gruppe um Frederick Ausubel hat trotz der genannten Einschränkungen im Januar 1999 beispielhaft die Etablierung des Pathogenitätsmodells *C. elegans-Pseudomonas aeruginosa* beschrieben [144, 93, 143]. Von dem untersuchten klinischen Isolat *Pseudomonas aeruginosa* PA14 war bereits bekannt, daß er Virulenzfaktoren produziert, die sowohl im Pflanzenmodell *Arabidopsis thaliana* als auch im Mausmodell vollständige Pathogenität erreichen [111]. Das Pflanzenmodell ist darüberhinaus erfolgreich zum Screening nach, später auch im Säugermodell bestätigten, virulenzreduzierten Mutanten eingesetzt worden [112]. Dieses Bakterium (*P. aeruginosa* PA14) mit breitem Wirtsspektrum zeigt ebenso auf *C. elegans* lethale Wirkung. Es wurden zwei unterschiedliche Arten des Wurmsterbens beschrieben: das durch eine Infektion ausgelöste langsame Sterben (slow killing) und das schnellere Sterben (fast killing), das durch die Ausschüttung von Toxinen bedingt ist. Der unterschiedliche Sterbeverlauf ist von der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig. Eine dritte Art des Sterbens von *C. elegans* durch *P. aeruginosa* PA14 wurde wenige Monate später als lethale Paralyse beschrieben [31]. Weiterhin wurden Mutanten isoliert, die die Überlebensdauer von *C. elegans* erhöhten. Einige dieser Mutanten zeigten auch im Säugermodell reduzierte Virulenz. Die grundsätzliche Eignung des Pathogenitätsmodells *C. elegans* für Bakterienspezies der Gattung *Burkholderia* konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe [36] und von anderen [47] erfolgreich gezeigt werden.

### 3.6 Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Identifizierung von Virulenzfaktoren von *B. pseudomallei*, um molekulare Pathogenitätsmechanismen dieses Humanpathogens zu analysieren. Auf der Basis einer Transposonmutagenese des Wildtypbakteriums sollen Mutanten in verschiedenen biochemischen Testsystemen detektiert werden, um anschließend eine reduzierte Virulenz dieser Mutanten im Mausmodell zu verifizieren. Zusätzlich sollen virulenzreduzierte Mutanten *in vivo* mit einem *Caenorhabditis elegans*-Modell identifiziert werden. Defekte Gene so gefundener Mutanten sollen schließlich molekularbiologisch charakterisiert und nach Datenbankvergleich einer Gen- und Proteinfamilie zugeordnet werden. Auf diesem Weg ermittelte Proteine ermöglichen einen ersten Schritt zur Definition ihrer potentiellen Funktion und legen eine Basis zur Identifizierung molekularer Mechanismen der Pathogenese. Somit tragen sie zur Entwicklung von Impfstoffen und einer verbesserten Therapie der durch *B. pseudomallei* verursachten Melioidose bei.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1 Materialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Acros Organics, AppliChem, Amersham Pharmacia Biotech, Difco Becton Dickinson, Fluka, Merck, Oxoid, Roche Diagnostics, Serva oder Sigma bezogen. Alle eingesetzten Lösungen, Medien, Puffer, Glasgeräte, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und andere Gebrauchsgegenstände waren standardmäßig autoklaviert.

#### 4.1.1 Bakterienstämme

- *Burkholderia pseudomallei* Umweltisolat E8 (aus Ubon Ratchatani, Thailand)
- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ  $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>, thi-1, gyrA, relA1 (Hanahan, 1983)
- *Escherichia coli* Hb 101 pRK2013
- *Escherichia coli* OP 50
- *Escherichia coli* S17-1(pOT 182)
- *Escherichia coli* SM10  $\lambda$  *pir* (thi 1 thr1 leuB6 supE44 tonA21 lacY1 recA<sup>-</sup>::RP4-2 Tc::Mu Km<sup>r</sup>), Derivat von C600, kodiert das  $\pi$ -Protein
- *Escherichia coli* XL1-Blue MR:  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac

#### 4.1.2 Medien für die Bakterienanzucht

- Ashdown-Agar: 1% Trypton-Soja-Broth, 1.5% Agar, 3.48% Glycerin, 0.0005% Kristallviolett, 0.005% Neutralrot, 5  $\mu$ g/ml Gentamycin
- BHI-Agar: 1.25% Kalbshirnininfusion, 0.5% Rinderherzinfusion, 1% Proteose-Pepton, 0.2% Glucose, 0.5% NaCl, 0.25% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% Agar, pH 7.4
- LB-Agar: LBB mit 1.5% Bacto-Agar
- LBB: 1% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 0.5% NaCl, pH 7.5
- MacConkey-Nährboden: 2% Pepton, 1% Lactose, 0.5% Gallensalze, 0.5% NaCl, 0.0075% Neutralrot, 1.2% Agar, pH 7.4
- Müller-Hinton-Agar: 30% Rinderinfusion, 1.75% Casamino Acids, 0.15% Stärke, 1.7% Agar, pH 7.3
- Vogel-Bonner-Agar: Vogel-Bonner-Bouillon mit 1.5% Agar
- Vogel-Bonner-Bouillon: 3.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 11.3 mM Citronensäure, 27.8 mM NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>, 37.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.21 M Kaliumgluconat, pH 7.2, sterilfiltriert

### 4.1.3 Puffer und Lösungen

- 10 × Blocking Solution: Puffer 1 mit 10% Blocking Reagenz
- B1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 0.5% Tween-20, 0.5% Triton X-100
- B2: 3 M Guanidiniumhydrochlorid, 20% Tween-20
- Denaturierungslösung (für Southern Blot): 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- DNA-I: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- DNA-II: 1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl
- Hybridisierungslösung: 1 mM EDTA pH 8.0, 250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 7% SDS
- 6 × Farbmarker für Agarosegele : 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 40% Saccharose
- MM9-Puffer (CAS-Platten): 1.28% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl
- Neutralisierungslösung (für Southern Blot): 1 M Tris-HCl pH 7.0, 3 M NaCl
- P1 (Qiagen): 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
- P2 (Qiagen): 200 mM NaOH, 1% SDS
- P3 (Qiagen): 3 M Kaliumacetat, pH 5.5
- PBS: 10 mM Natriumphosphatpuffer, 140 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7.4
- Puffer A: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 140 mM NaCl, pH 7.4
- Puffer 1: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5 mit NaOH
- Puffer 2: 10 × Blocking Solution 1:10 verdünnt in Puffer 1
- Puffer 3: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9.5 mit HCl
- QBT (Qiagen): 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol, 0.15% Triton X-100
- QC (Qiagen): 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol
- QF (Qiagen): 1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15% Isopropanol
- 20 × SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0-7.4
- SM-Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% Gelatine
- Solubilisierungslösung für 2D-Proteinproben: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 30 mM DTT, 5 mM Tris-Base, 1 mM Pefablock SC, 2 µM Leupeptin, 4% CHAPS, 0.5% Ampholyte pH 3-10
- 10 x TBE-Puffer: 890 mM Tris, 890 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 20 mM EDTA pH 8.0
- Tergitollösung: 1 × PBS mit 1% Tergitol, 0.5% BSA
- Wash-I: 1 mM EDTA pH 8.0, 250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 5% SDS
- Wash-II: 1 mM EDTA pH 8.0, 250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 1% SDS
- Waschpuffer: Puffer 1 mit 0.3% Tween 20

#### 4.1.4 Molekularbiologische Fertigprodukte

- SuperCos 1 Cosmid Vector Kit, Stratagene
- Gigapack III Gold Packaging Extract, Stratagene
- DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche Diagnostics
- DIG Oligonucleotide Tailing Kit, Roche Diagnostics
- Genomic DNA Preparation Kit, Qiagen
- Midi Plasmid Preparation Kit, Qiagen
- DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech

#### 4.1.5 Enzyme und Molekulargewichtsstandards

- *Bam*HI, T4-DNA-Ligase, *Eco*R I, *Sal* I, New England Biolabs
- *Cla* I, *Hind*III, Pharmacia Biotech
- *Xba* I, *Sau*3A I, Amersham Pharmacia Biotech
- CIAP, Gibco BRL
- Taq Polymerase, Sigma
- 1 kb DNA Leiter, New England Biolabs
- DIG-markierter Größenstandard III, Roche Molecular Biochemicals

#### 4.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech im Auftrag hergestellt.

- BF1: 5'-CCG TAG TTG CCG ATG TAC GGA TCC TGC-3'
- BF4: 5'-TGT CGT GGA AGA TCT ATC -3'
- BF5: 5'-ACA TGG AAG TCA GAT CCT GG -3'
- BF6: 5'-GAT CCT GGA AAA CGG GAA AG -3'
- BF7: 5'-TTC CTG AGG CCG ATA CTG -3'
- BF8: 5'-TTC AGC AGC AGC AGA CCA -3'
- BF9: 5'-ATG CTG ATC TGA TAG CCA -3'
- BF10: 5'-CCA GGA TCT GAC TTC CAT -3'
- BF11: 5'-CAC AAG CTT ATC TCG ATG ATG CGG TCG -3'
- BF12: 5'-TCA GGA TCC TCA TGA GTG CTG GAG CAG -3'
- BF13: 5'-CAC AAG CTT CGT GAC AGA AAT CTC AAT TCA GCC -3'
- BF14: 5'-TGT GGA TCC TAC ACG TTA TTG CAG GAG CTT CAG -3'
- SH3: 5'-CTG ACG AAT TCC TGA TGC AGG AGA ACC G -3'

#### 4.1.7 Vektoren

- pBBR1MCS-2 [76]
- pOT182 [96]



#### 4.1.8 *Caenorhabditis elegans*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Wurmstämme wurden vom *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota, St. Paul, USA, bezogen. Es handelt sich ausschließlich um selbstbefruchtende Hermaphroditen.

- *C. elegans* Wildtypstamm N2, DR Subklon von CB Original (Tc1 pattern I)
- *C. elegans* Mutantenstamm TJ1052, Genotyp *age-1* (hx546) II
- *C. elegans* Mutantenstamm PH13, Genotyp *rad-8* (mn163) I

#### 4.1.9 Medien und Puffer für Arbeiten mit *Caenorhabditis elegans*

- M9-Puffer: 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5% NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>
- NG (nematode growth) Agar für slow killing: 0.3% NaCl, 0.25% Pepton, 1.7% Agar mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mg/l Uracil, 5 mg/l Cholesterin, 25 mM Kaliumphosphat pH 6.0, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mg/l Nystatin
- NGM (nematode growth medium) Agar zur Kulturerhaltung: 0.3% NaCl, 0.35% Pepton, 1.7% Agar mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mg/l Uracil, 5 mg/l Cholesterin, 25 mM Kaliumphosphat pH 6.0, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mg/l Nystatin
- PGS (pepton glucose sorbitol) Agar für fast killing: 1% Bactopecton, 1% NaCl, 1% Glucose, 2.73% Sorbit, 1.7% Bactoagar mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mg/l Uracil, 5 mg/l Cholesterin, 25 mM Kaliumphosphat pH 6.0, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mg/l Nystatin
- PGS ohne Pepton-Agar für modifiziertes fast killing: wie PGS Agar ohne Bactopecton

#### 4.1.10 Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme wurden von Charles River Wiga bezogen. Es handelte sich um 8-10 Wochen alte weibliche Tiere.

- Stamm Balb/c (*H-2<sup>d</sup>* Haplotyp, Bcg/Tty/Lsh<sup>s</sup> Phänotyp)
- Stamm C57BL/6 (*H-2<sup>b</sup>* Haplotyp, Bcg/Tty/Lsh<sup>s</sup> Phänotyp)

#### 4.1.11 Gebrauchsmaterialien

- 25 und 50 ml Polypropylen Falcons, Greiner bio-one, Cellstar
- Filterpapier, Whatman
- Membranen: Nylon für Southern Blot, Amersham Pharmacia Biotech  
Polyamid für Colony Blot, Amersham Pharmacia Biotech
- Petrischalen, Sarstedt
- Polystyrolröhrchen, Greiner
- Röntgenhyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech
- Sterilfilter, Millipore
- 24 Well-Gewebekulturplatten, Greiner bio-one, Cellstar

#### 4.1.12 Geräte

- Brutschrank, Heraeus
- Easy Enhanced Analysis System (Easy RH-3, Videokamera 429K)
- Elektrophoresekammer, Bio-Rad
- Gefriertruhe, Heraeus
- Gene Pulser II Elektroporation System, Bio-Rad
- Hybridisierungsöfen, Bachofer
- Inkubationsschüttler SM-30/TH30, Edmund Bühler
- Inverses Mikroskop Axiovert 25, Zeiss
- Labortiefkühlschrank Typ 6485, GFL
- Mikroskop CK 2, Olympus
- Mikroskope ID02 und ID03, Zeiss
- Netzgerät 2197, Pharmacia LKB
- pH-Meter 761 Calimatic, Knick
- Photometer Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech
- Photometer Ultraspec III, Pharmacia LKB
- Schüttelbrutschrank Thermoshake Typ TH05, Gerhardt
- Schüttler Reax top, Heidolph
- Sicherheitswerkbank Klasse 2 Typ H, Heraeus
- Sicherheitswerkbank, W. H. Mahl
- SpeedVac-Concentrator, Savant
- Temperierter Wurmschrank Bromma 2023 Minicoldlab, LKB
- Ultraschallbad Sonorex TK52 Transistor, Bandelin
- Vakuumofen, Heraeus
- Vakuumpumpe Typ BVC 21, Vacuubrand
- Waagen: PL 1200, Mettler; BP 211 D, Sartorius
- Wasserbad 1092, Pharmacia LKB
- Wasserbad 1002-1013, GFL
- Zentrifugen: Biofuge 13 und 15R, Heraeus
  - Kühlzentrifuge Modell J2-21, Beckman
  - Minifuge RF, Heraeus
  - Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf
  - Rotanta 46 RSC, Hettich

#### 4.1.13 Software

Zur Anfertigung dieser Dissertation wurden die Programme Microsoft Office, Lasergene DNASTar, CorelDraw 6, PhotoExpress 1.0, SigmaPlot 5 und SigmaStat 32 verwendet.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme bzw. deren Mutanten und Komplementanten wurden zunächst auf Columbia Blutagarplatten bzw. auf LB-Platten mit den erforderlichen Antibiotikazusätzen bei 37 °C ÜN angezüchtet.

Folgende Antibiotikazusätze wurden eingesetzt:

- *B. pseudomallei* Tn5 Mutanten (pOT182): 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml Tetracyclin
- *B. pseudomallei* Komplementanten (pBBR1MCS-2): 500 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml Tetracyclin
- *E. coli* DH5α(pBBR1-MCS-2): 30 µg/ml Kanamycin
- *E. coli* Hb 101(pRK2013): 30 µg/ml Kanamycin
- *E. coli* S17-1(pOT182): 25 µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Kanamycin, 12.5 µg/ml Tetracyclin
- *E. coli* SM10(pOT182): 25 µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Kanamycin, 12.5 µg/ml Tetracyclin
- *E. coli* XL1-Blue MR mit *B. pseudomallei* E8 Cosmid-Bank: 200 µg/ml Carbenicillin

#### 4.2.1.2 Bestimmung von Wachstumskurven

Zur Bestimmung des Wachstumsverhalten im Flüssigmedium LBB ohne Antibiotikazusatz wurden je 100 ml mit den zu untersuchenden Bakterien von ÜN auf Blut- bzw. Antibiotika-platten gewachsenen Bakterien bei einer OD<sub>650</sub> von genau 0.1 angeimpft. Die Suspensionen wurden unter Schütteln bei 140 rpm und 37 °C inkubiert. Über einen Zeitraum von 48 h wurden zu definierten Zeitpunkten (meist im Abstand von 30 min) Proben von 1 ml aus den Suspensionen entnommen, deren OD<sub>650</sub> direkt oder entsprechend verdünnt bestimmt wurde. Aliquots bestimmter Zeitpunkte (t = 2, 6, 10, 25.5 sowie 32.5 h) wurden in Puffer A verdünnt und zur Bestimmung der CFU auf MH-Platten ausplattiert.

#### 4.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Bakteriensuspensionen

Aus der photometrisch gemessenen optischen Dichte der Suspension bei 650 nm wurde mit Hilfe einer durch lineare Regression erstellten Eichgerade die Konzentration in Bakterienanzahl/ml ermittelt.

#### 4.2.1.4 Bestimmung der Koloniegröße von Bakterien

Zur Bestimmung der Koloniegröße wurden mehrere Kolonien vollständig in ein definiertes Volumen Puffer A überführt und resuspendiert. Durch Messung der OD<sub>650</sub> und Ausplattieren verschiedener Verdünnungen konnte die Anzahl der CFU pro Kolonie errechnet werden.

#### **4.2.1.5 Einfrieren und Entsorgen von Bakterien**

Bakterien wurden als Suspension in sterilem LBB mit 10–20% Glycerin bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Nicht mehr benötigte Platten, Suspensionen sowie verunreinigtes Gebrauchsmaterial wurde grundsätzlich autoklaviert.

#### **4.2.1.6 Identifizierung von Bakterien durch das API-System 20 NE**

API 20 NE ist ein standardisiertes System mit acht konventionellen und 12 Assimilationsreaktionen zur Identifizierung nicht anspruchsvoller, gram-negativer Stäbchen [29]. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers (bioMérieux Handbuch, März 2000), wobei bestimmte Stoffwechselprodukte der Bakterien durch Farbumschläge angezeigt werden und das Wachstum der Bakterien die Fähigkeit zur Assimilation der angebotenen Substrate belegt. Die Analyse erfordert drei Tage und erlaubt eine computergestützte Auswertung mit dem Analytischen Profil-Index (siebenstellig) mit Bestimmung von Gattung und Stamm des untersuchten Organismus.

### **4.2.2 Molekularbiologische Arbeiten**

#### **4.2.2.1 Präparation genomischer DNA**

Die Präparation von genomischer DNA wurde nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Genomic DNA Handbook) durchgeführt. Dazu wurden etwa  $2.2 \times 10^{10}$  Bakterien einer frisch gewachsenen ÜN-Kultur in einem Volumen von 50 ml bei  $2600 \times g$  für 10 min und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert und in 3.5 ml Puffer B1 resuspendiert. Nach Zugabe von 7  $\mu\text{l}$  RNase (Qiagen, 100 mg/ml), 80  $\mu\text{l}$  Lysozym (100 mg/ml) und 100  $\mu\text{l}$  Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Suspension 1–2 h bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad inkubiert. Dem Zelllysat wurden 1.2 ml Puffer B2 zur Degradation der Proteine hinzugefügt, gut vermischt und für weitere 2–3 h bei  $50\text{ °C}$  im Wasserbad inkubiert. Der möglichst klare Überstand wurde auf eine jeweils mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen Genomic-tip 100/G Säule gegeben. Die auf der Säule gebundene genomische DNA wurde zweimal mit je 7.5 ml Puffer QC gewaschen, bevor sie mit 5 ml Puffer QF in ein Greiner-Röhrchen eluiert wurde. Durch Druckzufuhr wurde die Flußgeschwindigkeit erhöht. Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol. Durch Zentrifugation (mind.  $5000 \times g$ ,  $4\text{ °C}$ , 20 min), zweimaliges Waschen des Pellets mit je 2 ml 70% EtOH und erneutes Zentrifugieren wurde die DNA gereinigt, im Vakuum bei  $60\text{ °C}$  getrocknet und in 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  ÜN gelöst.

#### **4.2.2.2 Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht zu analytischen Zwecken erfolgte in horizontalen Gelen mit einer Agarosekonzentration zwischen von 0.5–1.5% in  $1 \times$  TBE-Puffer. Sie wurde mit einer Lauflänge von 10 cm und einer Spannung von 80–120 V durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben mit 0.5–1  $\mu\text{g}$

DNA wurden mit 0.17 Volumen des glycerinhaltigen Laufpuffers versetzt, dessen Bromphenolanteil gleichzeitig die Lauffront der Elektrophorese erkennen ließ. Nach der Auftrennung wurden die Gele ca. 30 min in Ethidiumbromidlösung (2 mg/l) inkubiert. Die DNA konnte anschließend durch Aktivierung des interkalierten Farbstoffs unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Ein Größenstandard von 500 bis  $10^4$  Basenpaaren wurde grundsätzlich mitgeführt. Zur Dokumentation wurde das Easy Enhanced Analysis System der Firma Herolab (Easy RH-3, Videokamera 429K) verwendet.

#### 4.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch durch UV-Absorptionsmessung bei 260, 280 und 320 nm in einer Quarzglaszentrifuge bestimmt. Sie errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \varepsilon \times V$$

Der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  beträgt für einzelsträngige DNA 0.04 und für doppelsträngige DNA 0.05, während V den Verdünnungsfaktor der Nukleinsäure in der Lösung beschreibt. Der Quotient aus den gemessenen optischen Dichten bei 260 und 280 nm gibt den Grad der Verunreinigung der Nukleinsäurelösung durch Proteinreste an. Bei optimaler Reinheit errechnet sich ein Quotient von 1.8 oder größer.

#### 4.2.2.4 Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren

DNA wurde mit Restriktionsenzymen in einem Volumen von 15–100  $\mu\text{l}$  in einem vom Hersteller angegebenen Puffer je nach Anwendung für 1–2 Stunden oder ÜN bei 37 °C verdaut. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 5–10 U Enzym eingesetzt.

#### 4.2.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren

a) DNA Purification Kit: Nach Anweisung des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) wurde die zu reinigende DNA in 500  $\mu\text{l}$  Capture Buffer über eine kleine Säule aufgenommen. Durch 30 s Zentrifugation bei  $16110 \times g$  wurde die DNA auf die Säule gebunden. Nach Waschen mit 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer und anschließender Zentrifugation ( $16110 \times g$ , 30 s), wurde das Produkt durch 1 min Zentrifugation ( $16110 \times g$ ) in 10–50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert.

b) Phenol/Chloroform-Extraktion: Zur Entfernung von Proteinkontaminationen bei DNA-Fragmenten größer als 10 kb wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Zehntel des Volumens 3 M NaOAc sowie dreifachem Volumen 96% EtOH versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte für mindestens 30 min bei  $-80$  °C. Nach Zentrifugation ( $16110 \times g$ , 4 °C, 15 min) und nachfolgendem Waschen mit 1 ml 70% EtOH mit erneuter Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Pellet im Vakuum getrocknet. Je nach DNA-Menge und Verwendungszweck wurde das Produkt in einem entsprechenden Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

#### 4.2.2.6 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Die Dephosphorylierung von DNA erfolgte durch CIAP, einer Phosphomonoesterase, die 3'- und 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA entfernt. Nach Angaben des Herstellers wurde die Reaktion in einem Volumen von 200  $\mu$ l mit 1 U Enzym/ $\mu$ g DNA für 30 min bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 6  $\mu$ l 0.5 M EDTA-Lösung (final 15 mM) bei 68 °C für 15 min.

#### 4.2.2.7 Ligation von Nukleinsäuren

Es wurde die T4 DNA Ligase eingesetzt, die die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen in Doppelstrang-DNA oder -RNA katalysiert. Dieses Enzym verbindet sowohl stumpfe als auch klebrige Enden.

a) Ligationen im Rahmen der Herstellung einer Cosmid-Bank (4.2.2.12) wurden in einem Volumen von 22  $\mu$ l bei 16 °C im Wasserbad ÜN durchgeführt. Es wurden 6  $\mu$ g genomische DNA-Fragmente mit 1  $\mu$ g Cosmid DNA mit 10 U Enzym umgesetzt.

b) Ligationen für die Selbstklonierung (4.2.2.18) von mit Restriktionsenzymen behandelten Fragmenten genomischer DNA interessierender *B. pseudomallei* E8 Mutanten wurden in einem Volumen von 200  $\mu$ l bei 16 °C im Wasserbad ÜN durchgeführt. Es wurden 500–1500 ng DNA mit 10–20 U Enzym umgesetzt.

#### 4.2.2.8 Herstellung von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$ - und SM10-Zellen

a) Elektrokompetente Zellen: 150 ml LBB wurden 1:100 mit einer ÜN-Kultur des Bakterienstammes angeimpft, der durch Elektroporation transformiert werden sollte. Nachdem diese Suspension bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0.3–0.5 gewachsen war, wurde sie für 20 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden für 10 min bei 2600  $\times$  g pelletiert und dreimal in eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 3 ml 10% Glycerin in H<sub>2</sub>O resuspendiert, bevor es im letzten Schritt nach erneuter Zentrifugation in 300  $\mu$ l 10% Glycerin in H<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. Aliquots von 40  $\mu$ l wurden zunächst in flüssigem Stickstoff und dann zur Lagerung bei –80 °C eingefroren.

b) CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen: 100 ml LBB wurden 1:100 mit einer ÜN-Kultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0.3–0.5 bebrütet. Für 15 min ruhten die Zellen auf Eis und wurden dann bei 4 °C und 2600  $\times$  g für 10 min zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen in je 10 ml eiskaltem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> mit anschließender Zentrifugation (10 min, 800  $\times$  g, 4 °C), wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und diese Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden ein letztes Mal zentrifugiert (10 min, 800  $\times$  g, 4 °C), in 2 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub> aufgenommen, mit 1 ml 60% Glycerin in H<sub>2</sub>O versetzt und in Aliquots von 200  $\mu$ l zunächst in flüssigem Stickstoff und schließlich bei –80 °C eingefroren.

#### 4.2.2.9 Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$ - und SM10-Zellen

a) Elektroporation: Für jeden Transformationsansatz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Die Einstellungen am Elektroporationsgerät waren 2.5 kV Spannung, 25  $\mu$ F Kapazität und 400  $\Omega$  Widerstand. Zwei  $\mu$ l des zu transformierenden Plasmids entsprechend ca. 200 ng DNA wurden zu den Zellen gegeben und diese Mischung für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Überführen in eine trockene Elektroporationsküvette wurde die Spannung angelegt. Nach dieser Streßsituation wurden die transformierten Bakterien in 1 ml vorgewärmtem LBB aufgenommen und für 1–2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Bakterien pelletiert und in geringem Volumen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und ÜN bei 37 °C bebrütet. Transformanten wuchsen ÜN zu sichtbaren Kolonien.

b) Chemische Transformation: Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA (maximal 100 ng) wurde in einem Volumen von höchstens 50  $\mu$ l zu den Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung einem Hitzeimpuls von 42 °C für 90 s im Wasserbad ausgesetzt. Es folgten weitere 2 min auf Eis, bevor 1 ml vorgewärmtes LBB zugegeben wurde. Nach 1–2 h bei 37 °C im Schüttelinkubator wurden die pelletierten Bakterien auf Antibiotikaplatten ausplattiert. ÜN-Inkubation bei 37 °C führte zu deutlich sichtbaren Kolonien.

#### 4.2.2.10 Midi-Plasmidpräparation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht auf der Methode der selektiven alkalischen Lyse [8], wobei chromosomale DNA, im Gegensatz zur niedermolekularen Plasmid-DNA, in Einzelstrang-DNA denaturiert. Bei der Neutralisierung renaturiert die chromosomale DNA und formt ein unlösliches Netzwerk mit RNA und Proteinen, während Plasmid-DNA in Lösung bleibt und mit Isopropanol gefällt werden kann. Zentrifugation des Lysats und Einsatz einer Silikasäule erhöhen die Reinheit der Präparation.

Hierzu wurden 100 ml einer ÜN-Kultur zentrifugiert (6000  $\times$  g, 4 °C, 15 min) und das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 gestoppt. Nach 15 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (20000  $\times$  g, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand abgenommen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Eine Säule (Qiagen, Genomic-tip 100/G) wurde mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde zweimal mit Puffer QC gewaschen und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 3.5 ml Isopropanol präzipitiert und zentrifugiert (15000  $\times$  g, 4 °C, 30 min). Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml 70% EtOH und erneuter Zentrifugation wurde die DNA im Vakuum bei 60 °C getrocknet und ÜN in 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst.

#### 4.2.2.11 Quick & Dirty-Plasmidpräparation

Diese Präparation erfolgt nach gleichem Prinzip wie die Midi-Präparation, jedoch in geringerem Volumen und ohne Verwendung der Silikasäule, was Zeitersparnis und verminderte Reinheit des Produktes zur Folge hat. Es wurden 1.5 ml einer ÜN-Kultur zentrifugiert ( $16110 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min) und das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Puffer P2 wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend 100  $\mu\text{l}$  Puffer P3 zugefügt. Nach 5 min Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation ( $16110 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min) wurden 250  $\mu\text{l}$  Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung des Plasmids erfolgt durch Zugabe von 175  $\mu\text{l}$  Isopropanol und Inkubation bei  $-80^\circ\text{C}$  für 15 min. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt ( $16110 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min), bevor die DNA mit 1 ml 70% EtOH gewaschen wurde. Schließlich wurde das Produkt im Vakuum getrocknet und in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

#### 4.2.2.12 Herstellung einer Cosmid-Genbank

SuperCos 1 Cosmid DNA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wird nach erfolgreicher Transformation in DH5 $\alpha$ -Zellen (4.2.2.9) in diesen vermehrt und wie unter 4.2.2.10 beschrieben präpariert. 25  $\mu\text{g}$  Cosmid DNA wurden in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  zur Linearisierung des Vektors mit 9 U/ $\mu\text{g}$  *Xba* I geschnitten (4.2.2.4) und anschließend nach 4.2.2.5a gereinigt. Nach Dephosphorylierung beider DNA-Enden (4.2.2.6) folgte eine Restriktionsspaltung (4.2.2.4) mit 5 U/ $\mu\text{g}$  *Bam*HI, die den Cosmidvektor in zwei Teilstücke von 1.1 und 6.5 kB zerlegt. Diese wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (4.2.2.5b) gereinigt.

Nach Präparation genomischer DNA nach 4.2.2.1 wurde diese folgendermaßen mit *Sau*3A geschnitten: mehrere Gefäße mit gleichen Mengen an DNA-Lösung und benötigtem Puffer wurden vorbereitet. In das erste (mit doppeltem Volumen) wurde 1  $\mu\text{l}$  Enzym (5 U/ $\mu\text{l}$ ) gegeben und vermischt. Die Hälfte davon wurde in das nächste Gefäß pipettiert und vermischt wovon wiederum die Hälfte weitergegeben wurde. Die Enzymkonzentration halbierte sich jeweils, so daß nach einstündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und anschließender Hitzeinaktivierung (30 min bei  $80^\circ\text{C}$  im Wasserbad) unterschiedlich stark geschnittene genomische DNA vorlag. Nach Agarosegelanalytik (4.2.2.2) wurden die Ansätze für weitere Arbeiten ausgewählt, in denen sowohl ungeschnittene als auch DNA-Stücke geringerer Größe gleichzeitig vorhanden waren. Nach Reinigung (4.2.2.5b) und Kombination der DNA aus mehreren Ansätzen wurden sämtliche Enden dephosphoryliert (4.2.2.6) und schließlich diese Produkte erneut nach 4.2.2.5b gereinigt.

Es folgte eine Ligation beider vorbehandelten Nukleinsäuren wie unter 4.2.2.7a beschrieben. Das Verhältnis genomische DNA/Cosmid-Vektor betrug 6:1, wobei insgesamt 7  $\mu\text{g}$  in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurden. Aufgrund der selektiven Dephosphorylierung sollten lediglich Abschnitte willkürlich geschnittener genomischer DNA in den Cosmid Vektor ligiert werden.

Drei  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes wurden zum Verpackungsextrakt aus dem Gigapack III Gold gegeben, der die ligierte, lineare DNA zirkularisiert, um schließlich mit Hilfe eines Phagen



Konstrukte gewünschter Größe (30–42 kb) in den *E. coli*-Empfängerstamm einzubringen. Nach zweistündiger Inkubation bei 22 °C und Zugabe von 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform wurden verschiedene Verdünnungen (1:10–1:100) hergestellt.

50 ml einer ÜN-Kultur (30 °C, Schütteln bei 200 rpm) von *E. coli* XL1 Blue MR in LBB mit 0.2% Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> wurden für 10 min bei 500 × g zentrifugiert und das resultierende Pellet in 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0.5 resuspendiert. Zu jedem der oben beschriebenen Verdünnungen des Verpackungsansatzes wurde das gleiche Volumen Bakteriensuspension gegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT folgte eine Zugabe von je 200 µl LBB mit anschließender Inkubation bei 37 °C im Wasserbad, wobei die Ansätze alle 15 min vorsichtig geschwenkt wurden. Nach 1 h wurden die Suspensionen eine Minute zentrifugiert und die Pellets in je 50 µl LBB resuspendiert, die dann auf LB-Platten mit 200 µg/ml Carbenicillin ausplattiert wurden. Im Gegensatz zum carbenicillinsensiblen *E. coli* wächst die Cosmid-Bank des *B. pseudomallei* E8 in *E. coli* XL1 Blue MR aufgrund der auf dem Cosmid enthaltenen Carbenicillinresistenz ÜN bei 37 °C. Zur Aufbewahrung derselben wurden alle gewachsenen Kolonien in insgesamt ca. 110 ml LBB aufgenommen, mit 10% DMSO versetzt und in Aliquots bei –80 °C eingefroren.

#### 4.2.2.13 Herstellung einer digoxigeninmarkierten DNA-Sonde

Drei oder mehr µg der zu markierenden DNA wurden auf ein Volumen von 15 µl eingeeengt, 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die folgenden Reagenzien des DIG DNA Labeling and Detection Kit wurden hinzugegeben: 2 µl Hexanukleotidmix (Nr. 5), 2 µl dNTP Mix (Nr. 6) und 1 µl Klenow Enzym (Nr. 7). Anschließend wurde gemischt, abzentrifugiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA Lösung wurde die Reaktion gestoppt und die DNA schließlich durch Zugabe von 2.5 µl 4 M LiCl und 75 µl 96% EtOH bei –80 °C für 30 min präzipitiert. Nach 15 min Zentrifugieren (16110 × g, 4 °C) und Waschen mit 50 µl 70% EtOH wurde die Sonde kurz getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Quantifizierung der reinen Sonde wurde nach 4.2.2.14 durchgeführt.

#### 4.2.2.14 Durchführung eines Colony Blot

Zur Herstellung von Abklatschpräparaten wurde die primäre Cosmid-Bank  $1:4 \times 10^5$  in LBB verdünnt. Jeweils 100 µl davon wurden auf LB-Carbenicillin (200 µg/ml) ausgestrichen und für zwei Nächte bei 37 °C bebrütet. Es resultierten Platten mit jeweils ungefähr 200 Kolonien, die numeriert und markiert wurden. Ebenso beschriftete Polyamidmembranen wurden für jeweils mindestens eine Minute auf die Kolonien gelegt, um diese auf die Membranen zu übertragen („abklatschen“). Als Positivkontrolle wurde 1 µg genomische DNA aufgetragen. Zur Bakterienlyse wurden die Membranen mit der Kolonieseite nach oben nacheinander auf jeweils zwei aufeinandergelegte und getränkte Whatman Papiere gelegt: 15 min DNA-I, 5 min DNA-II und 20 min 2 × SSC.

Die DNA der Bakterien wurde durch halbstündiges Backen bei 120 °C auf der Membran fixiert. Bakterienzellreste wurden durch Waschen mit  $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$  bei 65 °C im Hybridisierungssofen entfernt. Nach der Hälfte der Zeit wurde die Waschlösung ausgetauscht und die Membranen vorsichtig mit einem Leinentuch abgerieben. Im nächsten Schritt wurden die Membranen für eine Stunde mit Hybridisierungspuffer bei 65 °C prähybridisiert, um Hintergrundsignale durch unspezifische Bindungen zu eliminieren. Zu 15 ml frischer Hybridisierungslösung wurden je nach Güte der Sonde 5–15 µl Sonde gegeben, die zuvor durch Aufkochen für 10 min und anschließendes rasches Abkühlen auf Eis denaturiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C ÜN im Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wurden die Membranen  $2 \times 30 \text{ min}$  in Wash-I und weitere  $2 \times 30 \text{ min}$  in Wash-II bei 65 °C in einer Schale im Schüttelwasserbad gewaschen.

Hybridisierungsereignisse wurden durch eine Zweistufendetektion durch Antikörper-Konjugat und dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD nachgewiesen. CSPD ist ein Substrat der Alkalischen Phosphatase. Unter alkalischen Bedingungen dephosphoryliert das Enzym CSPD zu einem wenig stabilem Zwischenprodukt, das unter Lichtemission in ein stabiles Endprodukt zerfällt. Dieses Licht wird auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Folgende Behandlungen der Membranen bei RT sind notwendig:

- 5 min Äquilibrieren in Waschpuffer
- 30 min Absättigen in Puffer 2
- 30 min Puffer 2 mit 1:10000 verdünntem anti-DIG-AP-Konjugat
- $3 \times 10 \text{ min}$  Waschpuffer
- 5 min Äquilibrieren in Puffer 3
- 1 min CSPD 1:100 verdünnt in Puffer 3
- 5 min Inkubation der Membranen im Dunkeln
- Einschweißen der Membranen in Plastik und Inkubation bei 37 °C für 15 min
- Exposition eines Röntgenfilms und dessen Entwicklung für 1–30 min

Bakterienkolonien, die mit der eingesetzten Sonde reagiert haben, wurden mit Hilfe des Röntgenfilms auf den Originalplatten identifiziert und isoliert.

#### 4.2.2.15 Southern Blot

Vor dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA wie unter 4.2.2.2. beschrieben in einem Agarosegel aufgetrennt. Zur Fragmentierung von DNA-Molekülen über 10 kb wurde das Gel 20 min in 0.25 M HCl inkubiert und anschließend nacheinander je zweimal 30 min in Denaturierungs- und Neutralisierungslösung gespült. Die Übertragung der DNA auf die Nylonmembran erfolgte durch Kapillartransfer mit  $10 \times \text{SSC}$  als Transferpuffer ÜN in einer Transferpyramide mit einer Pufferkammer und puffergetränkten Filterpapieren unter dem Gel und der Membran, Filterpapier, saugfähigem Papier und einem Gewicht über dem Gel [134]. Auf der noch feuchten Nylonmembran wurden die Geltaschen markiert und die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker) kovalent fixiert. Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde

und anschließende Detektion von positiven Hybridisierungsereignissen wurden wie unter 4.2.2.14 durchgeführt.

#### 4.2.2.16 Transposonmutagenese mit Tn5-OT182

Zur Erstellung einer Mutantenbank mit dem Transposon Tn5 wurde eine Suspension von *B. pseudomallei* E8 WT (ÜN auf Blutplatte bei 42 °C) in 10 mM MgSO<sub>4</sub> hergestellt. Die Konzentration betrug  $3.25 \times 10^7$  Bakterien/ml (1:10 Verdünnung einer Suspension der OD<sub>650</sub> von 0.62). Eine ÜN-Kultur in LBB mit Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin von transformiertem *E. coli* SM10 (4.2.2.9) wurde auf eine OD<sub>650</sub> von 0.8 eingestellt ( $c = 3.25 \times 10^8$  Bakterien/ml). *E. coli* SM10 war zuvor mit aus *E. coli* S17-1(pOT182) präpariertem Plasmid pOT182 (4.2.2.10) transformiert worden. Von beiden Kulturen wurden jeweils 130 µl miteinander gut vermischt und auf einer Blutplatte ausgestrichen. Nach Bebrütung bei 37 °C ÜN wurde der dichte Rasen mit zweimal 2 ml 0.85% NaCl geerntet. Von diesem Mating-Ansatz wurden 100 µl auf LB-Platte mit Streptomycin (selektiert gegen den Donor) und Tetracyclin (selektiert gegen den Empfänger) ausgestrichen. Nach ÜN-Bebrütung bei 37 °C wuchsen ausschließlich Kolonien von mutagenisiertem *B. pseudomallei* mit den entsprechenden Resistenzen. Kontrollen wurden mit beiden Ausgangskulturen durchgeführt [34]. Der verbleibende Mating-Ansatz wurde mit gleichem Volumen 20% Glycerin in LBB versetzt (final 10%) und in Aliquots von 500 µl bei -80 °C eingefroren.

#### 4.2.2.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR [119] wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Oligonukleotiden durchgeführt, die von publizierten Sequenzen abgeleitet wurden. Als Matrize wurde Bakterienmaterial (*B. pseudomallei* E8 WT bzw. Mutante) eingesetzt, aus dem die DNA mit Hilfe einer Fertigreagenz (Genereleaser, Eurogentec) und einer Abfolge von Erhitzungs- und Abkühlungsschritten zugänglich gemacht wurde. Alternativ wurde genomische DNA eingesetzt.

Ansatz: 10 µl Genereleaser, Bakterienkolonie und 1 Tropfen Mineralöl.

Programm:	65 °C	30 s
	8 °C	30 s
	65 °C	90 s
	97 °C	180 s
	8 °C	60 s
	65 °C	180 s
	97 °C	60 s
	65 °C	60 s
	80 °C	hold

Nach Ablauf dieses Programmes wurde 100 µl Reaktionsansatz hinzugefügt:

67.7 µl	H <sub>2</sub> O
10.0 µl	DMSO
10.0 µl	dNTPs (c = 2 mM)
10.0 µl	10 × PCR-Puffer
1.0 µl	Primer 1 (c = 0.1 pM)
1.0 µl	Primer 2 (c = 0.1 pM)
0.3 µl	Taq Polymerase

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

Vordenaturierung	94 °C	180 s
Strangtrennung	94 °C	45 s
Hybridisierung	52 °C	60 s
DNA-Synthese	72 °C	45 s
Finale	72 °C	300 s

Folgende Oligonukleotide wurden zur Synthese eingesetzt:

- BF1 und SH3 für PLC-Sonde von *B. pseudomallei* (598 bp)
- BF4 und SH3 für PLC-Sonde von *B. pseudomallei* (91 bp)
- BF7 und BF8 für Transposonsonde 5'-Ende (802 bp)
- BF9 und BF10 für Transposonsonde 3'-Ende (764 bp)
- BF11 und BF12 für *stramp* (1497 bp)
- BF13 und BF14 für *fliC* (1512 bp)

#### 4.2.2.18 Selbstklonierung von Transposonmutanten

Die Selbstklonierung von Transposonmutanten ermöglicht die Sequenzierung der das Transposon flankierenden DNA. Mit Hilfe der vom Sanger Institute, Cambridge, zur Verfügung gestellten Sequenzierungsdaten von *B. pseudomallei* (Stamm K96243) wurden diese Sequenzfragmente zu kompletten Genen vervollständigt. Hierzu wurde nach Präparation der genomischen DNA (4.2.2.1) deren Konzentration und Reinheit (4.2.2.3) auch durch Agarosegelelektrophorese (4.2.2.2) bestimmt. 5–8 µg chromosomaler DNA wurden je nach Bedarf mit den Enzymen *Bam*HI, *Cla* I, *Eco*RI, *Hind*III oder/und *Sal*I inkubiert (4.2.2.4). Nach elektrophoretischer Kontrolle im Agarosegel (4.2.2.2) wurden ca. 500–1500 ng DNA mit sich selbst ligiert (4.2.2.7). Reinigung der Produkte (4.2.2.5a) lieferte 50 µl DNA-Lösung. Von dieser Lösung wurden 2–5 µl zur Transformation von kompetenten *E. coli*-DH5α-Zellen eingesetzt (4.2.2.9). Das Plasmid der auf Antibiotikaplatten gewachsenen Transformanten wurde nach Kontrolle mittels Quick & Dirty-Präparation (4.2.2.11) präpariert (4.2.2.10) und zum Sequenzieren mit dem Primer BF5 (für Selbstklonierung mit *Bam*HI, *Cla* I und *Eco*RI) bzw. BF6 (für Selbstklonierung mit *Sal*I und *Hind*III) verwendet.

#### 4.2.2.19 Sequenzierung von Nukleinsäuren

1–10 µg der zu sequenzierenden DNA wurden von MWG Biotech im Auftrag sequenziert.

#### 4.2.2.20 Identifizierung des zerstörten Gens

Die Sequenz der das Transposon flankierenden DNA diente als Basis zur Bestimmung des zerstörten Gens. Die experimentell ermittelte Gesamtsequenz wurde um die darin enthaltene Sequenz des Transposonendes reduziert. Die verbleibende Basenabfolge des zerstörten Gens wurde mit Hilfe von BLAST zunächst einem Contig zugeordnet, d.h. einem Abschnitt genomischer DNA des *B. pseudomallei*-Stammes K96243. Die Übereinstimmung betrug mindestens 98%. Mehrere tausend Basen vor und nach der identifizierten Sequenz wurden angefügt, bevor in einem weiteren Schritt mit Hilfe des Sequenzanalyseprogrammes DNASTar ein ORF (*open reading frame*) bestimmt wurde, der die zunächst sequenzierte Basenfolge umschloß bzw. einen Teil beinhaltete. Das resultierende Gen wurde mit Sequenzen vorhandener Datenbankeinträge verglichen. Zur weiteren Charakterisierung wurde das Gen in die Aminosäuresequenz translatiert, um auch auf Proteinebene einen Vergleich mit BLAST durchzuführen. Eine weitere Analyse des abgeleiteten Proteins wurde mit PredictProtein (<http://www.expasy.org>) durchgeführt.

#### 4.2.2.21 *In trans*-Komplementation von Transposonmutanten

Durch die *in trans*-Komplementation soll die Funktion eines in einer Mutante zerstörten Gens wiederhergestellt werden. Hierzu wurde das durch das Transposon zerstörte Gen (zuzüglich 200–400 Basen vor dem Startcodon, um eventuelle Promotorregionen zu erfassen) mittels PCR mit spezifischen Primern (4.2.2.17) synthetisiert. Auf den Primern befinden sich Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Hind*III. Jeweils 2 µg PCR-Produkt und Vektor pBBR1-MCS-2 mit Kanamycinresistenz und gleichen Schnittstellen wurden mit den genannten Endonukleasen inkubiert (4.2.2.4). Nach Reinigung (4.2.2.5a) und Ligation der Teilstücke (4.2.2.7) folgte Transformation von *E. coli* DH5α-Zellen (4.2.2.9b). Eine ÜN-Kultur eines als positiv getesteten Transformanten (4.2.2.11) wurde, ebenso wie der Helferstamm *E. coli* Hb101 pRK2013, auf eine OD<sub>650</sub> von 0.8 eingestellt, während die zu komplementierende Mutante in einer 1:10-Verdünnung einer Suspension der OD<sub>650</sub> von 0.62 eingesetzt wurde. Von allen drei Suspensionen wurden jeweils 100 µl miteinander gut vermischt und auf einer Blutplatte ausgestrichen. Nach Bebrütung bei 37 °C ÜN wurde der dichte Rasen mit zweimal 2 ml 0.85% NaCl geerntet. Von diesem Mating-Ansatz wurden 100 µl auf LB-Platte mit Kanamycin (selektierte komplementierte Mutanten) und Tetracyclin (selektierte gegen den Donor- und den Helferstamm) ausgestrichen. Nach ÜN-Bebrütung bei 37 °C wuchsen ausschließlich Kolonien von komplementierten *B. pseudomallei*-Mutanten mit Kanamycinresistenz. Es wurde kontrolliert, daß weder E8-Mutanten noch beide eingesetzten *E. coli* in der Lage sind auf LB-Agar mit einer derart hohen Kanamycinkonzentration (500 µg/ml) zu wachsen.

### 4.2.3 Arbeiten mit *Caenorhabditis elegans*

Alle Experimente mit *C. elegans* wurden grundsätzlich mit Monokulturen von L4-Larven und bei RT durchgeführt. Als bakterielle Nahrungsquelle für Erhalt und Anzucht der Tiere wurde der Stamm *E. coli* OP50 verwendet. Generell dienten bei der Durchführung aller Experimente die veröffentlichten Standardmethoden von Hope als Basis [60].

#### 4.2.3.1 Kulturerhaltung von *C. elegans*

Sowohl der N2-Wildtypstamm als auch die verwendeten Wurmmutanten konnten wochenlang auf mit *E. coli* bewachsenen NGM-Platten bei RT gehalten werden. Zum Erhalt reproduktionsfähiger Würmer wurde einmal wöchentlich ein gut mit *C. elegans* besiedeltes Agarstück mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und steril auf eine frische Platte übersetzt.

#### 4.2.3.2 Eipräparation zum Erhalt von synchronisierten Kulturen

Zur Präparation von Monokulturen waren NGM-Platten mit einer möglichst hohen Anzahl von Eiern erforderlich. Es hat sich herausgestellt, daß dieses Ziel zuverlässig erreicht wurde, wenn ein Agarstück einer Platte, auf die zwei Tage zuvor ein Agarstück übersetzt worden war, erneut auf eine frische Platte gegeben wurde. Am nächsten Tag hatten die adulten Tiere ausreichend Eier gelegt. Diese wurden zweimal mit je 2 ml sterilem H<sub>2</sub>O pro Platte geerntet und in einem 15 ml-Gefäß gesammelt. Ein Gemisch aus 600 µl sterilem H<sub>2</sub>O, 500 µl Natriumhypochlorit (12%) und 400 µl 5 M NaOH wurde hinzugefügt und gut vermischt. Würmer jeden Stadiums wurden über einen Zeitraum von 10 min zersetzt, wobei alle 2 min gut gemischt wurde. Die zurückbleibenden Wurmeier wurden von den Zellresten und von dem von den Ausgangsplatten mitgespültem *E. coli* gereinigt, indem sie zweimal mit sterilem M9-Puffer gewaschen wurden. Hierzu wurden die Gefäße aufgefüllt und für 30 s bei 515 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde vor dem nächsten Waschschrift abpipettiert. Die resultierenden Eier wurden in einem Volumen von etwa 100 µl in 30 ml M9-Puffer mit zugesetztem *E. coli* als Nahrungsquelle gegeben. Nach ca. drei Tagen auf einem Schüttler bei 80 rpm und RT hatten sich L4-Larven entwickelt.

#### 4.2.3.3 Bestimmung von Sterbekinetiken von *C. elegans* durch *B. pseudomallei*

Kinetische Untersuchungen wurden unter slow killing- (NG-Agar), fast killing- (PGS-Agar) sowie modifizierten fast killing- (PGS ohne Pepton-Agar) Bedingungen in Petrischalen mit Ø = 5.5 cm durchgeführt. Die zu analysierenden Mutanten sowie *B. pseudomallei* E8 WT und *E. coli* OP50 als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden entweder über mehrere Stunden in LBB frisch angezüchtet oder von frischer Platte in LBB eingerieben. Die Konzentrationen wurden durch Messung der OD<sub>650</sub> bestimmt und die Suspensionen auf ca. 1.5 × 10<sup>4</sup> Bakterien/ml eingestellt. Jeweils 100 µl davon wurden sowohl auf slow killing- als auch auf fast killing-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37 °C bebrütet. Für das modifizierte fast killing wurden je 400 µl der unverdünnten Suspensionen auf die PGS ohne Pepton Platten gegeben.

Diese wurden steril getrocknet und verblieben ÜN bei RT. Am folgenden Tag wurden auf jede Platte jeweils ca. 50–100 N2-Würmer pipettiert. Nach dem Trocknen wurden sie bei RT gelagert und die Anzahl toter und lebendiger Tiere nach 2, 6, 12, 24, 30 und 48 h ausgezählt.

#### 4.2.3.4 Screening von Transposonmutanten im *C. elegans*-Modell

Die einzelnen Kolonien der Mutanten wurden mit Zahnstocher in je 250 µl LB-Tet/Strep mit 10% Glycerin überführt und 1:10 in LBB verdünnt. Davon wurden je 30 µl in Doppelwerten in Wells mit je 1 ml slow killing- bzw. fast killing-Agar gegeben und so geschwenkt, daß die gesamte Fläche bedeckt war. Diese Platten wurden bei 37 °C ÜN bebrütet. Die restlichen Mutantenverdünnungen wurden ebenfalls bei 37 °C ÜN bebrütet. Am nächsten Tag wurden je 100 µl in Wells mit PGS ohne Pepton-Agar für ein Screening unter modifizierten fast killing-Bedingungen gegeben. Nach dem Trocknen der zuletzt genannten Platten wurden in alle Wells der drei Plattensorten jeweils ca. 30–40 N2-Würmer im Larvenstadium L4 gegeben. Die Würmer wurden 2-3 mal täglich kontrolliert. Bei auffälligem Verhalten, d.h. längerer Fitneß der Würmer auf bestimmten Mutanten, wurden Wiederholungen und auch Kinetiken des Wurmsterbens auf den entsprechenden Mutanten (4.2.3.3) durchgeführt.

Sollten eingefrorene Mutanten verwendet werden, so wurden je 35 µl einer 1:100 Verdünnung in Wells mit slow killing- bzw. fast killing-Agar gegeben. Diese Platten sowie die verbleibenden Verdünnungen wurden ÜN bei 37 °C bebrütet. Von diesen Suspensionen wurden je 100 µl in Doppelwerten in Wells der PGS ohne Pepton-Platten (modifiziertes fast killing) gegeben und wie oben beschrieben weiter verfahren.

#### 4.2.3.5 Durchführung des Filter-Assays

Mit diesem Assay soll die Auswirkung potentiell sezernierter Bakterientoxine ohne direkten Kontakt auf *C. elegans* untersucht werden. Hierzu wurden je 100 µl ÜN-Kultur (LBB) der zu untersuchenden Bakterien mit Hilfe eines mit der entsprechenden Bakteriensuspension angefeuchteten Wattebausches auf einem Nitrocellulosefilter ( $\varnothing = 4.7$  cm) verteilt, der auf PGS ohne Pepton- bzw. slow-killing-Agar Platten ( $\varnothing = 5.5$  cm) lag. Diese Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der Filter wurden 50–100 Würmer auf die Platten gegeben und die Anzahl von toten und lebenden Tieren zu mehreren Zeitpunkten bestimmt. Die Sterilität der Agarplatten wurde überprüft, indem eine Tupferprobe auf Blutplatte ausgestrichen und bebrütet wurde.

#### 4.2.3.6 Experimente zur Detektion des *B. pseudomallei* Exotoxins

Nachdem gezeigt wurde, daß *B. pseudomallei* im Filter-NC-Assay unter bestimmten Kulturbedingungen und vor allem ohne direkten Kontakt zu *C. elegans* (4.2.3.5) lethal wirkt, sollte die verursachende Substanz näher charakterisiert werden. Hierzu wurde flüssiges fast killing-Medium (fast killing-Agar ohne Agar) mit *B. pseudomallei* E8 WT und *E. coli* OP50 zum Vergleich angeimpft und unterschiedlich lange (1-23 Tage) bei 37 °C unter Schütteln

bebrütet. Die Suspensionen wurden ca. 1 h bei  $5900 \times g$  zentrifugiert und die Überstände sterilfiltriert. Die resultierenden sterilen Filtrate wurden mit gleichem Volumen doppelt konzentriertem Bactoagar vermischt um daraus Platten zu gießen. Das Verhalten von auf diesen Platten ausgesetzten *C. elegans* L4-Larven bei RT wurde beobachtet. Im weiteren Verlauf der Experimente wurden die Würmer direkt in sterile Filtrate unterschiedlich alter (1-12 Tage) Bakteriensuspensionen von *B. pseudomallei* und *E. coli* in flüssigem fast killing-Medium gegeben (Schütteln bei RT). Es wurden Kontrollen mit Würmern in sterilem fast killing-Medium und M9-Puffer durchgeführt. Zwei bis dreimal täglich wurden je 500 µl-Aliquots entnommen und der Zustand der Tiere beobachtet.

#### **4.2.4 Untersuchungen zur Virulenz von *B. pseudomallei* in der Maus**

Alle Arbeiten im Mausmodell wurden mit weiblichen 8-12 Wochen alten Balb/c oder C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Sie wurden bei RT gehalten und mit Futter und Wasser *ad libitum* versorgt. Die Infektionsversuche wurden unter Beteiligung von Frau Jessika Garlich im Rahmen des genehmigten Versuchstivorhabens Az. 509i-42502-99/219 durchgeführt.

##### **4.2.4.1 Infektion von Balb/c- und C57BL/6-Mäusen**

Vor der Infektion wurden die Tiere jeweils mit 150 µl einer Lösung aus 0.1% Xylazinhydrochlorid und 1% Ketaminhydrochlorid in 0.9% NaCl narkotisiert. Drei bis sechs Tiere wurden bei jedem Experiment mit der gleichen Dosis der Bakterien in Puffer A infiziert. Intranasale Infektionen wurden mit einem Volumen von 30 µl in beide Nasenlöcher und intravenöse Infektionen in einem Volumen von 200 µl in die Schwanzvene durchgeführt. Die Infektionsdosis schwankte je nach Fragestellung, Bakterien- und Mausstamm. Nach der Infektion wurden die Tiere zurück in den Käfig gelegt, der verschlossen und mit Klebeband abgedichtet wurde. Zur Bestimmung der tatsächlich eingesetzten Dosis wurden die CFU von Aliquots mehrerer Verdünnungen der Infektionslösung nach 48 h bei 37 °C ausgewertet. Die Vitalität der Mäuse wurde mindestens einmal täglich kontrolliert und protokolliert.

##### **4.2.4.2 Keimzahlbestimmung in infizierten Mäusen**

Die Mäuse wurden unmittelbar vor der Sektion auf Trockeneis in einem verschlossenen Becherglas getötet. Nach oberflächlicher Desinfektion mit 70% EtOH wurden die Tiere auf einem Styroporbrett fixiert und die benötigten Organe wie Milz, Leber und Lunge aus geöffneter Bauchhöhle entnommen. Sie wurden in je 3.5 ml steriler Tergitollösung aufgenommen. Nach steriler Homogenisierung wurde von jeder Organsuspension eine Verdünnungsreihe in Puffer A hergestellt, die jeweils doppelt auf Ashdown-Platten ausplattiert wurden. Die tatsächlichen Keimzahlen in den Organen wurden aus der Anzahl der auf den Selektionsplatten nach 48 h bei 37 °C gewachsenen Kolonien berechnet. Zur statistischen Bewertung der ermittelten Unterschiede in den Mittelwerten der einzelnen Gruppen wurde ein t-test mit Hilfe von SigmaPlot durchgeführt.



## 4.2.5 Biochemische Experimente

### 4.2.5.1 Nachweis der Cyanidproduktion von Bakterien

Bakteriell produziertes Cyanid kann durch eine zweistufige Reaktionsfolge nachgewiesen werden. Cyanid kann spezifisch mit der Aldehydfunktion von *p*-Nitrobenzaldehyd zum entsprechenden reduzierenden Cyanhydrin reagieren. Dieses setzt anschließend *o*-Dinitrobenzol zum lilafarbenen Dianion von *o*-Nitrophenylhydroxamin um, welches bei einer Wellenlänge von 578 nm photometrisch bestimmt wird [50].

Hierzu wurden 150  $\mu$ l  $\ddot{U}$ N-Kultur (BHI-Bouillon) der zu untersuchenden Bakterien f $\ddot{u}$ r 24 h auf BHI-Platten ( $\varnothing = 3.5$  cm) bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert. Jeweils eine dieser Platten wurde ge $\ddot{o}$ ffnet in eine Petrischale ( $\varnothing = 10$  cm) neben eine ebenfalls ge $\ddot{o}$ ffnete, gleichgro $\ddot{u}$ e Petrischale mit 1 ml 4 M NaOH gestellt. Nach luftdichtem Verschlie $\ddot{s}$ en der gro $\ddot{u}$ en Petrischale mit Parafilm und Inkubation bei 30  $^{\circ}$ C f $\ddot{u}$ r 4 h wurde ein Aliquot der NaOH bis zu einer Konzentration von 0.09 M verd $\ddot{u}$ nt. Zur Darstellung einer Eichgerade wurde eine Verd $\ddot{u}$ nnungsreihe von KCN in 0.09 M NaOH vorbereitet. Jeweils 210  $\mu$ l der verschiedenen Verd $\ddot{u}$ nnungsstufen bzw. der zu untersuchenden Proben wurden zu 700  $\mu$ l einer frisch hergestellten 1:1-L $\ddot{o}$ sung von 0.1 M *o*-Dinitrobenzol in Ethylenglycolmonoethylether und 0.2 M *p*-Nitrobenzaldehyd in gleichem L $\ddot{o}$ sungsmittel gegeben. Nach Inkubation bei RT f $\ddot{u}$ r 30 min wurde die OD<sub>578</sub> gemessen und daraus die von den Bakterien produzierte Menge an Cyanid errechnet.

### 4.2.5.2. Nachweis von Phospholipase im NPPC-Assay

50  $\mu$ l 0.02 M *p*-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC) in 0.25 M Tris-HCl pH 7.2 wurden mit 50  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe vermischt und eine Stunde bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert. Bei Anwesenheit von Phospholipase C oder D in der Probe wird das farblose Substrat NPPC zu tiefgelbem *p*-Nitrophenol hydrolysiert, dessen Absorption bei 405 nm detektiert wurde [78].

### 4.2.5.3 Biochemisch-funktionelle Screening-Assays f $\ddot{u}$ r Transposonmutanten

F $\ddot{u}$ r das Screening der Transposonmutanten wurden die in 96-Well-Platten gez $\ddot{u}$ chteten Mutanten sowie *B. pseudomallei* E8 WT und *E. coli* OP50 zum Vergleich mit Hilfe zweier „Igel“ (halbgef $\ddot{u}$ llte Pipettenkiste mit sterilen, gelben Spitzen) jeweils auf zwei Platten zur Durchf $\ddot{u}$ hrung jeden Assays  $\ddot{u}$ berimpft. Nach 1–4 Tagen erfolgte die Auswertung.

Chitinase-Assay: CM-Chitin-RBV-L $\ddot{o}$ sung (2 mg/ml, Loewe Biochemica) wurde  $\ddot{U}$ N bei 4  $^{\circ}$ C in H<sub>2</sub>O dialysiert, um Natriumazid zu entfernen. Die gereinigte L $\ddot{o}$ sung wurde am Folgetag zum Plattengie $\ddot{s}$ en mit einem gleichem Volumen doppelt konzentriertem LB-Agar vermischt. Bei positiver Reaktion auf den lilafarbenen Platten bildete sich ein heller Hof um die Bakterien.

H $\ddot{a}$ molyse-Assay: Zu BHI-Agar wurden mindestens viermal mit sterilem Puffer A gewaschene Erythrocyten (jeweils Zentrifugation f $\ddot{u}$ r 4 min bei 514  $\times$  g) gegeben, so da $\ddot{s}$  die

Endkonzentration 5% betrug. Bei positiver Reaktion bildete sich nach 48 h ein klarer Hof auf dem roten Agar.

Lecithinase-Assay: Zum Nachweis der Lecithinase-Aktivität der Bakterien wurde Lecithinase-Agar (1% Pepton, 1% Fleischextrakt, 0.5% NaCl, 1.6% Agar, 50 ml Eigelb/l, pH 7.3) der Fa. Heipha eingesetzt. Bei positiver Reaktion bildete sich eine weiß/perlmutterfarbene Trübung um die Kolonien auf den gelblich trüben Platten.

Motilitäts-Assay: Zu LBB wurde technischer Agar gegeben bis die Endkonzentration 0.3% betrug. Bewegungsfähige Bakterien entfernten sich gleichmäßig vom Animpfort [34].

Protease-Assay: Zu LB-Agar wurde eine 20% Lösung von Magermilchpulver in sterilem Puffer A gegeben, die zuvor mindestens eine Stunde im Wasserbad gekocht wurde. Die Endkonzentration von Magermilchpulver in den LB-Platten betrug 2%. Bei positiver Reaktion bildete sich ein klarer Hof um die Kolonien auf dem milchigen Agar [33].

Siderophor-Assay:

Farbkomplexlösung: A: 60.5 mg Chrome Azur S (CAS) in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen

B: 1 mM FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 10 mM HCl (nicht autoklavierbar)

C: 72.9 mg HDTMA in 40 ml H<sub>2</sub>O suspendieren

Zehn ml Lösung B wurden zu Lösung A gegeben. Die erhaltene Lösung wurde anschließend zu Lösung C gegeben. Die resultierende tiefblaue Farbkomplexlösung wurde autoklaviert. Eine Lösung von 750 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml 10 × MM9 Puffer, 30.24 g PIPES sowie 15 g Agar wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen dieser Lösung auf ca. 60 °C wurden 30 ml 10% Casamino Acid-Lösung (sterilfiltriert) und 100 ml Farbkomplexlösung hinzugefügt, bevor dicke Platten (ca. 30 ml) gegossen wurden. Bei Siderophorproduktion der Bakterien wurde dem tiefblaugrünem Farbkomplex das Zentralion Eisen entzogen und ein Farbumschlag nach gelb trat ein [123].

Sudan Schwarz B-Assay: Der Farbstoff Sudan Schwarz B wurde in einer Konzentration von 0.02% in 96% EtOH gelöst. Nach 3–4 Tagen Wachstum auf MH-Platten wurden die Kolonien ca. 15 min mit der Färbelösung bedeckt. Bei positiver Reaktion bleibt die Farbe nach zweimaligem Waschen für 10 min mit 96% EtOH erhalten [90].

#### 4.2.5.4 Präparation von Überständen und zellulären Extrakten für die 2D-gelelektrophoretische Proteinanalyse

Zur Analyse der Proteine von *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante P7:80 wurden 500 ml Vogel-Bonner-Medium mit 500 µl einer ÜN-Kultur des jeweiligen Bakteriums angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 140 rpm bis zu einer OD<sub>650</sub> von 0.7-0.8 inkubiert. Nach nahezu zwei Tagen folgte Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 6000 × g. Überstand und Pellet wurden wie folgt beschrieben getrennt verarbeitet [152].

a) Überstand: Nach Sterilfiltration (Porengröße 0.2 µm) und Zugabe von Desoxycholin bis zu einer Endkonzentration von 0.2 mg/ml wurde die Lösung 30 min auf Eis gehalten. Zu 500 ml Überstand wurden 120 ml 30% TCA (final 6%) gegeben und die resultierende Fällung der

Proteine durch Inkubation bei 4 °C ÜN unterstützt. Erneutes Zentrifugieren (18000 × g, 30 min, 4 °C) pelletierte die Proteine. Diese wurden in 5 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 40 ml eiskaltem Aceton versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei -20 °C und einem weiteren Zentrifugationsschritt (3500 × g, 20 min, 4 °C) wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in 2-3 ml Solubilisierungslösung aufgenommen und mehrfach mit Ultraschall behandelt. Aufbewahrung und Transport zur GBF erfolgten bei -20 °C.

b) Zellulärer Extrakt: Das aus dem ersten Zentrifugationsschritt resultierende Pellet wurde zweimal mit je 40 ml Puffer A gewaschen und anschließend zentrifugiert (6000 × g, 15 min und 4 °C). Die leicht getrockneten Zellen wurden in einigen ml Solubilisierungslösung aufgenommen und mit Ultraschall behandelt. Auch diese Proben wurden bei -20 °C gelagert und transportiert.

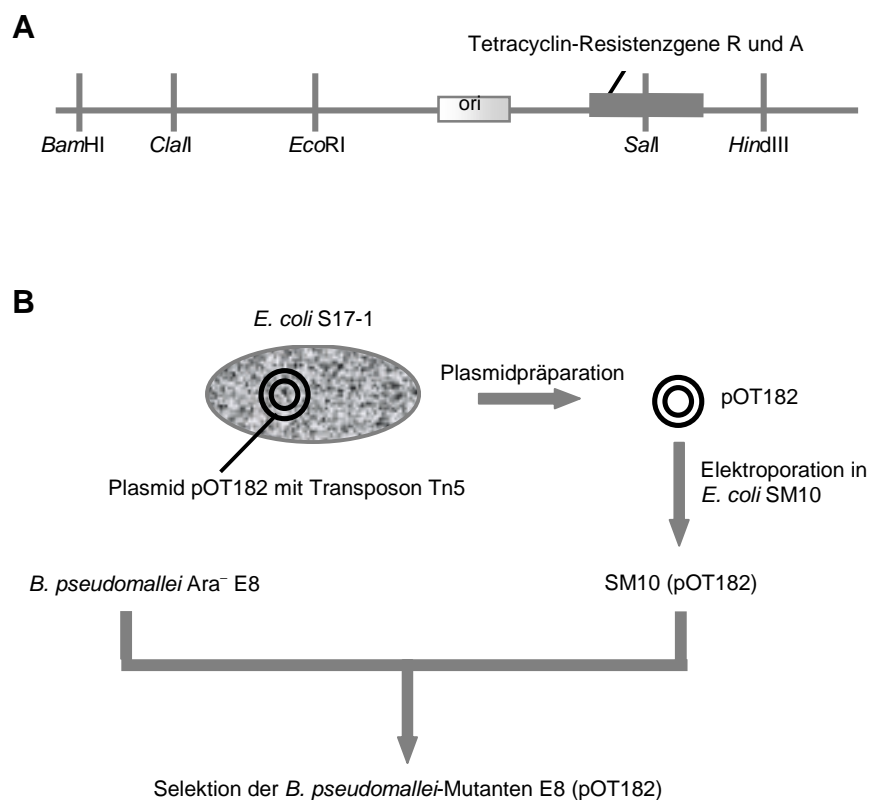
#### **4.2.5.5 Durchführung der 2D-gelelektrophoretischen Proteinanalyse**

Diese Arbeiten wurden in der Abteilung Zellbiologie (Leitung Professor Dr. Jürgen Wehland) der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durch Senthil Selvan Saravanamuthu durchgeführt. Nach Ultrazentrifugation (50000 × g, 40 min, 15 °C) und Proteingehaltsbestimmung des Überstandes wurde eine 2D-Gelelektrophorese nach Standardmethoden [152] durchgeführt. Zur isoelektrischen Fokussierung wurden kommerziell erhältliche IPG-Gelstreifen der Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Immobiline DryStrip, 18 cm) und Bio-Rad (ReadyStrip IPG Strip, 17 cm) verwendet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Transposonmutagenese des Genoms von *Burkholderia pseudomallei*

Die Transposonmutagenese von *B. pseudomallei* Umweltisolat E8 wurde mit dem Tn5-Derivat Tn5-OT182 [128, 7, 96] durchgeführt. Diese bewährte Technologie erzeugt Mutanten gram-negativer Bakterien in hoher Frequenz und zufallsmäßiger Verteilung im Genom [7]. Das Transposon ist genetisch gut charakterisiert und enthält eine Tetracyclinresistenz zur späteren Selektion der Mutanten. Zusätzlich beinhaltet dieses Transposon den pBR325 *origin of replication*, was eine Selbstklonierung, und damit die Bestimmung der das Transposon flankierenden DNA ermöglicht. Das Transposon und der Ablauf der Mutagenese sind schematisch in Abb. 3 dargestellt. Erste Versuche zeigten, daß die praktische Durchführung der Mutagenese vereinfacht werden kann, und es günstig ist, die Wachstumstemperatur des Wildtyps und die Bakteriendichte der Suspensionen zu verändern. Insbesondere kann auf den bei DeShazer et al. beschriebenen Einsatz von Filtern zum Mating verzichtet werden. Durch



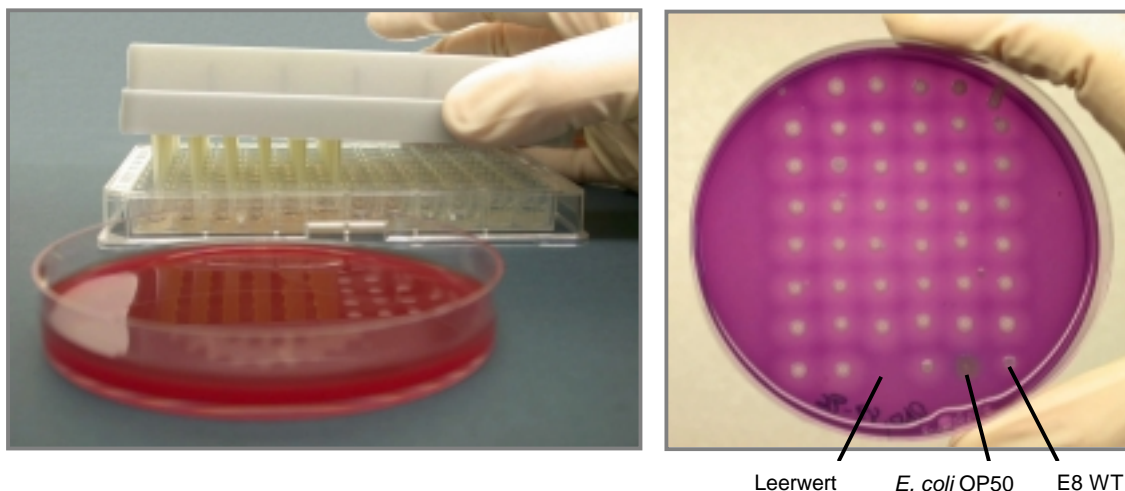
**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Transposons Tn5-OT182 und Herstellung einer Transposon-Mutantenbank. (A) Das Transposon besteht aus 10.705 Basen. *ori* bezeichnet den pBR325 *origin of replication*. Daneben befinden sich die Tetracyclinresistenz-Gene R und A. Die in dieser Arbeit relevanten fünf Schnittstellen für Endonukleasen sind angegeben. (B) Nach Präparation des Plasmids pOT182 mit dem darin enthaltenen Transposon Tn5 wurde dies durch Elektroporation in *E. coli* SM10 eingebracht. Bei gemeinsamer ÜN-Inkubation von Donor- und Empfängerorganismus wurde pOT182 durch Ausbildung von Sexpili und nachfolgende Konjugation übertragen. *B. pseudomallei*-Transposonmutanten mit Tetracyclinresistenz wuchsen im Gegensatz zu beiden Ausgangsorganismen auf LB-Tetracyclin/Streptomycin-Antibiotikaplatten.

den Einsatz von Blut- anstatt LB-MgSO<sub>4</sub>-Platten zum Mating wurde die Mutantenausbeute um etwa den Faktor 10 erhöht. Ausplattieren des Matingansatzes und nachfolgendes Auszählen der Mutanten auf Selektionsplatten ergab eine hohe Mutagenesefrequenz: etwa jedes 200. der eingesetzten Wildtypbakterien wurde mutagenisiert. Ausgehend von diesen Kolonien wurden etwa 1200 Mutanten in 96-Well-Platten isoliert und angezüchtet, die bei -80 °C gelagert wurden und bei Bedarf für weitere experimentelle Arbeiten eingesetzt wurden. Durch die mittlerweile vollständig bekannte Genomsequenz des Stammes K96243 (Sanger Institut, Cambridge; <http://www.sanger.ac.uk>) ist nach Detektion interessierender Mutanten auch eine Bestimmung der zerstörten Gene und nachfolgend ein Vergleich auf DNA- und Proteinebene möglich. Für die Identifizierung von potentiellen Virulenzfaktoren von *B. pseudomallei* ist somit eine umfassende Basis gegeben.

## 5.2 Biochemisch-funktionelles Screening der Mutantenbank

In einem ersten Schritt müssen potentiell virulenzreduzierte Mutanten identifiziert werden. Hierzu wurden einerseits biochemische Assays zur Untersuchung eines breiten Spektrums bakterieller Funktionen und andererseits ein direktes Virulenzscreening im *in vivo*-Assay unter Verwendung von *C. elegans* (5.3) herangezogen.

In technischer Hinsicht wurden mit Ausnahme des *C. elegans*-Assays alle Untersuchungen der einzelnen Mutanten in Petrischalen mit unterschiedlichen Agarsorten durchgeführt. Hierzu wurden die in 96-Well-Platten vorliegenden Mutanten sowie *B. pseudomallei* E8 WT und *E. coli* OP50 als Positiv- bzw. Negativkontrolle mit Hilfe eines „Igels“ (halbe Pipettenkiste mit sterilen, gelben Spitzen) auf jeweils zwei Platten für die verschiedenen Assays übertragen. Inkubation der angeimpften Platten bei 37 °C liefert nach ein bis zwei Tagen auswertbare Ergebnisse (Abb. 4). Diese Methode ermöglicht das Testen einer hohen Anzahl von Mutanten in allen Assays unter geringem Zeit- und Kostenaufwand.



**Abbildung 4:** Übertragung der Mutanten aus 96-Well-Platten mit Hilfe der Igeltechnik und inkubierte Platte zur Auswertung. Links ist das „Igeln“ auf eine Hämolyseplatte gezeigt und rechts eine Chitinaseplatte nach erfolgter Inkubation. Markiert sind Leerwert sowie Negativ- (*E. coli* OP50) und Positivkontrollen (E8 WT).

### 5.3 *In vivo*-Virulenzscreening der Mutanten im *Caenorhabditis elegans*-Assay

Die Plattenassays sind geeignet, um Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp bezüglich ausgewählter Eigenschaften festzustellen. Die resultierenden Konsequenzen, insbesondere bezüglich der Pathogenität, müssen in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Im Gegensatz dazu ist es im Tiermodell mit dem Nematoden direkt möglich, die Auswirkung einer Mutation im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten.

Methodisch beruhen die Analysen des *C. elegans*-Screenings auf drei verschiedenen Agarsorten, die sich in der Komposition des Mediums unterscheiden. Hierdurch wird zum einen die Untersuchung der beiden bekannten Sterbemechanismen - slow und fast killing - und zum anderen der Unterschied zwischen *B. pseudomallei* und dem nicht pathogenen *B. thailandensis* im menschlichen Wirt auch im Wurmmodell deutlich. Von den Mutanten wurden Suspensionen definierter Konzentration hergestellt, von denen kleine Volumina in 24-Well-Platten verteilt wurden. Nach ÜN-Bebrütung der Platten wurden ca. 30-40 L4-Larven in jedes Well gegeben. Im Experiment selbst werden die Tiere möglichst oft beobachtet und Verhaltensänderungen gegenüber Würmern, die dem Wildtyp ausgesetzt sind, festgehalten.



**Abbildung 5:** Synchronisierte Kultur von *C. elegans* zum Screening von *B. pseudomallei*-Transposonmutanten.

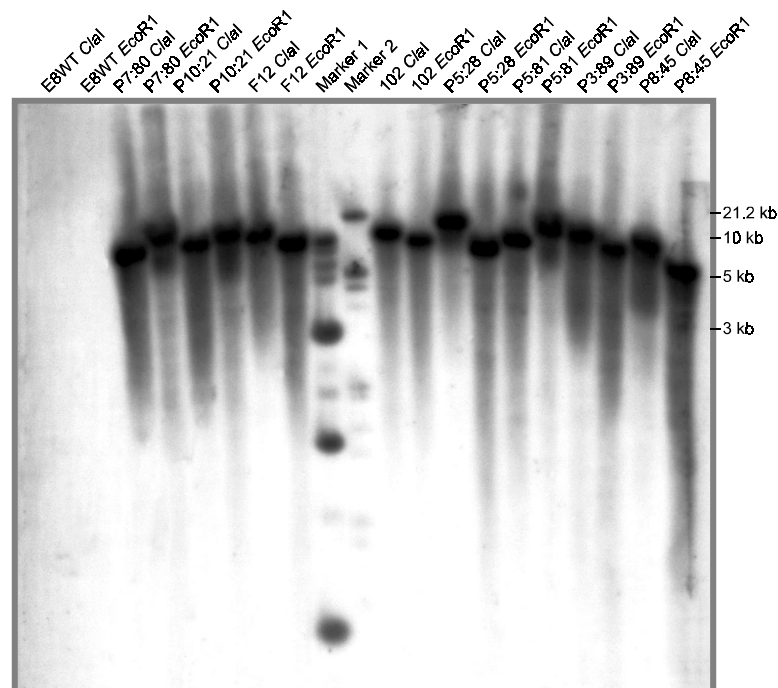
### 5.4 Identifizierung von potentiell virulenzreduzierten Mutanten

Im Verlauf dieser Arbeit wurden etwa 1200 Mutanten in acht in Tabelle 1 genannten Assays untersucht, wobei jeweils mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Schon makroskopisch offenbarten sich auf den verschiedenen Agarsorten deutliche Unterschiede zwischen den Mutanten. Einige bislang nicht näher untersuchte Mutanten wuchsen mit leuchtend gelber Farbe, andere mit eher rauher Kolonieoberfläche, während wieder andere durch ein deutlich kleineres Koloniewachstum auffielen. Die überwiegende Anzahl von Mutanten offenbarte ihren auffälligen Phänotyp erst in nachfolgend durchgeführten verschiedenen Screeningassays. Eine Auswahl von Mutanten, die bezüglich einer möglichen Virulenzreduktion interessant erschien, wurden darüberhinaus molekulargenetisch und proteinchemisch näher charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit werden acht dieser Mutanten näher beschrieben.

**Tabelle 1:** Screening der Transposon-Mutanten von *B. pseudomallei* E8 WT.

	Protease	Lecithinase	Hämolyse	Chitinase	Siderophor	Sudan Schwarz B	Motilität	<i>C. elegans</i> Sterben
P7:80	+	+	+	+	+	+	+	attenuiert
P10:21	+	+	+	+	+	+	+	attenuiert
102	+	+	+	+	+	+	negativ	+
P5:28	+	+	+	+	+	+	negativ	+
P5:81	+	+	+	+	+	+	negativ	+
F12	+	negativ	+	negativ	+	+	+	+
P3:89	+	+	+	+	+	negativ	+	+
P8:45	+	+	+	+	+	negativ	+	+
E8WT	+	+	+	+	+	+	+	+

Es wurde vielfach nachgewiesen, daß Tn-5 nur einmalig in das bakterielle Genom inseriert [34, 47]. Ein entsprechender Nachweis muß jedoch auch für die oben genannten Mutanten erbracht werden, da anderenfalls nicht eindeutig wäre, ob der resultierende Effekt aufgrund einer singulären Insertion auftritt oder das Produkt mehrerer zerstörter Gene ist. Eine zu diesem Zweck durchgeführte Southern-Analyse ergab eindeutig, daß jede Mutante nur eine Transposoninsertion besitzt (Abb. 6).



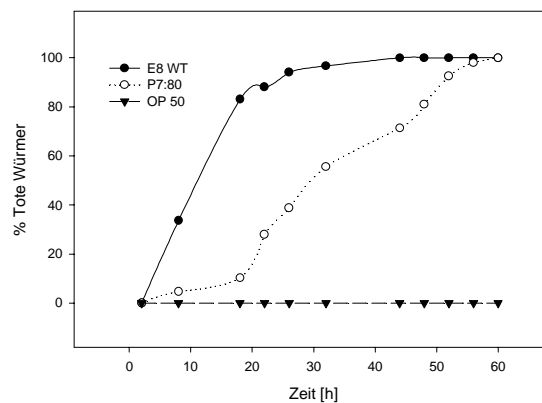
**Abbildung 6:** Southern-Blot aller acht in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten und des *B. pseudomallei* E8 WT. Die genomische DNA jeder Mutante und vom Wildtyp wurden in getrennten Ansätzen zum einen mit *Clal* und zum anderen mit *EcoRI* zur vollständigen Spaltung inkubiert. Aliquots jedes Ansatzes wurden im Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach Überführung der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde mit einer transposonspezifischen Sonde hybridisiert und positive Bindungsereignisse mittels Chemilumineszenz detektiert. Marker 1 ist ein unmarkierter Größenstandard mit DNA-Fragmenten von 0.5 bis 10 kb, während Marker 2 DIG-markierte Fragmente bis zu einer Größe von 21.2 kb enthält (4.2.2.15).

## 5.5 Charakterisierung von Mutanten mit reduzierter Virulenz gegenüber *C. elegans*

### 5.5.1 Untersuchungen mit der Mutante P7:80 im *C. elegans*-Assay

#### 5.5.1.1 Sterbeverhalten von *C. elegans* unter fast killing-Bedingungen mit P7:80

Im fast killing Screening-Assay ist die Mutante P7:80 zunächst dadurch aufgefallen, daß die betroffenen Würmer vitaler aussahen und verzögert starben. Wie in Abb. 7 gezeigt, wurde diese erste Beobachtung einer verlangsamten Sterbekinetik in größerem Maßstab (50-80 Tiere auf Petrischalen,  $\varnothing = 5.5$  cm) und mit einer höheren Anzahl an Zählzeitpunkten bestätigt. Während der Wildtyp bereits nach 10 h zu 50% toten Würmern führte, wurde ein vergleichbares Resultat durch die Mutanten erst nach etwa 30 h erreicht.

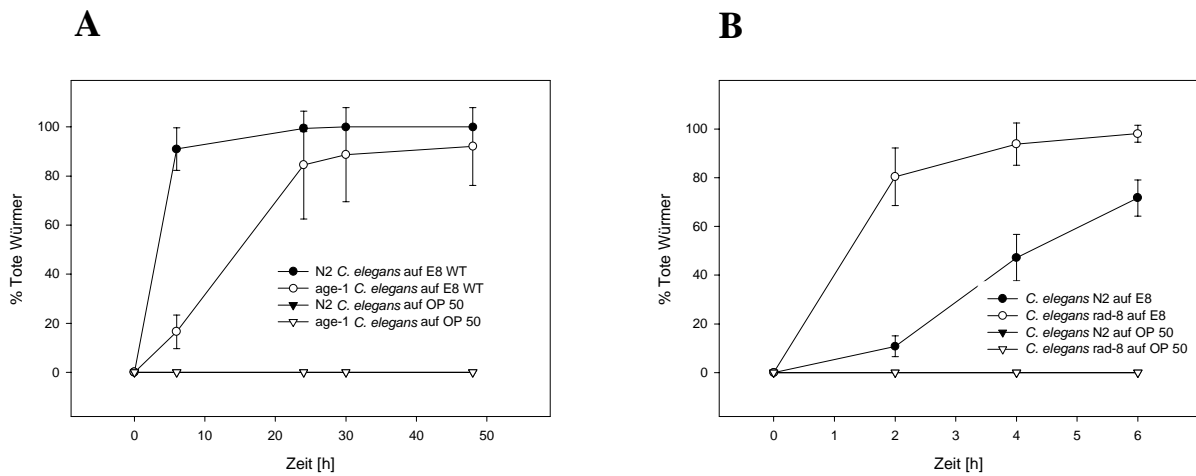


**Abbildung 7:** Auswirkungen von P7:80 und E8 WT im Vergleich auf *C. elegans* N2 unter fast killing-Bedingungen. Dargestellt sind aus Doppelbestimmungen gemittelte Werte eines Experimentes. Die Auswertung eines zweiten Experimentes erbrachte ein vergleichbares Resultat.

#### 5.5.1.2 Exotoxinproduktion von E8 WT im Filter-Assay

Mit dem Filter-Assay wurde die Auswirkung potentiell sezernierter Bakterientoxine auf *C. elegans* untersucht, wobei zu keinem Zeitpunkt ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Wurm bestand. Hierzu wurden die Bakterien ÜN auf NC-Filtern, die auf modifiziertem fast killing-Agar (PGS ohne Pepton-Agar) lagen, kultiviert. Erst nach Entfernen der Filter mit den Bakterien wurden die Nematoden auf den sterilen Agar gegeben. Wurde der Agar mit E8 Wildtypbakterien konditioniert, starben etwa 90% der Tiere innerhalb von 24 Stunden. Eine Hypothese, nach der die Produktion eines Exotoxins von *B. pseudomallei* mit der Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen und damit oxidativem Streß zusammenhängt, wurde in Filter-Experimenten mit den *C. elegans*-Mutanten *age-1* und *rad-8* bewiesen. Abb. 8A zeigt in Bestätigung von Literaturdaten [93], daß die auf oxidativen Streß toleranter reagierende *age-1*-Mutante ein verzögertes Sterbeverhalten aufweist. Im Gegensatz dazu wurde die höhere Sensibilität von *rad-8* durch deutlich schnelleres Sterben bestätigt (Abb. 8B). Das Verhalten der *age-1*- und *rad-8*-Mutanten bestätigt also, daß ein sezerniertes Toxin des WT oxidativen Streß vermittelt.

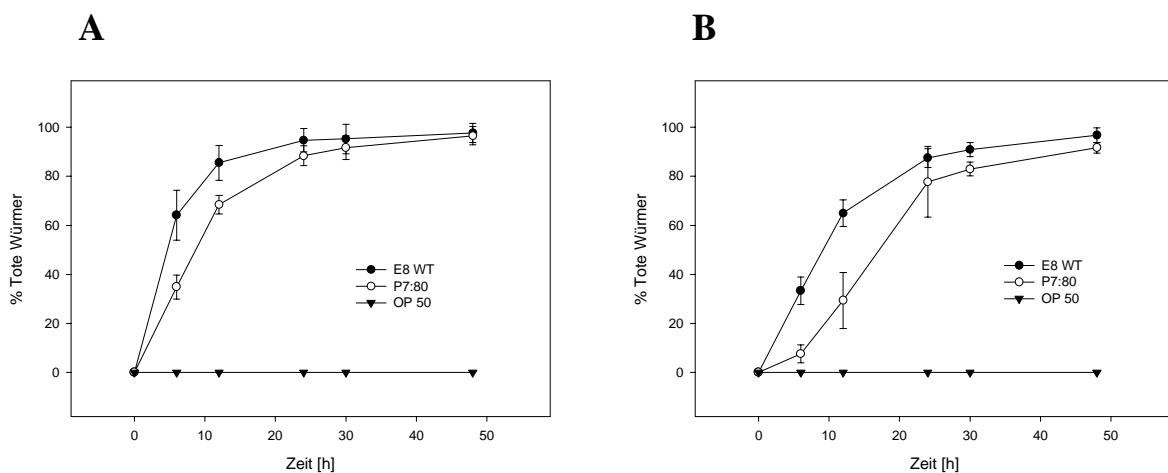




**Abbildung 8:** Auswirkungen von E8 WT im Filter-Assay auf *C. elegans age-1* (A) und *C. elegans rad-8* (B) jeweils im Vergleich zu *C. elegans* N2. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils Doppel- bzw. Dreifachwerten.

### 5.5.1.3 Exotoxinproduktion der Mutante P7:80

In einem entsprechenden Experiment wurde die Toxinproduktion von E8 WT und der Mutante P7:80 miteinander verglichen (Abb. 9). Sowohl N2-Würmer (A) als auch *age-1*-Würmer (B) wurden auf P7:80-konditioniertem Agar und auf E8 WT-konditioniertem Agar ausgesetzt und ihr Sterbeverhalten beobachtet. In beiden Fällen zeigte sich, daß die Mutante P7:80 eine verzögerte Sterbekinetik hervorruft, d.h. weniger Exotoxin sezerniert als der Wildtyp. Die Tatsache, daß die Sterbekurven der *age-1*-Wurmmutanten bei beiden Bakteriensorten deutlich flacher verlaufen als bei den N2-Würmern zeigt, daß eine Korrelation von ausgeschütteter Toxinmenge und dem Ausmaß an generiertem oxidativen Streß besteht. Die verringerte Toxinproduktion der Mutante P7:80 korreliert also mit geringerem oxidativen Streß, der auf die Nematoden wirkt.

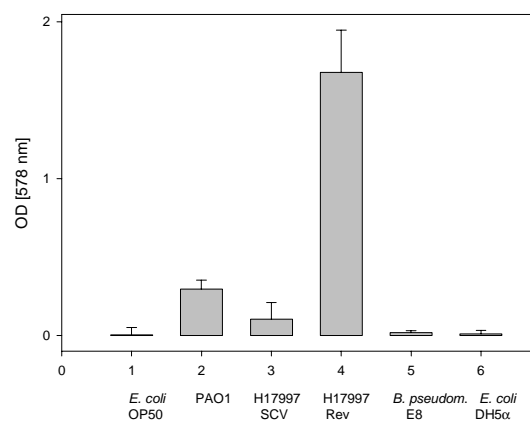


**Abbildung 9:** Exotoxin-vermitteltes Sterben (Filter-Assay) von *C. elegans* N2 (A) und *age-1* (B) durch *B. pseudomallei* E8 WT und die Mutante P7:80. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils Dreifachwerten.

### 5.5.1.4 Untersuchungen zur Identität des Exotoxins

Durch die bisher beschriebenen experimentellen Resultate ist gezeigt worden, daß *B. pseudomallei* ein oder mehrere Exotoxine mit lethaler Wirkung auf *C. elegans* sezerniert. Über die Identität dieses Exotoxins gibt es gegenwärtig keine Informationen. Es ist bisher nicht gelungen, bakterielles Exotoxin in sterilen Filtraten von *B. pseudomallei*-Suspensionen in modifiziertem fast killing-Medium (modifizierter fast killing-Agar ohne den Agarbestandteil) nachzuweisen. In diesen Experimenten wurden die Würmer direkt in die sterilen Filtrate von Suspensionen von *B. pseudomallei* mit Inkubationsdauern von 1, 3, 10, 12 und 23 Tagen gegeben. Zu allen Zeitpunkten lebten die Würmer nicht nur in den Kontrollmedien M9-Puffer und sterilem modifiziertem fast killing-Medium, sondern auch in den sterilen Bakterienfiltraten von *B. pseudomallei*.

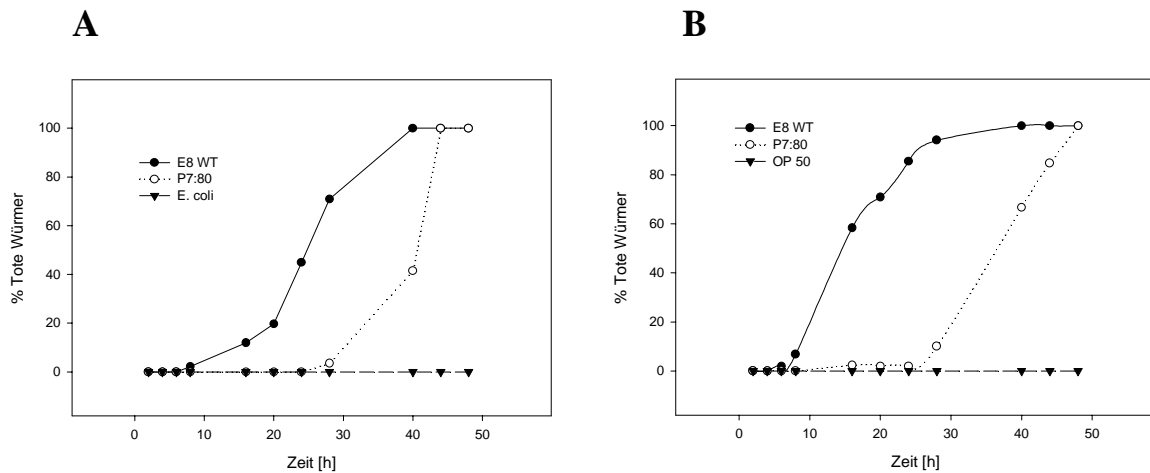
Bakterien können neben proteinartigen Toxinen auch niedermolekulare Substanzen mit toxischer Wirkung ausscheiden. So wurde kürzlich berichtet, daß *Pseudomonas aeruginosa* Cyanid produziert, und daß dieses allein verantwortlich für das Sterben von *C. elegans* ist [45]. Bezüglich einer Cyanidproduktion von *B. pseudomallei* gibt es in der Literatur keine Angaben. Nach Durchführung einer spezifischen und empfindlichen Nachweisreaktion für Cyanid mit Kulturen von *B. pseudomallei* wurde photometrisch praktisch kein Cyanid nachgewiesen (Abb. 10). Somit ist *B. pseudomallei* kein Cyanidproduzent und der für *P. aeruginosa* beschriebene Mechanismus kommt weder für den Wildtyp noch daraus resultierende Mutanten in Betracht.



**Abbildung 10:** Cyanidproduktion verschiedener Bakterien, nachgewiesen mit einer Methodik nach Gallagher *et al.* [45]. Untersucht wurden: (1) *E. coli* OP 50, (2) *P. aeruginosa* PAO1, (3) *P. aeruginosa* H17997 SCV, (4) *P. aeruginosa* H17997 REV, (5) *B. pseudomallei* E8 WT und (6) *E. coli* DH5α. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils Doppel- oder Dreifachwerten. Die dargestellten optischen Dichten liegen im linearen Bereich einer zuvor aufgenommenen Eichgerade zur Cyanidquantifizierung.

### 5.5.1.5 Sterbeverhalten von *C. elegans* im modifizierten fast killing-Assay und im slow killing-Assay mit P7:80

Nach den bisher erhaltenen Ergebnissen ist es nicht überraschend, daß die Mutante P7:80 auch im modifizierten fast killing-Assay (Abb. 11A) ein verzögertes Sterben der Würmer im Vergleich zum Wildtyp nach sich zieht. Dies Ergebnis entspricht dem auf gleichem Agar durchgeführten Filter-Assay, wobei der direkte Kontakt zwischen Bakterien und Würmern wie in diesem Assay den Virulenzunterschied zu verstärken scheint.

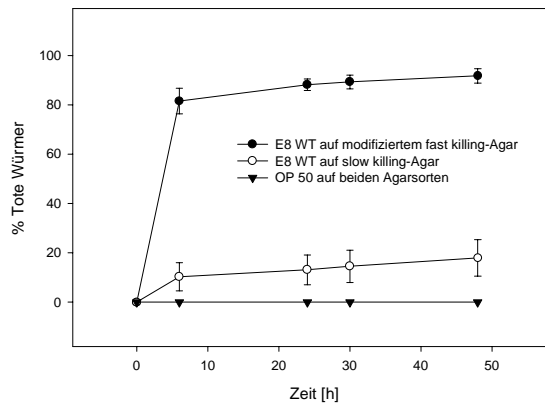


**Abbildung 11:** Auswirkungen von P7:80 und E8 WT im Vergleich auf *C. elegans* N2 unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. (A) Modifiziertes fast killing (PGS ohne P) von *C. elegans* N2 durch *B. pseudomallei* E8 WT und die Mutante P7:80. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelwerten aus einem zweifach durchgeführten Experiment. (B) Slow killing von *C. elegans* N2 durch *B. pseudomallei* E8 WT und die Mutante P7:80. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelwerten aus einem zweifach durchgeführten Experiment.

Das Sterbeverhalten der Würmer, die dem Wildtyp bzw. der Mutante P7:80 unter slow killing-Bedingungen ausgesetzt sind (Abb. 11B), ist besonders unterschiedlich. Während nach einem Tag schon etwa 80% der Tiere auf dem Wildtypbakterium gestorben sind, lebten zum gleichen Zeitpunkt noch fast alle Würmer, die der Mutante ausgesetzt waren. Auf dieser Stufe der funktionellen Analyse zeigte sich bereits die pleiotrope Auswirkung der Transposoninsertion in der Mutante P7:80, da alle drei untersuchten Sterbemechanismen von *C. elegans* beeinflusst werden.

### 5.5.1.6 Untersuchung zur Exotoxinproduktion unter slow killing-Bedingungen

Die Exotoxinproduktion von *B. pseudomallei* wurde bisher bei Wachstum auf fast killing- (PGS) bzw. modifiziertem fast killing-Agar (PGS ohne Pepton) im Filter-Assay gezeigt. Wie in Abb. 12 dargestellt, wurde nur ein sehr geringes Wurmsterben festgestellt, wenn dasselbe Assay auf slow killing-Agar durchgeführt wird. Dies bestätigt die unterschiedlichen durch *B. pseudomallei* vermittelten Sterbemechanismen. Während für das slow killing offenbar ein direkter Kontakt zwischen lebenden Bakterien und *C. elegans* erforderlich ist, wird im Gegensatz dazu beim fast killing und der modifizierten Variante des fast killings der Sterbeprozess durch ausgeschüttetes Toxin ohne direkten Kontakt verursacht.

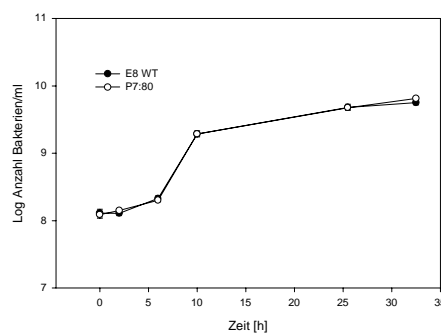


**Abbildung 12:** Filter-Assay mit *C. elegans* N2 und *B. pseudomallei* E8 WT unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Die Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils Dreifachwerten.

### 5.5.2 Charakterisierung des Wachstumverhaltens von P7:80

Die Mutante P7:80 wächst, ebenso wie der Wildtyp, auf gängigen Medien wie LB-, Müller-Hinton-, MacConkey-, Columbia-Blutagar und sogar auf modifiziertem Vogel-Bonner-Agar. Als unterschiedlich und unabhängig vom eingesetzten Medium fiel die kleinere Größe der Mutantenkolonien auf festem Medium auf. Der deutlich geringere Durchmesser scheint durch ein kompakteres Wachstum kompensiert zu werden, da die Anzahl der CFU pro Kolonie nach einem Tag bei der Mutante nur 3-4-mal niedriger lag als beim Wildtyp. Nach einem weiteren Tag bei 37 °C verringerte sich der Unterschied auf den Faktor 2. Diese Werte wurden mindestens dreimal in unabhängigen Experimenten bestätigt.

Bei Wachstum in LB- und Vogel-Bonner-Flüssigmedien zeigte die Mutante über einen Zeitraum von zwei Tagen keinen Unterschied zum Wildtyp. Sowohl die in regelmäßigen Abständen überprüften optischen Dichten, als auch die aus Suspensionen gleicher OD<sub>650</sub> verdünnten und ausplattierten CFU wichen nicht voneinander ab (Abb. 13).

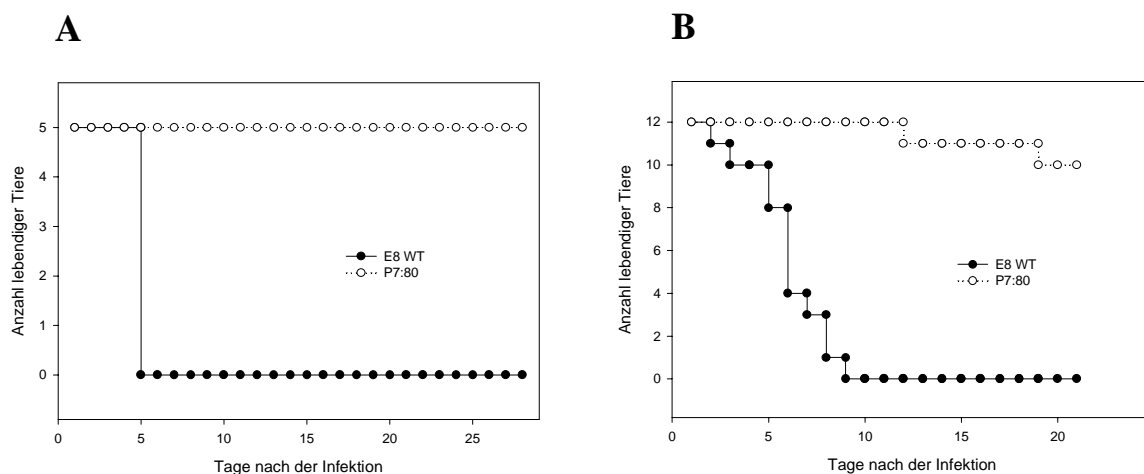


**Abbildung 13:** Wachstumskurven von P7:80 und E8 WT in LBB. Zu Beginn und nach 2, 6, 10, 25.5 und 32.5 Stunden wurden von beiden Suspensionen Aliquots genommen. Von diesen wurden jeweils 6-8 Verdünnungen hergestellt und in Doppelwerten ausplattiert. Dargestellt sind die gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen für beide Bakterienstämme.

### 5.5.3 *In vivo*-Charakterisierung von P7:80 im Mausmodell

Das im Rahmen dieser Arbeit benutzte Mausinfektionsmodell für *B. pseudomallei* wurde vor einiger Zeit in unserer Arbeitsgruppe etabliert [61]. Sowohl Balb/c- als auch C57BL/6-Mäuse sind empfänglich für eine Infektion mit *B. pseudomallei*, wobei sich der Stamm C57BL/6 als deutlich resistenter erwiesen hat. Die Unterschiede können nach intravenöser Gabe, aber auch nach mukosaler Infektion beobachtet werden [61, 89].

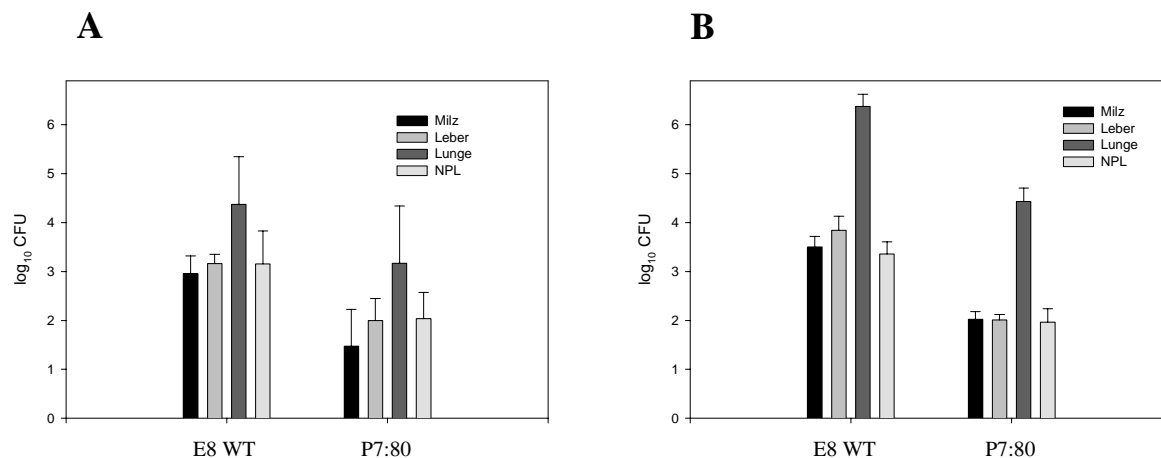
Nachdem die Mutante P7:80 im Vergleich zum E8 WT im Nematodenmodell zu einem attenuiertem Sterben der Tiere geführt hat, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich diese Virulenzreduktion auch im etablierten Mausmodell bestätigt. Wie die Sterbekurven zeigen (Abb. 14), weist die Mutante P7:80 in beiden Mausmodellen eine deutlich reduzierte Virulenz im Vergleich zum E8 WT auf. Während die C57BL/6-Mäuse nach intranasaler Gabe von  $5 \times 10^4$  CFU nach fünf Tagen alle verstorben waren, lebten alle mit P7:80 infizierten Tiere bis zur Sektion am Tag 28 nach Infektion (Abb. 14A). Für die Balb/c-Mäuse ergab sich ein sehr ähnliches Ergebnis: die mit einer Dosis von  $2 \times 10^2$  CFU des WT infizierten Tiere verstarben nach spätestens einer Woche, während die mit der Mutante in gleicher Dosis infizierten Mäuse zu über 83% bis zur Sektion an Tag 21 lebten (Abb. 14B). Die Organe aller sezierter Tiere waren steril.



**Abbildung 14:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante P7:80 (A) Sterbekurve nach intranasaler Infektion von C57BL/6-Mäusen mit  $5 \times 10^4$  Bakterien. (B) Sterbekurve nach intranasaler Infektion von Balb/c-Mäusen mit  $2 \times 10^2$  Bakterien. Die Daten sind jeweils aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten kombiniert.

In weiteren Experimenten wurde festgestellt, daß 50% der Balb/c-Mäuse innerhalb eines Zeitraums von vier Wochen verstarben, wenn sie mit einer Dosis von  $5 \times 10^3$  CFU der Mutante P7:80 infiziert waren. Im gleichen Zeitraum verstarben ebenfalls die Hälfte der infizierten Tiere, wenn sie mit nur 5 CFU des Wildtyps infiziert wurden. Die vermutete  $LD_{50}$  für P7:80 in Balb/c-Mäusen dürfte demnach etwa um den Faktor 1000 größer als die  $LD_{50}$  für den E8 Wildtyp sein. Es verstarben alle C57BL/6-Mäuse, wenn sie mit P7:80 in einer Dosis von  $5 \times 10^6$  CFU infiziert wurden.

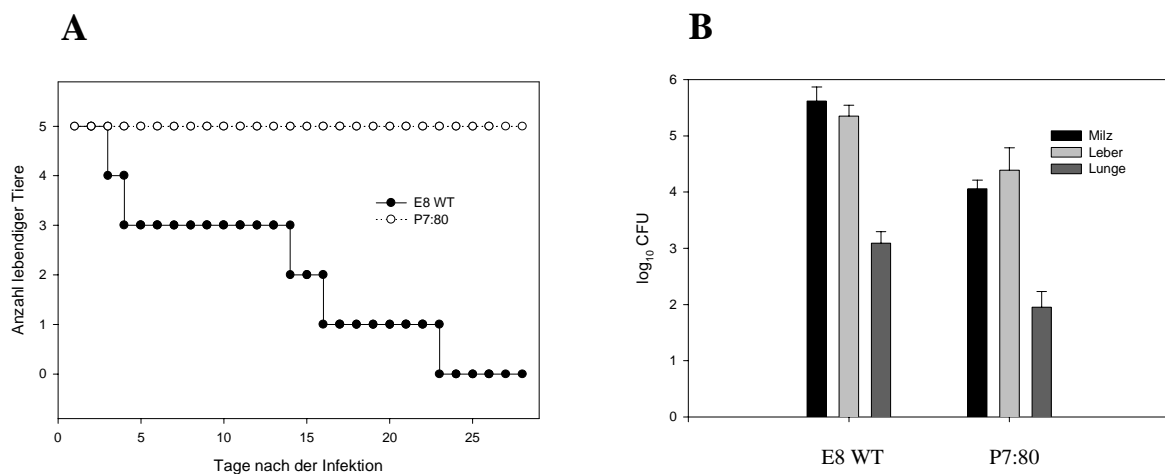
Folgearbeiten erbrachten Aufschluß über die organspezifische Besiedlung in beiden Mausstämmen nach intranasaler, also einer mukosalen Infektionen durch E8 WT und die Mutante P7:80. Milz, Leber und Lunge der jeweiligen Tiere wurden nach 24 h aus den getöteten Tieren entnommen, präpariert und homogenisiert. Verdünnungen dieser Homogenate ebenso wie die nasal-pharyngialen Spülungen (NPL) wurden auf Selektivagar ausplattiert. Wie erwartet waren jeweils die Lungen am stärksten besiedelt. Sowohl für die C57BL/6- als auch die Balb/c-Mäuse ergab sich für alle Organe, daß die Anzahl der CFU der Mutante P7:80 deutlich unter der des WT lag (Abb. 15). Während der Unterschied in den Lungen der C57BL/6 nicht signifikant war (P-Wert: 0.16) und der P-Wert für die NPL knapp über dem Grenzwert für Signifikanz von 0.05 lag (0.051), bewegten sich alle anderen P-Werte zwischen 0.008 und 0.035 und belegen damit die Signifikanz der unterschiedlichen Besiedlung. Die Zahlenwerte wichen durchschnittlich 1-2 log-Stufen voneinander ab, womit schon innerhalb des ersten Tages der Infektion offensichtlich eine Basis für einen nachfolgend vollständig unterschiedlichen Verlauf der Infektion vorhanden war. Wie oben erwähnt, sind alle Organe der mit P7:80 infizierten Tiere drei Wochen nach Infektion steril, während die Wildtyp-infizierten Mäuse innerhalb der ersten Woche verstarben. Die Mutante P7:80 unterscheidet sich dadurch vom WT in ihrer Fähigkeit, sich im Milieu des Wirtes zu vermehren oder auch nur zu persistieren und eine erfolgreiche Infektion durchzuführen.



**Abbildung 15:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante P7:80. Untersucht wurden die Bakterienanzahlen 24 Stunden nach Infektion. (A) Dargestellt sind die jeweils aus 4 Tieren gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen in Milz, Leber und Lunge von C57BL/6-Mäusen und (B) entsprechend in Balb/c-Mäusen. Alle Tiere wurden intranasal mit einer Dosis von  $5 \times 10^3$  Bakterien infiziert.

Wie in Abb. 16A dargestellt, führt eine intravenöse Infektion mit  $5 \times 10^3$  CFU der Mutante P7:80 in Balb/c Mäusen nicht zum Sterben der Mäuse, während die Applikation der gleichen Dosis des WT alle Tiere tötet. Dies zeigt eine hochgradig verzögerte Virulenz der Mutante P7:80 nicht nur nach intranasaler, sondern auch nach intravenöser Infektion im

Säugetierwirt. Wie oben beschrieben wurde auch nach intravenöser Bakteriengabe die Situation in Milz, Leber und Lunge 24 Stunden nach Applikation untersucht. In Abb. 16B ist gezeigt, daß die Resultate denen der intranasalen Infektion ähnlich sind. Nach 24 Stunden ist P7:80 in den untersuchten Organen in 1-2 log-Stufen geringerer CFU-Anzahl vorhanden. Die P-Werte als Maß für die Signifikanz des Unterschiedes liegen für alle drei untersuchten Organe unter 0.005 und bestätigen den deutlichen Unterschied. Die Sektion der Mäuse nach vier Wochen ergab sterile Tiere und bestätigte damit auch bei dieser Art der Applikation, daß die Mutante P7:80, wie auch nach intranasaler Infektion, im Verlauf weiterer Tage im Wirt vollständig eradiziert wird.

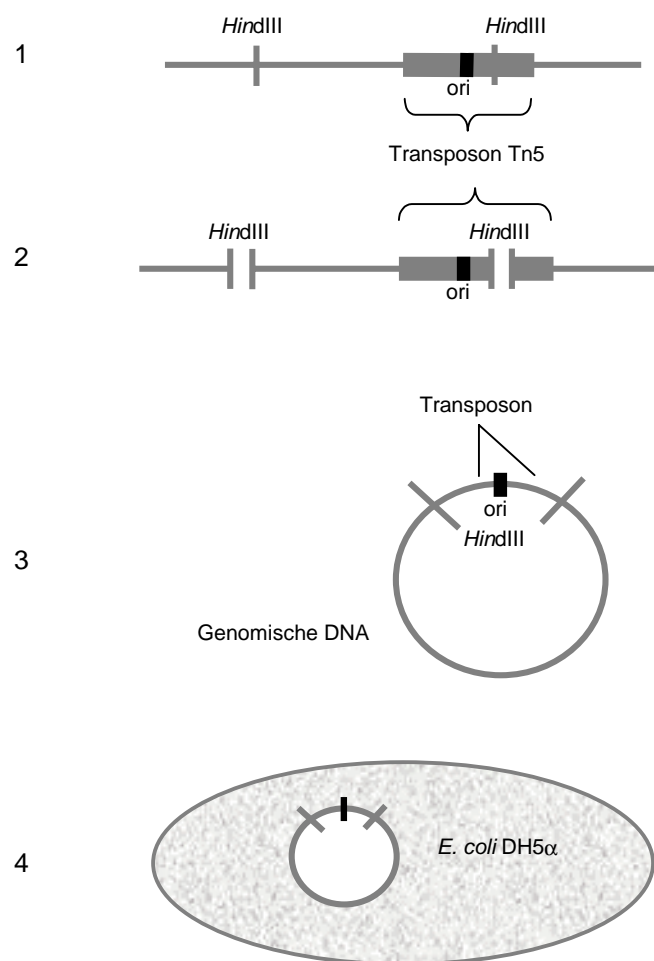


**Abbildung 16:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante P7:80: (A) Sterbekurve nach intravenöser Infektion von Balb/c-Mäusen mit  $5 \times 10^3$  Bakterien. (B) Dargestellt sind die aus 5 Tieren gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen in Milz, Leber und Lunge von Balb/c-Mäusen 24 Stunden nach intravenöser Infektion.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Infektionen im Mausmodell, daß die Virulenz der Mutante P7:80 im Vergleich zum WT in beiden untersuchten Mausstämmen stark reduziert ist. Die eingesetzten Dosen der Bakterien führten sowohl nach intranasaler als auch nach intravenöser Applikation zum Tod der mit dem Wildtyp infizierten Tiere, während alle mit der Mutante infizierten Tiere überlebten. Die Organe der Tiere, die überlebt hatten, waren steril. Die nächsten Arbeitsschritte analysieren den Defekt der Mutante auf molekularer Ebene, um das transposongestörte Gen von P7:80 zu identifizieren und zu charakterisieren.

### 5.5.4 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante P7:80

Die Bestimmung des durch Transposonmutagenese zerstörten Gens in P7:80 wurde durch Selbstklonierung der Mutante nach Literaturangaben von DeShazer et al. durchgeführt [34]. Das schrittweise Vorgehen ist in Abb. 17 schematisch dargestellt. Aus den so erhaltenen Transformanten wurde nach Plasmidpräparation mit Tn5-OT182-spezifischen Primern (4.2.2.18) die Sequenz der transposon-flankierenden DNA nach Standardmethoden (4.2.2.20) bestimmt. Nach Berücksichtigung der dem Transposon komplementären Teilsequenz ergab sich für das defekte Gen in P7:80 als primäres Sequenzierungsergebnis eine Abfolge von 474 bp. Diese Sequenzinformation diente zur computergestützten Identifizierung des Gens durch Vergleich mit dem im Sanger Institut vollständig analysierten Genom von *B. pseudomallei*.



**Abbildung 17:** Selbstklonierung einer Tn5-Mutante. 1. Herstellen chromosomaler DNA der Mutante, 2. Spaltung der genomischen DNA mit einer Restriktionsendonuklease (z.B. *HindIII* oder *EcoRI*), 3. intramolekulare Ligation vorhandener DNA-Fragmente und 4. Transformation der ligierten DNA in *E. coli*.



Entsprechend Abschnitt 4.2.2.20 wurde so ein ORF aus 1260 bp bestimmt (Chromosom 1, Position 2995510-2996769; die vollständige ORF-Sequenz ist im Anhang 8.1.1 gezeigt). Ein Vergleich mit den Nukleotidsequenzen öffentlich zugänglicher Datenbanken (GenBank, Blast) ergab eine Identität von 79% des Gens mit einem Abschnitt des GMI1000-Chromosoms des Pflanzenpathogens *Ralstonia solanacearum*, eines nahen Verwandten von *B. pseudomallei* (Abb. 18). Weitere signifikante Übereinstimmungen wurden auf Nukleotid-ebene nicht gefunden. Für das translatierte *R. solanacearum*-Gen wird das *probable integral membrane protease transmembrane protein* (GenBank NP\_519062) aus 418 Aminosäuren vorhergesagt. Der translatierte ORF von P7:80 ergibt ein hypothetisches Protein mit 419 Aminosäuren (Abb. 19) entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 46.5 kDa und einem isoelektrischen Punkt pI von 9.7. Schon an dieser Stelle sei erwähnt, daß das Protein Ste24 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, also eines eukaryotischen Mikroorganismus, signifikante Übereinstimmungen in der Sequenz aufweist [42] (GenBank NP\_012651). Das hypothetische Protein, das sich aus dem gestörten Gen von P7:80 ableitet, wird im weiteren als STRAMP bezeichnet (Ste24-ähnliche Transmembranmetalloprotease). Der direkte Vergleich der Primärstrukturen von STRAMP mit dem *Ralstonia*-Homolog in Abb. 19 zeigt eine Identität von 62% und weitere 10% der Sequenzpositionen sind von chemisch ähnlichen Aminosäuren besetzt. Die Strukturvorhersage der Sequenz von STRAMP ergibt zwei wesentliche Motive (PredictProtein, <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>). Zum einen enthält STRAMP sieben Transmembrandomänen, zum anderen das bekannte zinkbindende histidinhaltige Sequenzmotiv HELGH. Somit ist STRAMP als Mitglied der Clan MA-Metalloproteasen zu klassifizieren, die das Motiv HEXXH enthalten [6]. Die Sequenzhomologie zwischen STRAMP und dem *Ralstonia*-Protein ist im Bereich der carboxyterminalen und der zinkbindenden Domäne besonders hoch, während die Membransegmente wie erwartet eine geringere Ähnlichkeit aufweisen.

		1		70
<i>R. solanacearum</i>	(1)	ATGCC-----ACCTTCACCGCCGCTCTTCCTGATCGCCCTCGTGCTGATGGCCGCCACACGCCTGTGGC		
P7:80	(1)	ATGTCGCCCTATACCTTCACCTGCTCTTCGCCGTCGCGATCGTCGCGATGACGGGCACCAAGCTGTGGC		
<i>R. solanacearum</i>	(65)	TGGCCGCCCGGACAGATCCGCCACGTGGCGGCCACCGTGACACCGTGCCCGCGAGTTCGCCGAATCCAT		140
P7:80	(71)	TCGCGTCGCGGACAGTCCGCTTCGTTCGCCGCGCATCGCGCCCGTGCCCGCGAGTTCGCCGAACGAT		210
<i>R. solanacearum</i>	(135)	CACACTGGACATGCACCACAAGGCCCGGACTACACCATCGCCCGCACGCGCTGGCGATGCTGGAAAGTC		
P7:80	(141)	CCCCTCGCCGCGCACAGCGCGCCGACTACACGATCGAGCGCACGCGCTCACGATGTTTCGAGATC		280
<i>R. solanacearum</i>	(205)	CCCCTGCAGGCCACGCTGCTGATCGCGTGACGCTGCTGGCGGGCTGAACGGGCTCAACCAGGC-CTGG		
P7:80	(211)	GTCGTCCTCGGCGGTGCTTGTGGGCTCACGCTCCTCGGGGGCGTCGGCGCGCTCGATTGCTGCTCG		350
<i>R. solanacearum</i>	(274)	CTGTCCGCTTCGGCCCGGCTACGCGTATGGCGTGGCCCTGATCGCTCGGTCATCGCCATCAGCAGCC		
P7:80	(281)	CCGGCTGGCT-CGGCCACGGTACGGCCAGGTTGGCGCTCGTCGCGCGGTGCTCGTGATCTCCAGCG		420
<i>R. solanacearum</i>	(344)	TGATCGAGCTGCCGTTCTCGCTGTACAGCCAGTTCTGTCGTCGAAGAGCGCTTCGGCTTCAACCGCATGAC		
P7:80	(350)	CGGCCGATCTGCCGTTTCGAGTACTACGCCAGTTCGGCATCGAAGAGCGCTTCGGCTTCAACCGCATGAC		490
<i>R. solanacearum</i>	(414)	CTGGAAGCTGTGGCTGGCCGACAACCTCAAGGGGCTGGCCATCGGCACCGCGCTGGGGCTGCCGCTGCTG		
P7:80	(420)	GAAGCGGCTGTTCTTACCGATCTCGCGAAGAACGCGCTGCTCGGCGGGCGCTCGGCTGCCGCTCCTG		560
<i>R. solanacearum</i>	(484)	CTGGCGGTGCTGTGGCTGATGCACTCGATGGCGGAGCGCTGGTGGCTGTACACCTGGCTGTTGGATGG		
P7:80	(490)	TTCGTCGTGCTGTGGCTGATGAACCAGCGCGCGCTATGGTGGCTGTGGACGTGGATCGTGTGGGTGCG		630
<i>R. solanacearum</i>	(554)	CCTTCACGCTGTTCTCGTCCAGCGATCTACCCAACGTGATCGCCCGCTCTACAACAAGTTCACCCGCT		
P7:80	(560)	GCTTCAGATGCTCGTTCGCTGCTTACCCGACCTTTCATCGCGCGATCTTCAACAAGTTCGAGCCGCT		700
<i>R. solanacearum</i>	(624)	CGAGGACGGCGAGATGCGCACGCGCATCGAGGGCTTGCTCAAGCGCTGCGGCTTTGCCAGCAAGGGCCTG		
P7:80	(630)	TTCCGACGACGCGCTGCGCGCGCATCGAAGGGCTGATGAAGCGCTGCGGCTTCGCGCGAAGGGCCTC		770
<i>R. solanacearum</i>	(694)	TTCGTGATGGACGGCAGCCCGCGCAGCGCCACCGCAACGCTATTTACAGCGGCTTCGGCGCCACCAAGC		
P7:80	(700)	TTCGTGATGGACGGCAGCCCGCGCTCCGCGCAGCGCAACGCGTACTTACAGGGCTTCGGCGCTCGAAGC		840
<i>R. solanacearum</i>	(764)	GCATCGTCTTCTTCGACACGCTGCTCGCGCGGCTGGATGCCCCCGAGATGGAAGCGGTGCTGGCGCATGA		
P7:80	(770)	GGATCGTCTTCTTCGATACGTTGCTCGCCCGCTGACGGGGCGGAGATCGAAGCGGTGCTCGCGCACGA		910
<i>R. solanacearum</i>	(834)	GCTGGCCATTTCAAGCGCCACACGCTACCAAGCGCATCGCCGTG-ATGTTCTGCTGAGCTGGGGCT		
P7:80	(840)	GCTCGGCCATTTCAAGCGCCACGCTGATGAAGCGGAT-GCTGTGGACCTTCGCGCTCAGCTCGCGCT		980
<i>R. solanacearum</i>	(903)	GCTGGCCCTGCTCGGCTGGCTGATGACGCGCGGTGGTTCTACCTGGGCTGGGCGTGGCGCCCAACCTG		
P7:80	(909)	GCTCGCGCTGCTCGGCTGGCTCGCGCAGCGCGGTGGTTCTACACGGGCTCGGCGTATGCCGCTCGCTC		1050
<i>R. solanacearum</i>	(973)	CTCGCCGACAACCATGCGCTGGCGTGATGCTGTTCTTCTTCTGGTACTGCCGCTTTCATGTTCTTCGCTC		
P7:80	(979)	TCGGGCAGCAACGCGGGCATCGCGCTCGTGCTGTTCTTCTTCTGTCGATGCCGGGTTTCCTGTTCTTCGTCA		1120
<i>R. solanacearum</i>	(1043)	CGCCGCTGTCGAGCTGTCGTCGCCGAAGCAGAGTTCGAGCGGATGCCTTCGCGGCGCAGATGCCGA		
P7:80	(1049)	CGCCGCTTGGCAGCTGAGCTCGCGCAAGCAGAGTTCGAGCGGACGCGTTTCGCGCGGAGCCAGACCGA		1190
<i>R. solanacearum</i>	(1113)	TGCGTCGCGC-CTGGTCTCGGCGCTGGTCAAGCTGTTCCAGGACAATGCTTCGACCCCTGACGCCCGACCC		
P7:80	(1119)	TGCG-CGCGATCTCGTCAACGCGCTCGTGAAGTCTACGAAAGACAATGCGTTCGACGCTCACGCCCGACCC		1260
<i>R. solanacearum</i>	(1182)	GGTCTACTCGGCGTTCTACTACTCCACCCACCGCGTCGCGAGCGGTGGCAGCACTGGTGCAGGCTGCC		
P7:80	(1188)	CGTCTACACCGGTTCTACTACTCGCATCCGCCCGGTTCGCGAGCGTATCGACCGGCTGCTCCAGCA---C		1261
<i>R. solanacearum</i>	(1252)	GCATGA		
P7:80	(1255)	TCATGA		

**Abbildung 18:** Vergleich der Nukleinsäuresequenzen des Transposon-gestörten Gens *stramp* von P7:80 mit dem homologen ORF entsprechend dem Sequenzbereich 177593-177849 des Chromosoms GMI1000 von *Ralstonia solanacearum* (GenBank AL646061).

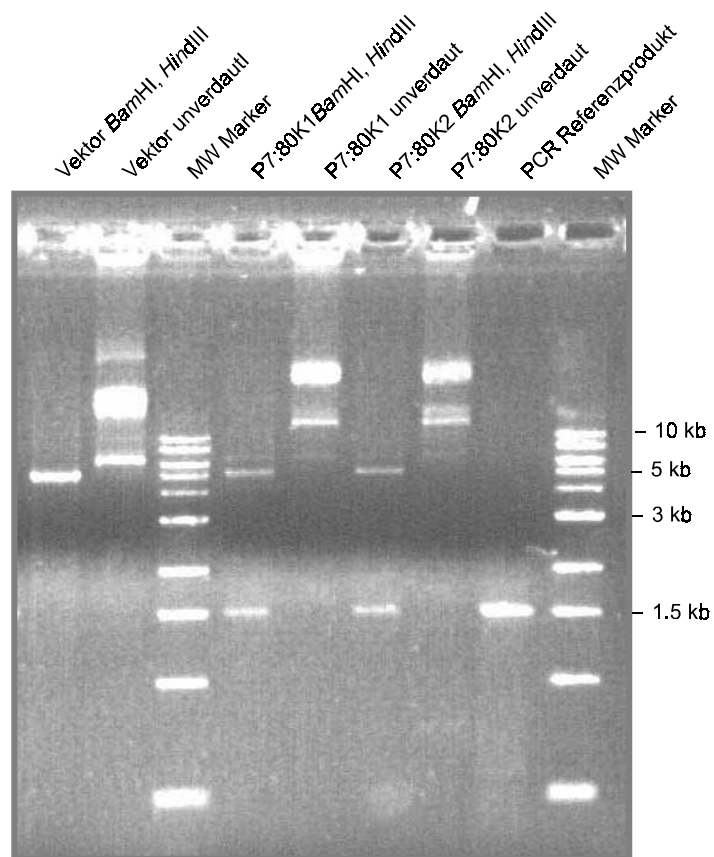
5	TFTLLFAVAIVAMTGTKLWLASRQVRFVAAHRARVPAQFRETIPLAAHQRAADYTIERTR	64
	TFT ● F ● A ● V M ● T ● LWLA RQ ● R ● VA HR VPAQF E ● I L H ● AADYTI RTR	
3	TFTAVFLIALVLMAATRLWLAARQIRHVARHRDTPVAQFAESITLDMHKAADYTIARTR	62
65	LTMFEIVVSSAVLVGLTLLGGVGALDSSLAGWLGHGYGQQVALVAAVLVISSAADLPFEY	124
	L M E ● V ● L ● ● L T L L G G ● ● L G G Y ● V A L ● A V ● I S S ● L P F	
	LAMLEVPVQATLLIALTLLGGLNGLNQAWLSAFGPGYAYGVALIASVIAISSLIELPFSL	122
125	YRQFGIEERFGFNRMTKRLFFTDLAKNALLGAALGLPLLFVVLWLMNQAGALWWLWTWIV	184
	Y Q F ● E E R F G F N R M T ● L ● D K ● G A L G L P L L V L W L M G W W L ● T W ● V	
123	YSQFVVEERFGFNRMTWKLWLADNLKGLAIGTALGLPLLLAVLWLMHSMGERWWLYTWLV	182
185	WVGFQMLVLVLYPTFIAPIFNKFEPLSDDALRARIIEGLMKRCGFAAKGLFVMDGSRSSAH	244
	W ● F V ● Y P I A P ● ● N K F P L D R R I E G L K R C G F A K G L F V M D G S R R S A H	
183	WMAFTLFLVQAIYPNVIAPLYNKFTPLEDGEMRTRIEGLLKRCGFASKGLFVMDGSRSSAH	242
245	GNAYFTGFGASKRIVFFD <del>TLLARLTGGEIEAVLAHELGHFKRRHVMKRM</del> LWTFALSLALL	304
	GNAYF ● G F G A ● K R I V F F D T L L A R L E E A V L A H E L G H F K R H V M K R M L W T F A L S L A L L	
243	GNAYFSGFGATKRIVFFD <del>TLLARLDAPEMEAVLAHELGHFKRRHVTKR</del> I <del>AVMFVLSLGLL</del>	302
305	ALLGWL <del>AQRAWFYTG</del> LGVMPSLSGSNAGIALV <del>FFLSMPGFLFFV</del> TPLGSLSSRKHEFEA	364
	A L L G W L R A W F Y T G L G V M P S L S G S N A G I A L V F F L S M P G F L F F V T P L G S L S S R K H E F E A	
303	ALLGWL <del>MTRAWFY</del> LGLGVAPNLLADNHALALML <del>FFLVLPVFMFFV</del> SPLSSLSRKHEFEA	362
	A L L G W L M T R A W F Y L G L G V A P N L L A D N H A L A L M L F F L V L P V F M F F V S P L S S L S S R K H E F E A	
365	DAFAASQTDARDLVNALVKLYEDNASTLTPDPVYTAFFYSHPPASQRIDRLQHS	419
	D A F A A D A L V A L V K L ● D N A S T L T P D P V Y ● A F Y Y S H P A S Q R ● R L ● Q	
363	DAFAAQHADASRLVSALVKLFQDNASTLTPDPVYSAFFYSHPTASQRVARLVQAAA	418

**Abbildung 19:** Aminosäuresequenz von STRAMP (obere Zeile) und Primärstrukturvergleich mit dem homologen *R. solanacearum*-Protein (untere Zeile). Rote Buchstaben: identische Aminosäuren; roter Punkt: chemisch ähnliche Aminosäuren; grau unterlegte Sequenzbereiche: Transmembrandomänen; blau: zinkbindendes Sequenzmotiv; unterstrichen: vorhergesagte O-GlcNAc-Glycosylierung

### 5.5.5 Komplementation von *stramp* in P7:80

Nachdem das in der Mutante P7:80 zerstörte Gen *stramp* in seiner Sequenz bekannt war und dessen hypothetisches Produkt an der Virulenzreduktion beteiligt zu sein scheint, sollte gezeigt werden, daß die Virulenz des Wildtyps E8 wiederherstellbar ist, wenn das Gen *in trans* in die Mutante eingebracht wird. Gelänge dies, so wäre gezeigt, daß *stramp* alleinverantwortlich für die virulenten Eigenschaften des Wildtyps ist, die P7:80 nicht mehr aufweist. Weiterhin wäre bewiesen, daß der Phänotyp nicht durch einen polaren Effekt entstanden ist. Die Primer BF11 und BF12 wurden verwendet, um das in P7:80 gestörte Gen zuzüglich weiterer 237 Basenpaaren am 5'-Ende zur Erfassung eventueller Promotoren durch PCR zu synthetisieren. An spezifischen Schnittstellen wurde das 1497 bp große Fragment in den broad-host-range Vektor pBBR1MCS-2 [76] ligiert, mit dem anschließend *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert wurde. Gemeinsame ÜN-Inkubation von Transformant, Helferstamm und der Mutante führte zu Konjugation und somit zu Komplementanten, die auf Antibiotikaplatten selektiert wurden. Die Präparation der Plasmide mehrerer Komplementanten mit anschließender Restriktionsspaltung durch *Bam*HI und *Hind*III hat sowohl die Existenz des Vektors (5144 bp) als auch des Inserts (1497 bp) in den Komplementanten bewiesen. Die

elektrophoretische Trennung im Agarosegel mit den entsprechenden Fragmenten ist in Abb. 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Elektrophoretische Trennung der Plasmide der Komplementanten P7:80K1 und P7:80K2 sowie deren Spaltungsprodukten nach Inkubation mit *Bam*HI und *Hind*III im Agarosegel. Der linearisierte Vektor und das PCR-Produkt sind als Referenzen aufgetragen. Als Marker ist ein Größenstandard mit DNA-Fragmenten von 0.5 bis 10 kb aufgetragen.

Nachdem auf diese Weise bestätigt wurde, daß die Komplementation prinzipiell erfolgreich war, wurde die Komplementante P7:80K2 auch funktionell im *C. elegans*-Assay überprüft. Die erwartete Wiederherstellung der vollständigen Virulenz des Wildtyps wurde nicht beobachtet. Kontrollsequenzierungen des Inserts zeigten, daß mindestens ein Synthesefehler (Guanin statt Thymin an Position 217 von *stramp*) im Insert vorlag. Dieser ist an der ersten Position eines Triplets positioniert und resultiert im Einbau von Alanin statt Serin in das Protein, was möglicherweise den Verlust der Funktion von STRAMP zur Folge haben könnte. In folgenden Arbeiten muß die Komplementation beginnend mit der PCR wiederholt werden, um schließlich zu bestätigen, daß *stramp* mit der Virulenz verbunden ist.

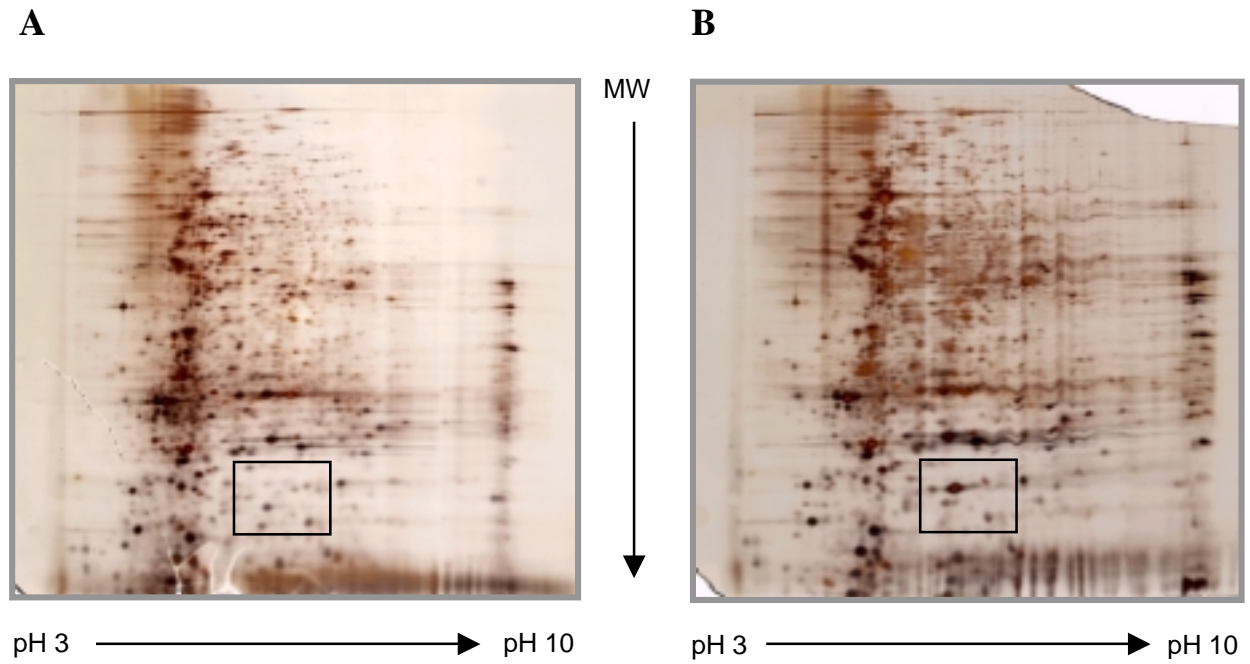
Obwohl sich der verwendete Vektor pBBR1MCS-2 als geeignet zur Komplementation von *B. pseudomallei*-Mutanten erwiesen hat (siehe 5.6.4), soll das Experiment auch mit dem Vektor pUCP28T wiederholt werden. Dieser wurde schon von anderen Gruppen für entsprechende Zwecke erfolgreich eingesetzt [34, 47].

### 5.5.6 Proteomanalyse von P7:80

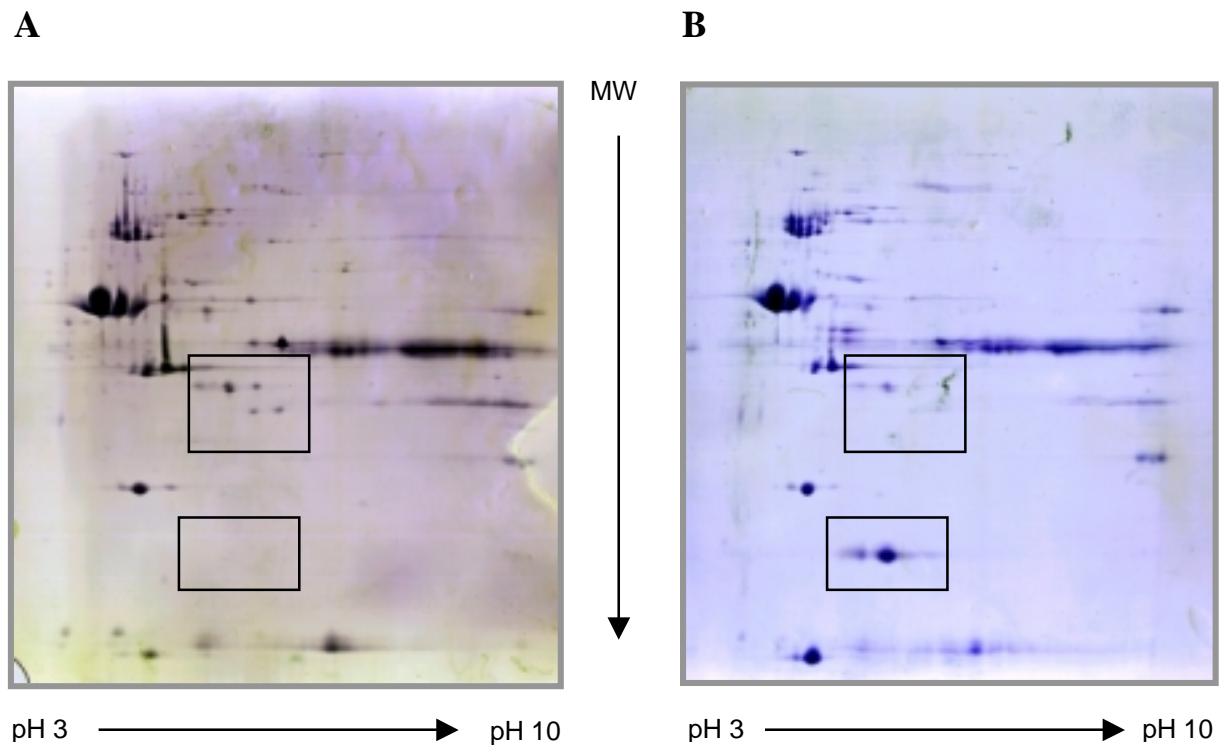
Die Identifizierung des Gens *stramp* und des davon abgeleiteten Proteinproduktes läßt keine exakte Aussage über deren Funktion zu. Einerseits ist die sezernierte Menge an Exotoxin in der Mutante reduziert, andererseits resultiert derselbe genetische Defekt von P7:80 auch beim slow killing in einem verzögerten Sterben der Würmer, wobei ein Exotoxin bei diesem Sterbemechanismus praktisch keine Rolle spielt. Vor dem Hintergrund dieser Informationen erscheint es wahrscheinlich, daß nicht STRAMP selbst den virulenten Faktor darstellt, sondern eine oder mehrere Komponenten, die direkte oder spätere Interaktionspartner dieses Proteins sind. Da STRAMP vermutlich eine Protease ist, liegt es nahe, daß Substrate oder Spaltungsprodukte Virulenzfaktoren darstellen. Mit dem Ziel Unterschiede im Protein-expressionsmuster zwischen Wildtyp und der Mutante P7:80 zu finden, wurden im Folgenden zweidimensionale (2D) Gelelektrophoretische Analysen mit Proteinextrakten beider Bakterienstämme durchgeführt.

Hierzu wurden nach Standardmethoden Extrakte von sezernierten Proteinen und zellulären Komponenten der Mutante P7:80 und des Wildtyps hergestellt. Diese wurden separat analysiert, indem die Proteine zunächst elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt wurden. Anschließend folgte jeweils eine isoelektrische Fokussierung, die die Trennung der Proteinmischung in der zweiten Dimension in Abhängigkeit der Verteilung von positiv und negativ geladenen Aminosäuren ermöglicht. In den Abb. 21 und 22 sind entsprechende zweidimensionale Polyacrylamidgele von *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante P7:80 dargestellt. Der Vergleich der Gele des Wildtyps mit denen der Mutante ergibt bereits bei oberflächlicher optischer Analyse eine Vielzahl von Proteinbanden, die bei P7:80 entweder fehlen oder zusätzlich auftreten. Bei zusätzlichen Proteinen der Mutante könnte es sich um potentielle Substrate handeln, die durch STRAMP in funktionell wirksame Moleküle umgewandelt werden sollten. Gleichzeitig fehlende Banden lassen darauf schließen, daß mögliche Produkte der Reaktionen von STRAMP in der Mutante P7:80 nicht auftreten, die Auswirkungen auf die Virulenz von *B. pseudomallei* haben könnten. Die schon erwähnte Pleiotropie von *stramp*, die sich in den Ergebnissen der Wurmexperimente widerspiegelt, wird durch diese Resultate bestätigt.

Gegenwärtig durchgeführte Arbeitsschritte zur Identifizierung der Proteine im Anschluß an die 2D-Gelelektrophorese sind Ausstanzen der Banden, tryptische Spaltung und präzise Ermittlung der Molekulargewichte der Proteinfragmente durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Auf diese Weise ermittelte Proteinfragmente werden anschließend mit der in eine Aminosäuresequenz translatierte Genomdatenbank von *B. pseudomallei* verglichen. Ausreichende Sequenzinformationen ermöglichen eine eindeutige Identifizierung derjenigen Proteine, die im Wildtyp oder der Mutante zusätzlich vorhanden sind oder fehlen. Mit derartigen Informationen wäre ein weiterer Schritt zur Aufklärung des Pathogenitätsmechanismus von *B. pseudomallei* gegeben.



**Abbildung 21:** Vergleich von silbergefärbten 2D-Proteingelen zellulärer Extrakte des Wildtyps von *B. pseudomallei* E8 (A) und der Mutante P7:80 (B). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 80 µg (Gradient 12-15%). In beiden Gelen ist ein beispielhafter Bereich mit auffälligen Unterschieden hervorgehoben.

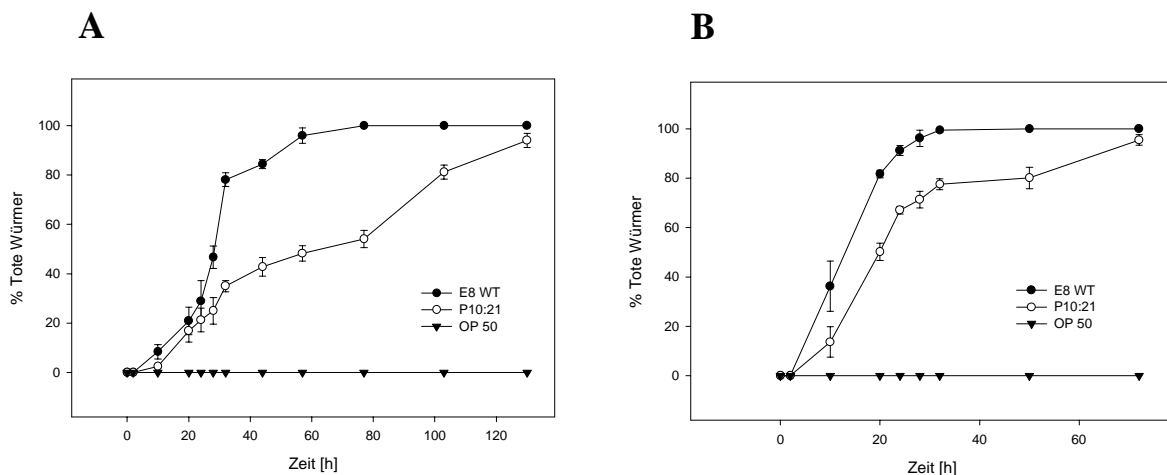


**Abbildung 22:** Vergleich von Coomassie-gefärbten 2D-Proteingelen von Extrakten aus Überständen des *B. pseudomallei* E8 WT (A) und der Mutante P7:80 (B). Der Gradient betrug 12-15%, der IPG pH-Bereich erstreckte sich von 3-10. Exemplarische Bereiche mit unterschiedlichen Proteinbanden sind hervorgehoben.

### 5.5.7 Untersuchungen mit der Mutante P10:21 im *C. elegans*-Assay

Die Mutante P10:21 ist zunächst dadurch aufgefallen, daß die Würmer im modifizierten fast killing-Assay über einen längeren Zeitraum vitaler aussahen als unter gleichen Bedingungen dem Wildtyp ausgesetzte Tiere. Zur quantitativen Erfassung dieser ersten Beobachtungen wurden die Experimente auch in diesem Fall in größerem Maßstab (50-80 Tiere auf Petrischalen,  $\varnothing = 5.5$  cm) durchgeführt. Abb. 23 zeigt die Resultate zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Die Ergebnisse zeigen, daß das *C. elegans*-Assay Schwankungen unterliegen kann. Hierfür sind möglicherweise die nicht konstant zu haltende Raumtemperatur des zur Verfügung stehenden S3-Labors und auch die unterschiedliche Größe der jeweils drei Tage zuvor präparierten Würmer verantwortlich. Obwohl die Sterbekinetiken sich über unterschiedliche Zeiträume erstreckten, kann als Hauptaussage festgehalten werden, daß die Würmer auf einem Bakterienrasen der Mutante P10:21 im modifizierten fast killing-Assay deutlich verzögert im Vergleich zu solchen Würmern starben, die dem E8 WT ausgesetzt waren.

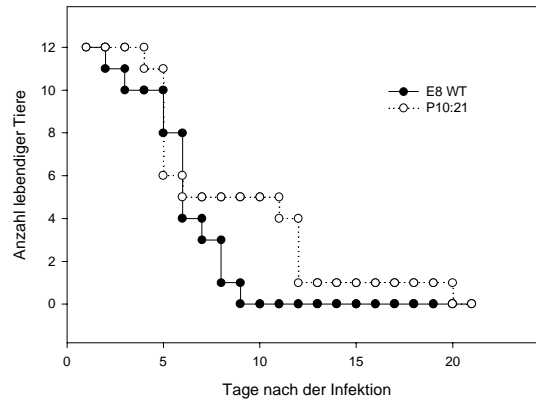
Im Fall dieser Mutante wurden weder bei der Koloniegröße noch beim Wachstum in Flüssigkultur ein Unterschied zum E8 WT festgestellt. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß Unterschiede im Wurmverhalten durch ein vom Wildtyp abweichendes Wachstumsverhalten ausgelöst wurden.



**Abbildung 23:** Auswirkungen von P10:21 und E8 WT im Vergleich auf *C. elegans* N2 unter modifizierten fast killing (PGS ohne P)-Bedingungen. (A) und (B) stellen die Resultate zweier unter möglichst gleichen Bedingungen durchgeführter Experimente dar. Sie wurden unabhängig voneinander mit jeweils Dreifachwerten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

### 5.5.8 *In vivo*-Charakterisierung von P10:21 im Mausmodell

Das unter 5.5.3 vorgestellte Mausinfektionsmodell wurde auch für die weitere Untersuchung der Mutante P10:21 eingesetzt. Es sollte auch hier untersucht werden, ob die Ergebnisse des *C. elegans*-Modells mit denen des Säugetiermodells korrelieren.



**Abbildung 24:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante P10:21. Die Balb/c-Mäuse wurden intranasal mit einer Dosis von  $2 \times 10^2$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Aus Abb. 24 ist ersichtlich, daß die mit der Mutante intranasal infizierten Tiere mit einer verzögerten Kinetik sterben. Während die mit dem WT infizierten Tiere nach einer Woche verstorben sind, lebten zu diesem Zeitpunkt noch 42% der Mäuse, die die gleiche Dosis der Mutante erhalten hatten. Die letzte der 12 mit P10:21 infizierten Mäuse starb erst nach fast drei Wochen. Somit wird auch bei dieser Mutante die im *C. elegans*-Modell gefundene Virulenzreduktion im Mausinfektionsmodell bestätigt. Es bleibt allerdings festzuhalten, daß im Vergleich zu P7:80 die für P10:21 im Wurmodell größere Verzögerung der Sterbekurven im Mausmodell nicht zu einer entsprechend reduzierten Virulenzreduktion führt.

### 5.5.9 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante P10:21

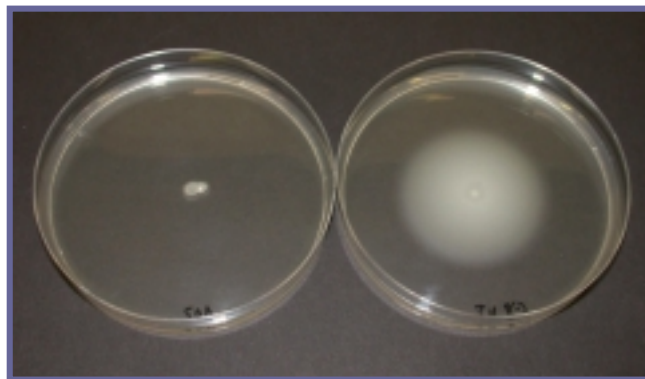
Die Identifizierung des in P10:21 gestörten Gens wurde wie unter 5.5.4 ausführlich beschrieben durchgeführt. Als primäres Sequenzierungsergebnis wurde für die Mutante P10:21 eine Abfolge von 327 bp ermittelt. Nach 4.2.2.20 wurde ein ORF mit 1605 bp bestimmt (Chromosom 1, Position 530539-532152, die vollständige ORF-Sequenz befindet sich im Anhang 8.1.2). Innerhalb dieses ORF wurden zwei weitere potentielle ORF mit einer Größe von 1266 bzw. 885 bp gefunden. Alle drei ORF enden mit dem gleichen Stopcodon. Ein Vergleich des größten ORF und des daraus resultierenden Proteins (534 Aminosäuren) mit den Daten in GenBank ergab weder auf Nukleotid- noch auf Proteinebene signifikante Übereinstimmungen. Aussagen zur Bedeutung des Gens für die Virulenz des Gens sind daher nicht möglich.



## 5.6 Charakterisierung von motilitätsdefizienten Mutanten

### 5.6.1 Untersuchung mit der Mutante 102 im Motilitäts-Assay

Die Mutante 102 ist im Screening dadurch aufgefallen, daß sie sich im Gegensatz zum Wildtyp auf 0.3% LB-Agar nicht bewegte. Weitere Abweichungen vom Phänotyp des Wildtyps, seinen biochemischen Eigenschaften und des Wachstumsverhaltens wurden nicht festgestellt. Beim Screening auf Motilität wurden fast 50 Mutanten gleichzeitig in einer Petrischale auf ihre Beweglichkeit hin untersucht. Die aufgefallene Mutante 102 wurde zur Bestätigung des Ergebnisses bei einem weitaus größeren Platzangebot erneut auf einer Motilitätsplatte kultiviert. Um einen direkten Vergleich mit dem Wildtyp zu ermöglichen, wurde dieser gleichzeitig auf einer weiteren Platte angeimpft und beide ÜN bei 37 °C bebrütet. Das Resultat dieses Experimentes ist in Abb. 25 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen wie sich die Wildtypbakterien kreisförmig vom Animpfport fortbewegen. Nach einer weiteren Nacht bei 37 °C ist der Agar der Platte vollständig mit Bakterien bewachsen. Im Gegensatz dazu vermehren sich die Mutantenbakterien am Ort der Inokulation ohne sich über die Platte zu verteilen.

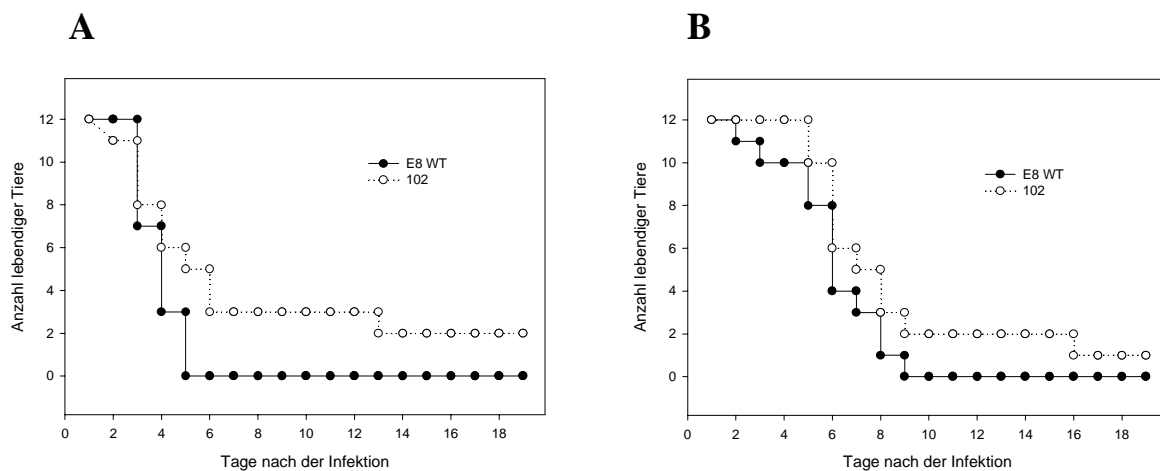


**Abbildung 25:** Motilitätsverhalten der Mutante 102 (links) im Vergleich zum E8 WT (rechts). Die am Tag der Inokulation hergestellten Motilitätsplatten wurden mit einem Zahnstocher mit wenig Koloniematerial angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert.

Dieser deutlich zu erkennende Motilitätsdefekt der Mutante 102 hatte im Screening mit *C. elegans* keine Auswirkung. Bisher hatte sich ergeben, daß beide im *C. elegans*-Assay detektierten, auffälligen Mutanten auch im Mausmodell eine Virulenzreduktion zeigten. Allerdings ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, ob alle im Mausmodell virulenzreduzierten Mutanten zwangsläufig im Nematodenmodell detektierbar wären. Zur Untersuchung der Frage, ob die Unbeweglichkeit dieser Mutante Auswirkungen auf ihre Virulenz hat, wurde sie im Folgenden im Mausinfektionsmodell näher charakterisiert.

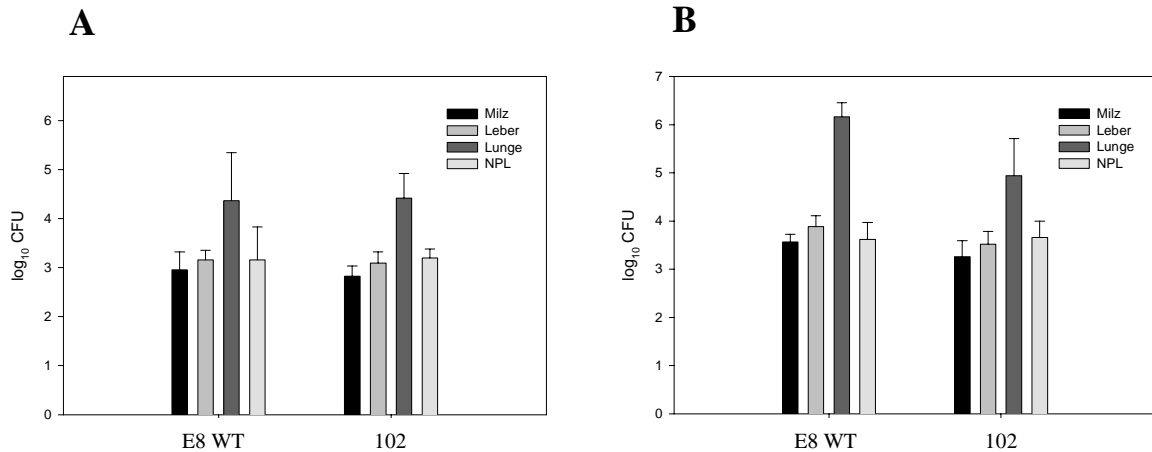
### 5.6.2 *In vivo*-Charakterisierung der Mutante 102 im Mausmodell

Das unter 5.5.3 vorgestellte Mausinfektionsmodell wurde auch für die an dieser Stelle untersuchte Mutante 102 sowie alle weiteren zu beschreibenden Mutanten eingesetzt. Die in Abb. 26 dargestellten Sterbekurven beider Mausstämme nach intranasaler Infektion mit der Mutante 102 zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen leichte Attenuierung. Während nach fünf Tagen alle mit dem WT infizierten C57BL/6-Tiere verstorben waren, lebten zu diesem Zeitpunkt noch 42% der Mäuse, die mit der Mutante infiziert waren. Bei den Balb/c-Mäusen verstarben die mit dem WT infizierten Tiere innerhalb der ersten Woche, während 17% der mit der Mutante infizierten Mäuse doppelt so lange lebten. Obwohl diese Tiere länger lebten, sahen sie nicht vitaler aus als die mit dem Wildtyp infizierten Mäuse.



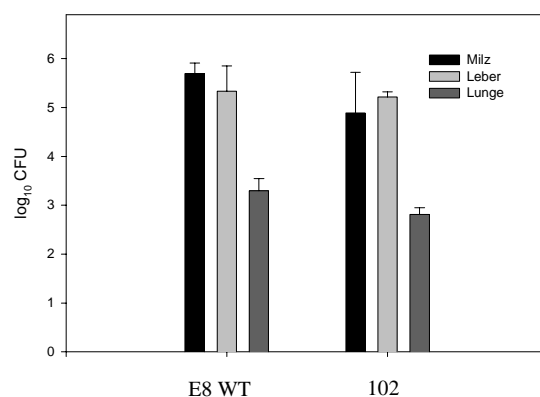
**Abbildung 26:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante 102. (A) Die C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit einer Dosis von  $1 \times 10^5$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. (B) Die Balb/c-Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^2$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Nachdem der Verlauf der Krankheit und die Mortalität in den ersten Tagen bei allen Tieren beider Stämme sehr ähnlich zu sein schienen, gab es mit der Mutante infizierte Tiere, die der Infektion widerstanden und zum Zeitpunkt der Sektion (Tag 13 und 19) sterile Organe aufwiesen. Folgearbeiten sollten zeigen, wie sich die Situation 24 Stunden nach einer intranasalen Infektion in verschiedenen Organen des Organismus darstellt. Hierzu wurde wie unter 5.5.3 vorgegangen. Die CFU von E8 WT und der Mutante 102 in den nasal-pharyngealen Spülungen beider Mausstämme waren 24 Stunden nach der Infektion nahezu gleich. Während auch für die anderen Organe der C57BL/6-Mäuse keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden (Abb. 27A), stellte sich die Situation in den Balb/c-Mäusen folgendermaßen dar: Die Abweichungen in den Milzen waren nicht signifikant (P-Wert 0.053), für die Lebern (P-Wert 0.012) dagegen wurden signifikante, aber geringe Unterschiede an CFU bestimmt. Die Unterschiede in den CFU der Lungen (P-Wert 0.009) waren signifikant (Abb. 27B).



**Abbildung 27:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante 102. Untersucht wurden die Bakterienanzahlen 24 Stunden nach Infektion. Dargestellt sind die aus 4 Tieren gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen in Milz, Leber, Lunge und den nasal-pharyngealen Spülungen von C57BL/6-Mäusen (A) sowie die aus 8 Tieren gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen in Milz, Leber, Lunge und den nasal-pharyngealen Spülungen in Balb/c-Mäusen (B). Alle Tiere wurden intranasal mit einer Dosis von  $5 \times 10^3$  Bakterien infiziert.

Alle bisherigen Daten zur Infektion durch die Mutante 102 wurden aus Experimenten mit intranasaler Applikation gewonnen. Zusätzlich wurde untersucht, ob nach intravenöser Infektion abweichende Ergebnisse erhalten werden. Hierzu wurden wiederum 24 Stunden nach Infektion Milz, Leber und Lunge der infizierten Tiere auf ihren Gehalt an Bakterien untersucht. Auch bei dieser Applikationsart wurden signifikante Unterschiede für Milz (P-Wert 0.032) und Lunge (P-Wert 0.007) errechnet (Abb. 28). Die in den Lungen nachgewiesenen CFU lagen aufgrund der intravenösen Applikationsart um etwa zwei log-Stufen unter denen der anderen Organe.



**Abbildung 28:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante 102. Untersucht wurden die Bakterienanzahlen 24 Stunden nach intravenöser Infektion von Balb/c-Mäusen. Dargestellt sind die jeweils aus 5 Tieren gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen in Milz, Leber und Lunge. Die Infektionsdosis betrug  $5 \times 10^3$  Bakterien.

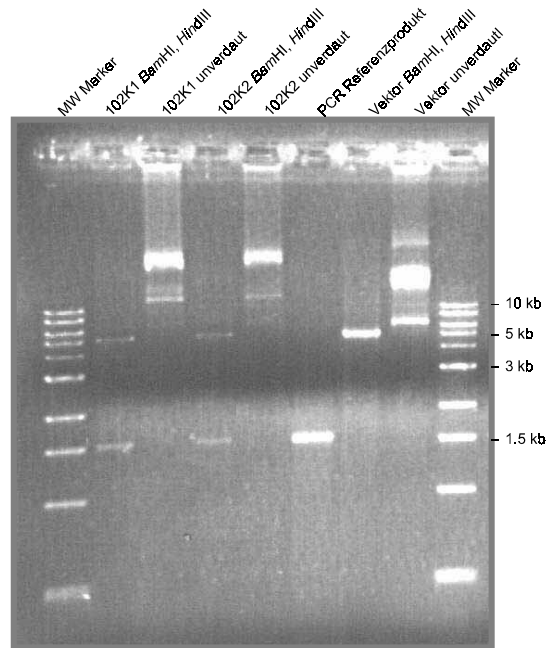
Abschließend bleibt festzuhalten, daß die Applikation der unbeweglichen Mutante 102 in beiden Mausstämmen leichte Verzögerungen in den Sterbekurven im Vergleich zum Wildtyp zur Folge hatte. Der klinische Zustand der Mäuse nach der Infektion - im Gegensatz zu mit der Mutante P7:80 infizierten Mäusen - war allerdings vergleichbar mit dem der Mäuse, die mit dem Wildtyp infiziert waren. Untersuchungen zur Bakterienanzahl von Wildtyp und Mutante 102 in verschiedenen Organen 24 Stunden nach sowohl intranasaler als auch intravenöser Applikation ergab geringe, aber signifikante Abweichungen in Leber und Lunge bei intranasal infizierten Balb/c-Mäusen und bei Milz und Lunge bei intravenös infizierten Tieren des gleichen Stammes, die allerdings auf den Verlauf der Infektion praktisch keine Auswirkungen hatten. Bei C57BL/6-Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

### 5.6.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante 102

Die ersten Schritte zur Identifizierung des defekten Gens wurden wie unter 5.5.4 beschrieben durchgeführt. Als primäres Sequenzierungsergebnis wurde eine Abfolge von 756 bp erhalten. Entsprechend Abschnitt 4.2.2.20 wurde ein ORF aus 1167 bp bestimmt, der zu 99% mit dem Flagellin (*fliC*) des *B. pseudomallei*-Stammes E503 übereinstimmt (GenBank AF030239). Das Gen liegt auf dem Chromosom 1 an Position 3937675-3938813, die vollständige ORF-Sequenz ist in Anhang 8.1.3 gezeigt. Flagelline sind Proteine, aus denen die zur Bewegung notwendigen Flagellenfilamente begeißelter Bakterien aufgebaut sind. Bei *Salmonella typhimurium* beispielsweise bilden 11 Flagellinmoleküle, die Protofilamente, das helikale, propellerartige Flagellenfilament [120]. *B. pseudomallei* besitzt 2-4 polar angeordnete Flagellen. Wird das Flagellin durch Transposoninsertion zerstört, ist die Unbeweglichkeit, wie z.B. bei der Mutante 102, die zwangsläufige Folge.

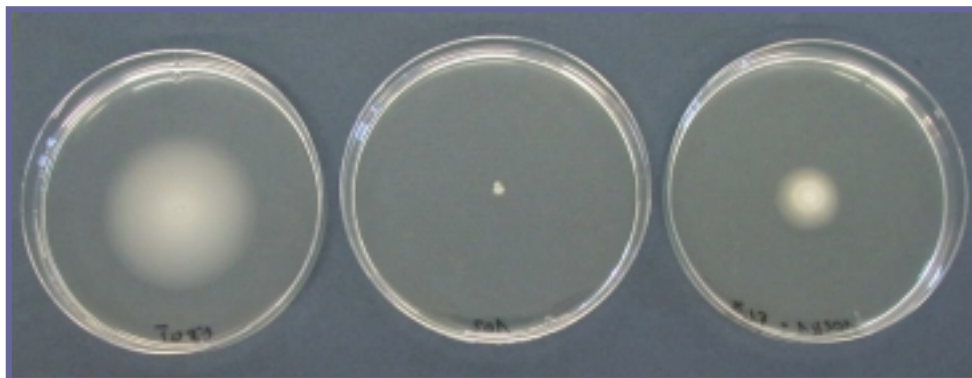
### 5.6.4 Komplementation des Flagellins *fliC* der Mutante 102

Parallel zu den unter 5.5.4 beschriebenen Arbeiten zur Komplementation der Mutane P7:80 wurde die Komplementation der Mutante 102 durchgeführt. In diesem Fall war das Ziel die Beweglichkeit der Mutante durch *in trans*-Komplementation wiederherzustellen. Mit Hilfe der Primer BF13 und BF14 wurde das Flagellin (1167 bp) zuzüglich 339 Basenpaaren am 5'-Ende zur Erfassung eventueller Promotoren synthetisiert. Das 1512 bp große Produkt wurde in den Vektor pBBR1MCS-2 ligiert, der anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert wurde. Gemeinsame ÜN-Inkubation von Transformant, Helferstamm und der Mutante führte zu Konjugation und somit zu Komplementanten, die auf Antibiotikaplatten selektiert wurden. Die Präparation der Plasmide mehrerer Komplementanten mit anschließender Restriktionspaltung durch *Bam*HI und *Hind*III hat sowohl die Existenz des Vektors (5144 bp) als auch des Inserts (1512 bp) in den Komplementanten bewiesen. Das Agarosegel zum analytischen Nachweis entsprechender Fragmente ist in Abb. 29 dargestellt.



**Abbildung 29:** Agarosegel mit den Plasmiden der Komplementanten 102K1 und 102K2 sowie deren Spaltungsprodukten nach Inkubation mit *Bam*HI und *Hind*III. Der linearisierte Vektor und das PCR-Produkt sind als Referenzen aufgetragen. Als Marker ist ein Größenstandard mit DNA-Fragmenten von 0.5 bis 10 kb aufgetragen.

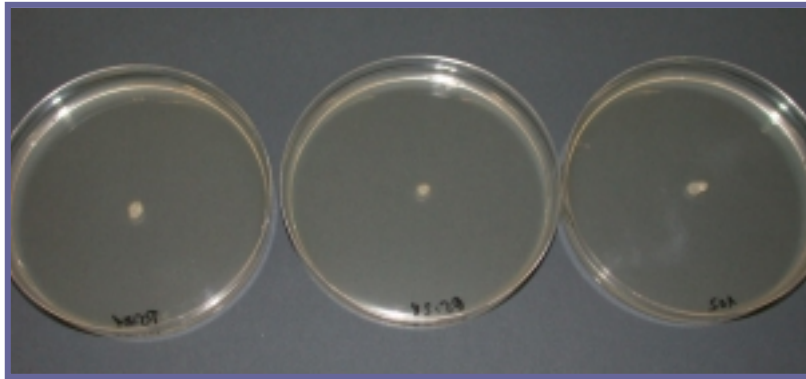
Nachdem die *fliC*-DNA in den Komplementanten von 102 nachgewiesen wurde, sollte durch Animpfen und Bebrüten der Komplementanten auf Motilitätsplatten untersucht werden, ob die Bewegungsfähigkeit reinduzierbar ist. Es zeigte sich im Beweglichkeitsassay, daß die komplementierte Mutante 102K1 ihre Motilität wiedererlangte. E8 Wildtyp, Mutante 102 und Komplementante 102K1 sind im direkten Vergleich in Abb. 30 dargestellt. Mit diesem Ergebnis ist gezeigt, daß die Motilität durch *in trans*-Komplementation bei der *fliC*-Defektmutante von *B. pseudomallei* wiederhergestellt wurde.



**Abbildung 30:** Motilitätsplatten, die mit E8 WT (links), der Mutante 102 (mitte) und der Komplementante 102K1 (rechts) angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert waren.

### 5.6.5 Untersuchungen mit den Mutanten P5:28 und P5:81 im Motilitäts-Assay

Die Mutanten P5:28 und P5:81 fielen ebenso wie die zuvor beschriebene Mutante 102 beim Screening im Motilitäts-Assay in gleichem Maße durch ihre Unbeweglichkeit auf. Auch auf größeren Platten waren die Kulturen der drei Mutanten nicht unterscheidbar (Abb. 31). Ebenso wie die Mutante 102 waren auch diese beiden Mutanten in keiner untersuchten biochemischen Eigenschaft oder ihrem Wachstumsverhalten vom Wildtyp zu unterscheiden. Da aber bekannt ist, daß z.B. bei *E. coli* etwa 50 Gene für die Flagellinsynthese und die Chemotaxis benötigt werden, kann eine ähnliche Anzahl auch für *B. pseudomallei* erwartet werden [34]. Diese Tatsache macht es unwahrscheinlich, daß alle drei Mutanten ihre Defekte im gleichen Gen haben. Ziel der folgenden Arbeiten war es, die zerstörten Gene der unbeweglichen Mutanten P5:28 und P5:81 zu bestimmen und Untersuchungen zu ihrer Beteiligung an der Virulenz von *B. pseudomallei* durchzuführen.

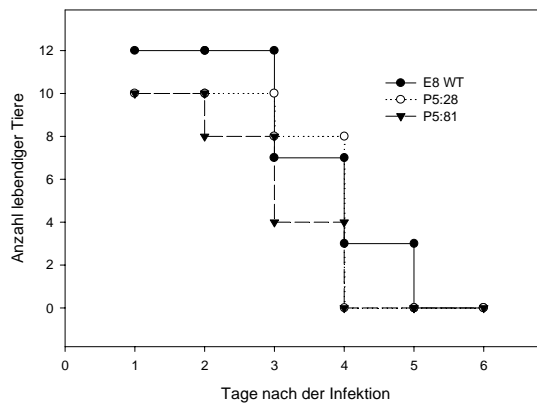


**Abbildung 31:** Motilitätsplatten, die mit P5:81 (links), P5:28 (mitte) und der Mutante 102 (rechts) angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert waren.

Der Einsatz dieser beiden Mutanten im *C. elegans*-Modell erbrachte keinerlei Auffälligkeiten bezüglich der Sterbekinetik. Es ist jedoch nicht möglich eine Korrelation zur Virulenz im Mausmodell vorherzusagen. Daher wurden beide Mutanten im Mausinfektionsmodell eingesetzt.

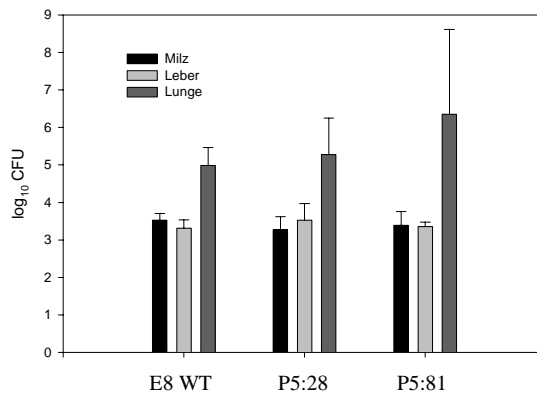
### 5.6.6 *In vivo*-Charakterisierung von P5:28 und P5:81 im Mausmodell

C57BL/6-Mäuse wurden nach Standardmethodik intranasal mit den Mutanten P5:28 und P5:81 sowie dem WT infiziert. Die daraus resultierenden Sterbekurven (Abb. 32) weisen keinerlei Unterschiede zueinander auf, d.h. die hier untersuchten Defektmutanten besitzen eine mit dem WT vergleichbare Virulenz im Mausmodell. Alle Tiere starben innerhalb von fünf Tagen nach Infektion.



**Abbildung 32:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und den Mutanten P5:28 und P5:81. Die C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit einer Dosis von  $1 \times 10^5$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die ebenfalls ermittelten 24 h-Werte nach intranasaler Infektion mit den genannten Bakterien ergaben ein entsprechend einheitliches Bild. Die Bakterienanzahlen in Milz und Leber waren für alle Tiere nahezu identisch, während sie für die untersuchten Lungen leicht schwankten, aber mit P-Werten von 0.37 (P5:28) und 0.14 (P5:81) keinen signifikanten Unterschied zum WT aufwiesen (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und den Mutanten P5:28 und P5:81. Untersucht wurden die Bakterienanzahlen in verschiedenen Organen 24 Stunden nach intranasaler Infektion von Balb/c-Mäusen. Dargestellt sind die jeweils aus 5 Tieren gemittelten CFU-Werte mit Standardabweichungen in Milz, Leber und Lunge. Die Infektionsdosis betrug  $5 \times 10^3$  Bakterien.

Die bisherigen Ergebnisse zu den Mutanten P5:28 und P5:81 geben keinen Anlaß zu vermuten, daß die durch Transposonmutagenese zerstörten Gene einen Beitrag zur Virulenz von *B. pseudomallei* leisten. In den folgenden Schritten wurde die Identität der Defektgene der Mutanten analysiert. Mit Hilfe von Datenbankeinträgen wurden Homologien zu ähnlichen Genen bzw. ihren Produkten bestimmt, deren Funktionen im bakteriellen Bewegungsapparat anderer Spezies schon näher charakterisiert wurden.

### 5.6.7 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutanten P5:28 und P5:81

Nach Durchführung der unter 5.5.4 ausführlich beschriebenen Arbeitsschritte ergab sich für die Mutante P5:28 ein primäres Sequenzierungsergebnis von 311 bp. Nach 4.2.2.20 wurde ein ORF von 1152 bp bestimmt. Diese Sequenz ist identisch mit dem Abschnitt von Position 27862-29013 des Chromosoms 1 von *B. pseudomallei*. Die vollständige ORF-Sequenz ist in Anhang 8.1.4 dargestellt. Ein Vergleich mit den Nukleotidsequenzen in GenBank ergab eine Identität von 82% für einen 118 bp großen Abschnitt des *flagellar motor switch (fliM)* Gens (1008 bp, GenBank AF283286) von *Ralstonia solanacearum*, dem in dieser Arbeit unter 5.5.4 schon erwähnten Pflanzenpathogen. Bei einem direkten Vergleich der vollständigen Sequenzen beider Gene errechnet sich eine geringere Homologie von 51%. Der translatierte ORF von P5:28 ergibt ein hypothetisches Protein aus 383 Aminosäuren, für das keine Sequenzübereinstimmung gefunden wurde.

Für die Mutante P5:81 wurde ein entsprechendes Prozedere durchgeführt. Als primäres Sequenzierungsergebnis wurden 471 bp bestimmt, die sich zu 100% einem Abschnitt des Contig Burk887b06.q1cc (Sanger Institut, 30.11.2001) zuordnen ließen. Nach 4.2.2.20 wurde ein ORF von 1035 bp bestimmt, in dem schließlich ein 39 bp großer Abschnitt als Kontamination erkannt wurde. Dies bestätigte den vom Sanger Institut ausgegebenen Hinweis, daß sich bis zur vollständigen Annotierung Fehler in den veröffentlichten Sequenzdaten befinden können. Das reverse Komplement der resultierenden 996 bp ließ sich vollständig den aktuellen Sequenzierungsdaten des *B. pseudomallei* Chromosom 1 zuordnen (Position 239562-240557, vollständige ORF-Sequenz siehe Anhang 8.1.5). Datenbankvergleiche auf Nukleotidebene ergaben eine 92% Identität mit dem Gen des *flagellar motor switch protein (fliG)* von *Burkholderia cepacia* (GenBank AF453480), einem sehr nahen Verwandten von *B. pseudomallei*. Neben einer weitaus geringeren Übereinstimmung mit einem Abschnitt des *Ralstonia solanacearum* GMI1000 Megaplasmids (GenBank AL646078) wurden keine weiteren signifikanten Ähnlichkeiten auf Nukleotidebene gefunden.

Translation des ORF der Mutante P5:81 ergibt ein Protein aus 331 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 36.4 kDa und einem isoelektrischen Punkt pI von 4.7. Es besitzt eine FliG C-terminale Domäne, wobei FliG eine Komponente des Flagellenrotors ist, die in etwa 25 Kopien pro Flagelle vorkommt. Die spezifische Funktion dieser Domäne liegt in der Motorrotation. Ein Datenbankvergleich auf Proteinebene liefert eine hohe Anzahl von homologen Proteinen, die sämtlichst als *flagellar motor switch protein* verschiedener Bakterien beschrieben sind. Die höchste Homologie besteht mit dem *flagellar motor switch protein* von *B. cepacia* mit einer Identität von 90%.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß beide unbeweglichen Mutanten Defekte in Genen haben, die Homologien zu *flagellar motor switch*-Genen verschiedener mikrobieller Organismen besitzen, nicht aber das Flagellieren selbst betreffen. Interessanterweise ist die Ähnlichkeit beider *B. pseudomallei*-Gene untereinander insgesamt nicht signifikant (53%), wobei es auch keine konservierten Bereiche gibt.



## 5.7 Charakterisierung einer Mutante mit Defekt in der Sekretion von Lecithinase und Chitinase

### 5.7.1 Untersuchungen mit der Mutante F12 im Lecithinase- und Chitinase-Assay

Die Mutante F12 ist in den biochemischen Screening-Assays dadurch aufgefallen, daß sie sowohl auf der Lecithinase- als auch der Chitinaseplatte keine Reaktion zeigte, während der WT und alle anderen Mutanten deutlich positiv reagierten. Abweichend von den bisher in dieser Arbeit vorgestellten Mutanten wurden damit erstmals gleichzeitig zwei vom WT abweichende Eigenschaften detektiert, die durch den einmaligen Einbau eines einzigen Transposons hervorgerufen wurden. Weitere Unterschiede zum Wildtyp, insbesondere bezüglich des Phänotyps oder des Wachstumverhaltens, wurden für diese Mutante nicht festgestellt.

Das Ergebnis der Lecithinaseplattenreaktion wurde mit der Durchführung des NPPC-Assays (4.2.5.2) zum Nachweis der Phospholipasen C oder D im Überstand einer ÜN-Kultur der Mutante F12 ergänzt. Beide Nachweismethoden wurden schließlich auch für die ultraschallbehandelten zellulären Extrakte der Bakterien angewandt. Diese Experimente ergaben, daß im Überstand der Mutante F12 weder Lecithinase noch die Phospholipasen C und D nachweisbar waren ( $OD_{405} < 0.01$ ). Die dreimal je 10 min mit Ultraschall behandelten, verdünnten zellulären Extrakte ergaben jedoch eindeutig positive Reaktionen im NPPC-Assay ( $OD_{405} > 0.5$ ), während sich die Lecithinaseplatten nicht als ausreichend sensitiv erwiesen.

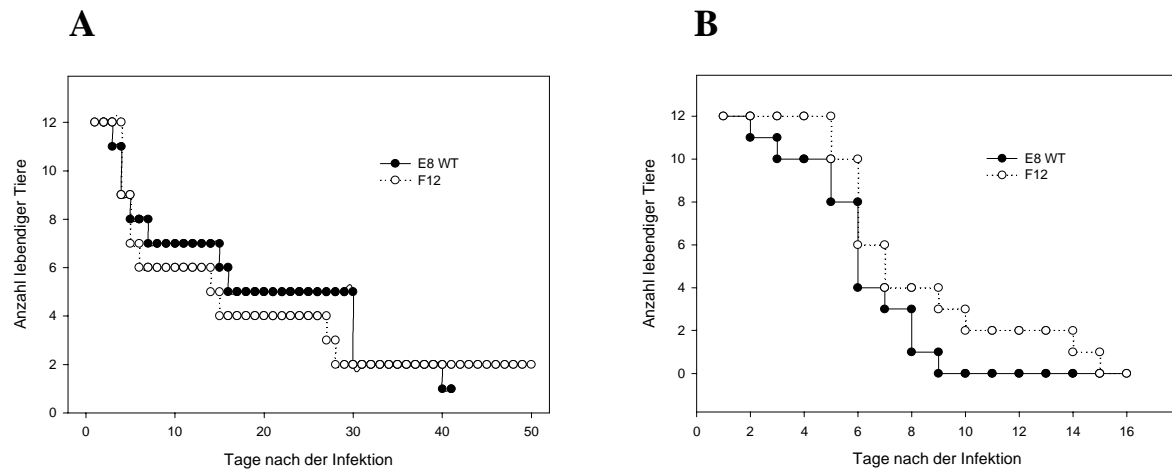
Zum Nachweis der Chitinase wurde entsprechend vorgegangen, wobei zur Analytik lediglich die erwähnten Chitinaseplatten zur Verfügung standen. Darauf bei 37 °C gewachsene Bakterien und Überstände von LBB-ÜN-Kulturen erbrachten negative Reaktionen, d.h. keine Chitinaseaktivität. Die behandelten zellulären Extrakte zeigten nach ÜN-Inkubation bei 37 °C eine schwach positive Reaktion. Die untersuchten Enzymaktivitäten sind somit in den zellulären Extrakten, nicht aber in den Überständen der Mutante F12 enthalten. Im Folgenden wurde die Auswirkung des Defektes auf die Virulenz von *B. pseudomallei* im Mausinfektionsmodell untersucht, sowie der molekularbiologische Hintergrund der Mutation analysiert.

### 5.7.2 *In vivo*-Charakterisierung von F12 im Mausmodell

Mäuse beider bisher verwendeter Stämme wurden mit der Mutante F12 und dem E8 WT intranasal mit gleichen Dosen infiziert und das Sterbeverhalten der Tiere wurde beobachtet (Abb. 34). Für die C57BL/6-Mäuse ergab sich unabhängig von dem zur Infektion eingesetzten Bakterienstamm eine mit dem WT vergleichbare Sterbekinetik. Drei Wochen nach Infektion lebten noch 42% der WT-behandelten Mäuse und 33% der F12-behandelten Tiere. Die an Tag 30 seziierten, mit dem WT infizierten Mäuse waren ebenso steril wie die an Tag 50 seziierten, mit F12 infizierten Tiere.

Die für *B. pseudomallei* empfänglicheren Balb/c-Mäuse verstarben alle an einer deutlich geringeren Dosis beider Bakterienstämme innerhalb von 1-2 Wochen. Dabei schienen die

Tiere, die mit der Mutante F12 infiziert waren leicht verzögert zu sterben. Ein Viertel dieser Tiere lebte noch, als die letzte mit E8 WT infizierte Maus verstarb. Dennoch überlebte kein F12-infiziertes Tier länger als zwei Wochen, so daß von einer wesentlichen Verzögerung und damit einer reduzierten Virulenz der Mutante gegenüber dem WT nicht gesprochen werden kann.



**Abbildung 34:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und der Mutante F12. (A) Die C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit einer Dosis von  $5 \times 10^3$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. (B) Die Balb/c-Mäuse wurden intranasal mit  $2 \times 10^2$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

### 5.7.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante F12

Zur Identifizierung des defekten Gens wurde wie unter 5.5.4 beschrieben vorgegangen. Als primäres Sequenzierungsergebnis wurde eine Abfolge von 507 bp des transposon-flankierenden Gens bestimmt. Mit Hilfe des reversen Komplements dieser Sequenz wurde nach 4.2.2.20 ein ORF von 2274 bp gefunden. Die vollständige Sequenz befindet sich mit 99% Identität auf Chromosom 1 von *B. pseudomallei* in Position 8395-10668. Die vollständige ORF-Sequenz ist im Anhang 8.1.6 dargestellt. Ein Vergleich mit den Nukleotidsequenzen von GenBank ergibt 100% Identität zum *general secretory pathway protein D* (*gspD*) von *B. pseudomallei* Stamm 1026b DbhB (GenBank AF110185). Weitere hohe Übereinstimmungen wurden zu einem Abschnitt des *general secretion pathway gene cluster* von *B. cepacia* (GenBank AB050004) gefunden, der ebenfalls für das *type-II secretion protein* (*gspD*) kodiert.

Der translatierte ORF von F12 ergibt ein hypothetisches Protein aus 757 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 78.4 kDa und einem isoelektrischen Punkt pI von 8.4. Es besitzt eine C-terminale konservierte Domäne, die als *bacterial type II and III secretion system protein* bezeichnet wird. Ein Datenbankvergleich auf Proteinebene liefert allein aufgrund der Domäne eine hohe Anzahl von homologen Proteinen, die alle als Proteine des *type II general secretion pathway* beschrieben werden. Das *gspD* protein von *B. pseudomallei*

wird als identisch wiedererkannt. Wie zu erwarten, wird das entsprechende Gen von *B. cepacia* mit nächst hoher Homologie genannt.

Es bleibt festzuhalten, daß die Transposoninsertion der Mutante F12 eindeutig in dem Gen erfolgte, das für das *gspD protein* des Typ II Sekretionssystems kodiert. Dieser Defekt bewirkt, daß bestimmte Proteine wie z.B. Phospholipasen und Chitinasen nicht mehr aus den Bakterien heraustransportiert werden.

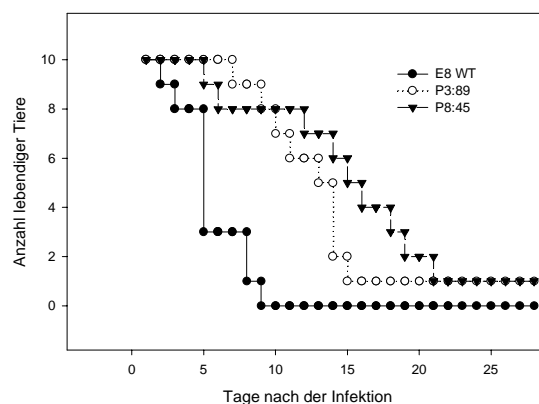
## 5.8 Charakterisierung von Mutanten mit einem Defekt in der Synthese von Polyhydroxyalkanoaten

### 5.8.1 Untersuchung der Mutanten P3:89 und P8:45 im Färbe-Assay

Die Mutanten P3:89 und P8:45 sind im Screening dadurch entdeckt worden, daß sie mit dem lipophilen Farbstoff Sudan Schwarz B im Gegensatz zum WT und allen anderen untersuchten Mutanten nicht anfärbbar waren. Dieses Phänomen wurde für beide Mutanten reproduzierbar sowohl mit Einzelkolonien als auch mit dichten Bakterienrasen beobachtet. Es konnten weder bezüglich des Wachstumsverhaltens noch aufgrund anderer Eigenschaften weitere Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Vom Farbstoff Sudan Schwarz B ist bekannt, daß er prinzipiell zur Unterscheidung von EPS-bildenden Bakterien und solchen, die ohne diese putativen Virulenzfaktoren existieren, geeignet ist [90]. Im Folgenden werden die Defekte und deren Auswirkungen auf die Virulenz von *B. pseudomallei* beschrieben.

### 5.8.2 *In vivo*-Charakterisierung von P3:89 und P8:45 im Mausmodell

Aus Abb. 35 ist zu erkennen, daß die Applikation beider Mutanten in Balb/c-Mäusen ein verzögertes Sterben dieser Tiere zur Folge hat. Als Vergleichswerte gelten auch hier die mit gleicher Dosis des Wildtyps infizierten Tiere.



**Abbildung 35:** Mausinfektionsmodell mit *B. pseudomallei* E8 WT und den Mutanten P3:89 und P8:45. Die Balb/c-Mäuse wurden intranasal mit einer Dosis von  $2 \times 10^2$  Bakterien infiziert. Dargestellt sind die kombinierten Daten der Sterbekurven aus jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Wie zu erwarten, verstarben alle mit dem WT infizierten Mäuse innerhalb der ersten Woche. Die letzte überlebende Maus mit P3:89-Infektion überlebte doppelt so lange, während die letzte der mit P8:45 infizierten Mäuse erst nach 21 Tagen verstarb. Nach 8 Tagen lebten nur noch 10% der mit dem Wildtyp infizierten Tiere, während zum gleichen Zeitpunkt noch 80 bzw. 90% der mit Mutanten infizierten Tiere lebte.

### 5.8.3 Molekularbiologische Charakterisierung der Mutanten P3:89 und P8:45

Nach Durchführung der unter 5.5.4 beschriebenen Arbeitsschritte ergab sich für die Mutante P3:89 als primäres Sequenzierungsergebnis eine Abfolge von 300 bp und für die Mutante P8:45 eine Sequenz von 298 bp. Entsprechend Abschnitt 4.2.2.20 wurde für beide Mutanten ein gemeinsamer ORF aus 1650 bp bestimmt (Chromosom 1, Position 1777165-1778814; die vollständige ORF-Sequenz ist in Anhang 8.1.7 gezeigt). Ein Vergleich mit den Nukleotidsequenzen in GenBank ergab 89% Identität mit einem Abschnitt des *polyhydroxyalkanoate biosynthesis gene cluster and unknown gene* von *Burkholderia* sp. DSMZ 9242. Der Cluster hat eine Größe von 5500 bp, wobei die primären Sequenzierungsergebnisse beider Mutanten ihren Beginn innerhalb des vorhergesagten *polyhydroxyalkanoate polymerase* Gens (GenBank AF153086, Position 468-2345) haben. Diese Tatsache bedeutet, daß das Transposon in beiden Mutanten in dieses Gen inserierte, wenn auch an unterschiedlichen Positionen, und es damit ausschaltete. Zwangsläufige Folge dieses Defektes ist eine Unterbrechung der Polyhydroxyalkanoatsynthese, womit dem Diazofarbstoff Sudan Schwarz B vermutlich ein Substrat zum Färben genommen ist. Weiterhin wurden Homologien zum Syntheseapparat von Polyhydroxybutyraten von *Pseudomonas putida* gefunden, allerdings in geringerem Ausmaß (GenBank AB085816). Die Übersetzung des ORF von P3:89 und P8:45 resultiert in einem hypothetischen Protein aus 549 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 60.5 kDa und einem isoelektrischen Punkt pI von 5.4. Es besitzt eine Domäne mit einer  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-ähnlichen Struktur, einer katalytischen Domäne, die in einer Vielzahl von Enzymen vorhanden ist. Ein Datenbankvergleich des vorhergesagten Proteins liefert Identität mit 50 weiteren Proteinen. Es handelt sich in allen Fällen um hochkonservierte Enzyme von Syntheseapparaten für Polyhydroxyalkanoate bzw. Polyhydroxybutyrate verschiedener Organismen. Mit höchster Ähnlichkeit werden erwartungsgemäß Proteine der Polyhydroxyalkanoatakkumulation in *Burkholderia* sp. genannt (GenBank AF153086).

Es ist festzuhalten, daß die in diesem Abschnitt beschriebenen Mutanten einen Defekt im gleichen Gen aufweisen. Die Transposonmutation hat jedoch an unterschiedlichen Positionen stattgefunden, aber das gleiche funktionelle Ergebnis zur Folge. Die Attenuierung beider Mutanten im Mausmodell ist ein Hinweis darauf, daß das Vorhandensein von Polyhydroxyalkanoaten auf die Virulenz von *B. pseudomallei* Auswirkungen hat.

## 5.9 Darstellung einer Cosmid-Genbank des Genoms von *Burkholderia pseudomallei*

Die vergleichende Analyse der Proteinexpression zwischen eng miteinander verwandten, aber in ihrer Virulenz völlig unterschiedlichen Bakterienspezies wie *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* diente als ein Ansatz zur Identifikation von Virulenzfaktoren. Durch die Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese mit partieller Proteinsequenzierung und MALDI-Massenspektrometrie konnten in einem bereits bearbeiteten Projekt Sequenzfragmente von Proteinen bestimmt werden, die nur bei virulenten Stämmen vorkommen. Mit diesen Informationen als Basis sollten spezifische Sonden zum Screening einer Cosmid-Genbank von *B. pseudomallei* hergestellt werden. Die molekulargenetische Analyse der so detektierten Klone mit der in ihnen enthaltenen genetischen Information potentieller Virulenzfaktoren sollte zur Bestimmung von Virulenzgenen von *B. pseudomallei* führen.

### 5.9.1 Herstellung einer Cosmid-Genbank von *Burkholderia pseudomallei* Umweltisolat E8 in *Escherichia coli*

Die Herstellung der Cosmid-Genbank wurde erfolgreich entsprechend Abb. 36 durchgeführt. Es wurden ca.  $2 \times 10^4$  Klone erzeugt, die in 80 Aliquots bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren wurden und für weitere Experimente zur Verfügung stehen.

### 5.9.2 Bestimmung der Qualität der Cosmid-Genbank

Eine Cosmid-Bank wird dann als gut und vollständig angesehen, wenn gezeigt werden kann, daß das komplette Genom des zu untersuchenden Organismus, zerlegt in eine große Anzahl von Fragmenten, in einen anderen Organismus wie *E. coli* kloniert wurde und wieder detektiert werden kann. Clarke und Carbon [22] haben eine allgemeine Formel entwickelt, mit der man das Verhältnis für die Wahrscheinlichkeit  $P$ , mit der eine bestimmte DNA-Sequenz in einer Bibliothek von  $N$  unabhängigen Rekombinanten vorkommt, errechnet wird:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{1}{n}\right)}$$

$N$  = Anzahl unabhängiger Rekombinanten

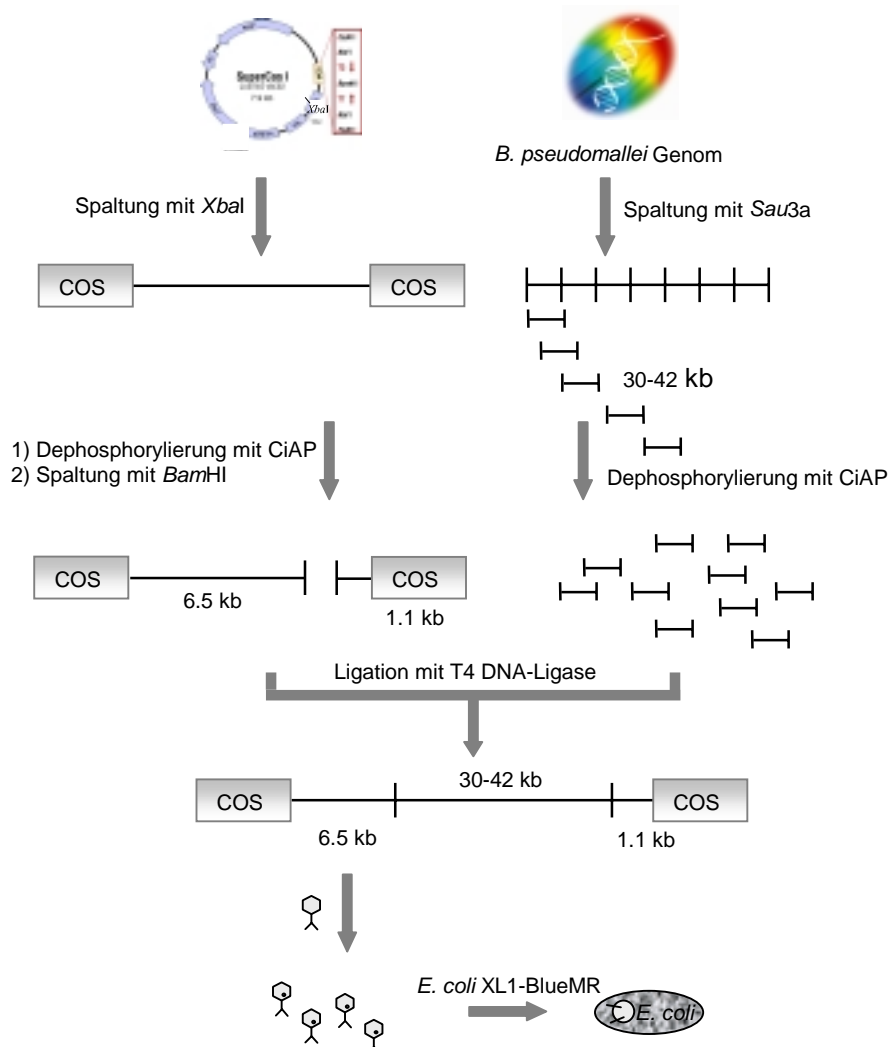
$P$  = Wahrscheinlichkeit

$n$  = Verhältnis von Genomgröße zur Größe der klonierten DNA-Fragmente

Mit der Formel läßt sich die Anzahl der zu untersuchenden Klone errechnen, die theoretisch nötig ist, um mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit (hier: 0.99) ein bestimmtes Gen des kompletten Genoms zu detektieren. Für eine Fragmentgröße von 30 – 42 kb und einem Genom von  $\sim 6.5$  Mb errechnet sich eine Anzahl von knapp 1000 Klonen zur Abdeckung des vollständigen Genoms.

Mit einer 100% komplementären Sonde (598 bp) zu einem Teil des Phospholipase C-Gens von *B. pseudomallei* [75] konnten von ca. 6000 untersuchten Klonen drei als positiv bestimmt werden. Mit dieser Quote von etwa 2000 zu untersuchenden Klonen für die Bestimmung eines definierten Gens konnte bestätigt werden, daß die Cosmid-Genbank gut und vollständig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich auch mit kleineren Sonden (91 bp) für Teile desselben Gens positive Klone detektieren lassen.

Auch wenn sich auf diesem Weg die gute Qualität der erzeugten Bank bestätigen ließ, wurde sie nicht für weitere Zwecke, nämlich die genetische Analyse potentieller Virulenzgene, eingesetzt. Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Organismus *B. pseudomallei* (Stamm K96243) am Sanger Institut in Großbritannien vollständig sequenziert. Somit sind die aus Arbeiten mit der Cosmid-Genbank erhofften Resultate leichter zugänglich und zunächst geplante Experimente waren von untergeordneter Priorität.



**Abbildung 36:** Zur Darstellung einer Cosmid-Bank wurde die genomische DNA des Organismus durch Spaltung mit der Endonuklease *Sau3a* in Fragmente im Größenbereich von 30–42 kb zerlegt. Der Cosmid-Vektor SuperCos I wurde durch Spaltung mit *XbaI* linearisiert. Durch Dephosphorylierung sämtlicher DNA-Enden und nachfolgende Spaltung der Vektor-DNA mit *Bam*HI in zwei Teilstücke wurde eine selektive Ligation ermöglicht. Die resultierenden linearen Nukleinsäuren aus der Vektor-DNA mit integrierten Fragmenten aus genomischer *B. pseudomallei*-DNA wurden anschließend mit Hilfe eines Phagen zirkularisiert und in *E. coli* eingefügt. Die auf Antibiotikaplatten wachsende Bank wurde resuspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  langzeitgelagert.

## 6. Diskussion

Kenntnisse der Pathogenese einer Infektionskrankheit sowie der Virulenzfaktoren des Erregers bieten eine notwendige Basis für Diagnostik und Therapie. Einen besonders wertvollen Beitrag dazu leisten heute die Ergebnisse der Sequenzierungen kompletter mikrobieller Genome, wie z.B. auch von *Burkholderia pseudomallei*, dessen Genomanalyse zu Beginn dieser Arbeit begonnen war. Die unerwartet zügige Fertigstellung dieses Projektes am Sanger Institut in Cambridge bedeutete zum einen, daß die im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit hergestellte Cosmid-Genbank zunächst nicht mehr eingesetzt wurde, und zum anderen, daß für die Analyse von Transposonmutanten eine wichtige Basis gegeben war. Mit dem Ziel virulenzreduzierte Mutanten zu identifizieren, wurde zunächst eine *B. pseudomallei*-Mutantenbank *in vivo* mit *C. elegans* getestet, wobei dort auffällige Mutanten später im Mausinfektionsmodell untersucht wurden. Gleichzeitig wurde die Mutantenbank *in vitro* hinsichtlich ausgewählter Eigenschaften analysiert, die bereits mit bakterieller Pathogenität in Verbindung gebracht wurden.

### 6.1 Transposonmutagenese des Genoms von *B. pseudomallei* zur Identifikation virulenzreduzierter Mutanten

Die in dieser Arbeit zum Einsatz gelangte Technik der Transposonmutagenese wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe für das bakterielle Pathogen *Burkholderia pseudomallei* verwendet [34, 32]. Da die von DeShazer et al. beschriebene Durchführung in unserem Labor nicht zu Erfolg führte, mußten einige, unter 5.1 genannte, experimentelle Variationen eingebracht werden, die zu hohen Ausbeuten und Zeitersparnis führten. Neben diesen Vereinfachungen erwies es sich weiterhin als günstig, isolierte Mutanten in 96-Well-Platten anzuzüchten, so separiert zu lagern und für Folgeexperimente vorzubereiten. Der Einsatz der Igeltechnik zur Übertragung der Mutanten auf Platten war besonders effektiv, da auf diese Weise 48 statt maximal 16 Mutanten pro Platte untersucht werden konnten, nur wenig Material zur Untersuchung nötig war und so ein zusätzlicher Anzuchtschritt entfiel. Auf diese Weise wurde ein großer Pool an Mutanten erzeugt, aus dem solche mit einer verringerten Virulenz im Wirtsorganismus identifiziert werden sollten.

Der grundlegende Schritt zur Identifikation von nicht virulenten Mutanten besteht in der Auswahl geeigneter Screening-Assays. Ein direkter, in dieser Arbeit angewandter Weg, ist die Suche nach Defektmutanten bezüglich solcher biochemischer Eigenschaften, die für andere Spezies als virulenzrelevant bekannt sind. Diese Strategie unterliegt jedoch Limitationen, da ein Bezug der jeweiligen untersuchten Eigenschaft zur Virulenz im vorliegenden Organismus meist nicht bekannt ist. Außerdem wird so nur eine Auswahl von Eigenschaften untersucht, deren tatsächliche Bedeutung in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden muß. Da Mutanten mit Defekten in essentiellen Genen grundsätzlich nicht lebensfähig sind, können solche Gene, die gleichzeitig eine Funktion für die Virulenz haben, nicht untersucht werden. Zur Lösung dieser Problematik wurden Variationen der Transposonmutagenese entwickelt,

auf die an dieser Stelle nur verwiesen werden kann, z.B. *in vitro transposition* (IVT) [116] oder *genomic analysis and mapping by in vitro transposition* (GAMBIT) [2]. Neben dem oben genannten Einsatz von biochemischen Screening-Assays zur Detektion virulenzreduzierter Mutanten ist ein direktes Virulenzscreening im Wirt eine wünschenswerte Alternative. Da etablierte Tiermodelle wie z.B. Maus, Hamster oder Ratte zum Hochdurchsatzscreening von einzelnen Mutanten nicht geeignet sind, wurde auch zur Lösung dieser Problematik eine Technik entwickelt: die *signature-tagged mutagenesis* (STM) [57].

In jüngster Zeit setzte sich der Einsatz eines neuen Wirtssystems zum Screening von Mutanten, nämlich das Nematodenmodell *C. elegans* durch, mit dem auch in der hier vorliegenden Arbeit signifikante Resultate erzielt wurden. In Kombination mit dem gut charakterisierten Tn-Derivat Tn5-OT182 legt dieses Tiermodell eine effiziente Basis zur Detektion potentieller Virulenzgene.

## 6.2 *C. elegans* als Tiermodell zum Screening bakterieller Mutanten

Günstige Voraussetzungen eines Tieres zum effektiven Einsatz in einem Screening, das den Durchsatz einer hohen Probenzahl erlauben soll, sind seine kostengünstige, unkomplizierte Haltung und Vermehrung im Labor kombiniert mit möglichst geringem Raumbedarf, etablierte Basistechniken zur Kultivierung von synchronisierten Kulturen und eine möglichst kurze Generationsdauer von wenigen Tagen. Alle diese Bedingungen werden von *C. elegans* erfüllt. Ein wesentlicher weiterer Vorteil dieses Nematoden ist das umfassende Verständnis der Physiologie des Tieres, die Kenntnis seines kompletten Genoms sowie eine hohe genetische Homologie zu Säugern. Die Existenz von verschiedenen, definierten Wurmmutanten bietet insbesondere in Kombination mit bakteriellen Pathogenen wie z.B. *B. pseudomallei*, dessen Genom mittlerweile ebenfalls bekannt ist, günstige Bedingungen zur systematischen Analyse von Interaktionen zwischen Erreger und Wirt [142]. Zwingende Voraussetzung für alle Forschungsarbeiten ist jedoch die lethale Wirkung des *B. pseudomallei*-Wildtyps auf *C. elegans*. Dies wurde von unserer Arbeitsgruppe und von anderen gezeigt [101, 36].

Vor einigen Jahren wurden von der Gruppe um Ausubel das Pathogenitätsmodell *C. elegans*-*P. aeruginosa* beschrieben [143, 144, 93]. Im Zuge dieser Arbeiten gelang es, *P. aeruginosa*-Mutanten mit reduzierter Virulenz zu generieren und im *C. elegans*-Modell zu detektieren. Ein Großteil dieser Mutanten, wenn auch nicht alle, zeigte ebenfalls eine reduzierte Virulenz im Nagermode. Weiterhin wurde *C. elegans* als Pathogenesemodell für andere Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* [48], *Salmonella thyphimurium* [1, 80] oder auch *Burkholderia cepacia* [101] eingesetzt. In Anlehnung an diese Arbeiten konnte kürzlich von unserer Gruppe die prinzipielle Eignung von *C. elegans* für Untersuchungen zur Virulenzanalyse von *B. pseudomallei* gezeigt werden [36]. In der vorliegenden Arbeit wurde das etablierte *C. elegans*-*B. pseudomallei*-Pathogenitätsmodell zunächst als Screening-System für *B. pseudomallei*-Mutanten genutzt. Durch das Screening von etwa 1200 durch Transposonmutagenese erzeugten *B. pseudomallei*-Varianten konnten zwei Mutanten identifiziert



werden, die eine signifikant reduzierte Virulenz auf den Wurm zeigen. Diese Quote entspricht in etwa den in zuvor genannten Studien angegebenen Werten [92].

### **6.3 Im *C. elegans*-Assay auffällige Mutanten sind auch im Mausmodell virulenzreduziert**

Sowohl die Mutante P7:80 als auch P10:21 fiel im *C. elegans*-Assay dadurch auf, daß die ihnen ausgesetzten Würmer mit einer verzögerten Kinetik im Vergleich zum Wildtyp starben. Beide Mutanten wurden in Folgearbeiten im Mausinfektionsmodell untersucht, wobei für sie eine reduzierte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp gefunden wurde. Interessanterweise wies die Mutante P7:80 mit der geringeren Virulenzreduktion im Wurmmodell einen deutlicheren Unterschied im Säugetiermodell auf, während die Mutante P10:21 mit der größeren Virulenzreduktion bei den Nematoden eine geringere Verzögerung der Sterbekinetik bei Mäusen zur Folge hatte. Es läßt sich also festhalten, daß die *B. pseudomallei*-Mutanten, die sich im Nematodenmodell als virulenzreduziert zeigten, im Mausmodell ebenfalls eine Verminderung der Virulenz aufwiesen. Allerdings kann vom relativen Ausmaß der Virulenzverminderung bei *C. elegans*, d.h. einem längeren Überleben der Würmer im Vergleich zum Wildtyp, nicht auf das Ausmaß des Effektes bei der Maus geschlossen werden. Dies dürfte gleichfalls für eine Korrelation zu anderen Säugetieren und vor allem dem Menschen gelten.

Die Mutante P7:80 wurde zunächst im fast killing-Assay identifiziert. Zusätzliche Experimente mit einer höheren Anzahl von Würmern und auf größeren Platten zeigten zusätzlich sowohl im slow killing- als auch im modifizierten fast killing-Assay eine reduzierte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp. Auch im Filter-Assay, in dem die Tiere einem direkten Kontakt mit den Bakterien nicht ausgesetzt sind und somit eine lethale Wirkung ausschließlich durch sezerniertes Exotoxin hervorgerufen werden kann, verursacht P7:80 ein verlangsamtes Sterben der Würmer im Vergleich zum Wildtyp. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß *B. pseudomallei* Exotoxin(e) produziert, das in direktem Zusammenhang mit der Erzeugung von oxidativem Streß für *C. elegans* steht. Dabei wurde festgestellt, daß auf oxidativen Streß resistenter reagierende *age-I*-Wurmmutanten länger auf *B. pseudomallei*-konditioniertem Agar überleben. Da das verlangsamte Sterben auf P7:80-konditioniertem Agar bei beiden Wurmstämmen beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, daß P7:80 weniger Exotoxin produziert und damit auch geringeren oxidativen Streß erzeugt. Die nachgewiesene einmalige Insertion des Transposons Tn5-OT182 und die daraus resultierende Ausschaltung eines einzelnen Gens von *B. pseudomallei* hat damit Auswirkungen auf verschiedene durch *B. pseudomallei* ausgelöste Sterbemechanismen von *C. elegans* [36]. Hinzu kommt bei dieser Mutante, daß durch die Zerstörung des Gens auch das Wachstumsverhalten auf festen Medien verändert wurde. Während das Wachstum in verschiedenen flüssigen Medien keinerlei Unterschied im Vergleich zum Wildtyp aufweist, bildet die Mutante kleinere Kolonien auf Platten als das Wildtypbakterium. Offensichtlich ist durch die Transposoninsertion ein Gen mit pleiotroper Bedeutung zerstört worden.

Die Bedeutung der Ergebnisse der Wurmexperimente mit der Mutante P7:80 wird erst durch die im Mausinfektionsmodell erzielten Resultate deutlich. Tiere beider untersuchter Mausstämme reagierten sowohl auf intranasale als auch auf intravenöse Infektionen mit der Mutante P7:80 mit Überleben oder deutlich verzögertem Sterben verglichen mit Wildtyp-infizierten Tieren. Gegenüber den empfänglicheren Balb/c-Mäusen zeigte P7:80 im Vergleich mit dem Wildtyp einen etwa um den Faktor 1000 erhöhten Wert für die geschätzte LD<sub>50</sub>. Der Gendefekt, der im Nematoden zu einer detektierbaren Virulenzreduktion von *B. pseudomallei* führt, hat offensichtlich für die Maus noch drastischere Auswirkungen. Unterstützt werden diese Daten durch Ergebnisse von Experimenten, in denen infizierte Tiere 24 Stunden nach Infektion seziiert wurden und die Bakterienanzahlen in verschiedenen Organen bestimmt wurden. In allen untersuchten Organen beider Mausstämme wurden unabhängig von der Applikationsart um 1-2 log-Stufen geringere Keimzahlen der Mutante P7:80 im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Um dieses Phänomen zu erklären, wurden erste Versuche bezüglich der Invasivität in J774A.1-Maus-Makrophagen durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp gefunden wurden (Daten nicht gezeigt). Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Keimzahlen könnte in einer verminderten intrazellulären Replikationsfähigkeit der Mutante liegen, wofür es gegenwärtig noch keine experimentellen Beweise gibt. Festzuhalten bleibt, daß die Zerstörung eines Gens die Virulenz der Mutante P7:80 stark herabsetzt und das potentielle Produkt somit als Virulenzfaktor zu definieren ist.

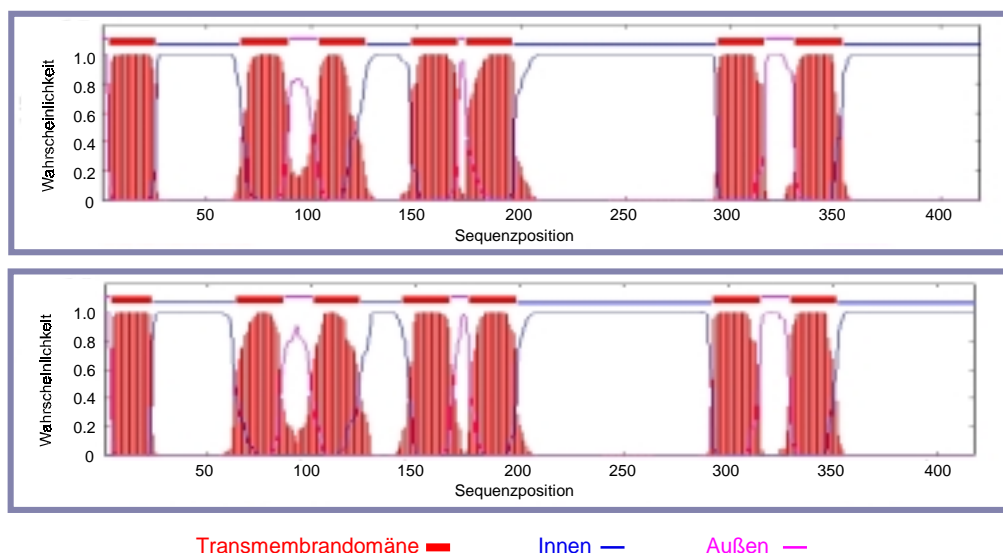
Die Mutante P10:21, die ebenso wie P7:80 durch reduzierte Virulenz im *C. elegans*-Modell auffiel, wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt gefunden und ist entsprechend weniger ausführlich charakterisiert. Im Wurmodell wurde gezeigt, daß diese Mutante im modifizierten fast killing-Assay ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verzögertes Sterben der Würmer verursacht. Es ist in diesem Zusammenhang interessant festzuhalten, daß, obwohl Experimente mit *C. elegans* aufgrund von geringen Abweichungen experimenteller Parameter Schwankungen unterliegen können, dennoch qualitative Aussagen eindeutig getroffen werden können. Zur zukünftigen Charakterisierung von P10:21 wird es hilfreich sein zu untersuchen, ob die im modifizierten fast killing-Assay festgestellte Attenuierung auch im slow und fast killing-Assay sowie dem Filter-Assay zu beobachten ist.

Wie schon erwähnt, zeigten Untersuchungen mit dieser Mutante im Mausinfektionsmodell, daß mit P10:21 intranasal infizierte Mäuse deutlich länger lebten als mit Wildtyp behandelte Tiere. Allerdings wird, im Gegensatz zu Infektionen mit P7:80, die Infektion nicht überwunden und die Tiere sterben schließlich. Da offenbar keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Virulenzreduktion bei Würmern und Mäusen gegeben ist, kann für keine zukünftige im *C. elegans*-Screening auffällige Mutante eine Vorhersage bezüglich eines möglicherweise attenuierten Sterbeverhaltens im Säugetiermodell gemacht werden. Die Tauglichkeit des Nematodenmodells zum Screening von bakteriellen Mutanten steht allerdings außer Frage.

Das zerstörte Gen, das für die genannten Unterschiede der Mutante P10:21 zum Wildtyp verantwortlich ist, wurde als ein ORF mit 1605 bp bestimmt. Im Gegensatz zu P7:80 wurden jedoch weder auf Nukleotid- noch auf Proteinebene Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen gefunden. Das Virulenzgen bzw. sein Proteinprodukt ist demnach als unbekanntes Protein anzusehen, was Untersuchungen zu seiner Bedeutung im Rahmen von Virulenzmechanismen erheblich erschwert. Entsprechende Ansatzpunkte könnten, wie schon für P7:80 angedeutet, durch vergleichende Analyse des Proteinmusters erhalten werden.

#### 6.4 Der Virulenzfaktor STRAMP ist eine membranständige Protease

Bei P7:80 inserierte das Transposon zwischen die Sequenzpositionen 2996093 und 2996094 von Chromosom 1 von *B. pseudomallei*. Damit wurde relativ zentral ein Gen beeinflusst, dessen ORF 1260 bp umfaßt und das im Folgenden als *stramp* bezeichnet wird. Auf Nukleotidebene wurde lediglich eine hohe Identität (79%) mit einem Abschnitt eines Chromosoms des nah verwandten Pflanzenpathogens *Ralstonia solanacearum* gefunden. Während für den entsprechenden Bereich des *R. solanacearum*-Gens ein *probable integral membrane protease transmembrane protein* aus 418 Aminosäuren vorhergesagt wird, kodiert der ORF von P7:80 für ein hypothetisches Protein mit 419 Aminosäuren, im Folgenden STRAMP genannt. Ein direkter Sequenzvergleich dieser beiden Proteine ergibt eine Übereinstimmung von 72% unter Berücksichtigung identischer und chemisch ähnlicher Aminosäuren (Abb. 17). Noch offensichtlicher wird die Ähnlichkeit beider Proteine, wenn man die Darstellungen der vorhergesagten Transmembranbereiche miteinander vergleicht (Abb. 38). Es ergibt



**Abbildung 38:** Vorhergesagte Transmembranbereiche von STRAMP (oben) und des homologen Proteins von *R. solanacearum* (unten). Durchgeführt mit TMHMM (*prediction of transmembrane helices in proteins*); <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>.

sich ein praktisch identisches Bild beider Proteine mit jeweils sieben hydrophoben Transmembrandomänen an gleichen Sequenzpositionen. Auf einem vermutlich nach innen gerichteten Abschnitt zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 weisen beide ein weiteres wesentliches Strukturmerkmal auf: das zinkbindende histidinhaltige Sequenzmotiv HELGH. Der etwa 300 AS umfassende C-terminale Bereich stellt eine konservierte Domäne dar, was diese beiden ähnlichen Proteine der Peptidase-Familie M48 zuordnet (Clan MA; diese Peptidasen enthalten als gemeinsames Merkmal ein HEXXH-Motiv) [6].

Während STRAMP eine hohe Sequenzhomologie zu einer großen Anzahl hypothetischer zinkbindender Metalloproteasen verschiedenster Organismen (Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten, Säuger bis hin zum Menschen) aufweist, sind funktionelle Daten lediglich von einem Protein dieser Familie, nämlich Ste24p (453 AS) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, einem eukaryotischen Mikroorganismus, bekannt. Während sich der Name des Gens Ste24 von der in diesem Gen defekten sterilen Mutante des Wildtypstammes von *S. cerevisiae* ableitet, wird die Funktion seines Proteinproduktes besser durch die Bezeichnung CAAX-Prenylprotease 1 (Synonyme: *prenyl protein-specific endoprotease 1/PPSEP 1* oder *a-factor converting enzyme*) beschrieben. Die Hauptfunktion von Ste24p liegt in der effizienten Produktion des *a-factor mating pheromone*, das bei *S. cerevisiae* zur geschlechtlichen Fortpflanzung notwendig ist. Der reife, bioaktive a-Faktor ist ein prenyliertes, carboxymethyliertes Peptid aus 12 Aminosäuren, das aus einem Vorläufer aus 36 oder 38 Aminosäuren mit einem C-terminalen CAAX-Motiv (C, Cystein; A, aliphatische Aminosäure, nicht notwendigerweise Alanin; X, beliebige Aminosäure) und einer N-terminalen Erweiterung entstanden ist. Nach einer Serie von C-terminalen Modifikationen (Farnesylierung, Abspaltung von AAX und Carboxymethylierung) folgen zwei N-terminale Spaltungen. Ste24p ist für den ersten der beiden N-terminalen Prozessierungsschritte verantwortlich, ohne den der reife a-Faktor nicht entstehen kann, was einen sterilen Organismus zur Folge hat [141, 42, 140]. Boyartchuk et al. demonstrierten weiterhin eine Beteiligung von Ste24p als CAAX-Prenylprotease an der Abspaltung von AAX [9]. Aus diesem Grund werden genetisch homologe Proteine mit einer konservierten Domäne der Peptidase-Familie M48 meist als putative CAAX-Prenylproteasen bezeichnet. Ein direkter Vergleich der Aminosäuresequenzen von STRAMP und Ste24p ist in Abb. 39 dargestellt. Die Übereinstimmung identischer und ähnlicher Aminosäuren für den untersuchten Bereich beträgt etwa 50%. Es ist eindeutig zu erkennen, daß beide Proteine Transmembranregionen in korrespondierenden Positionen aufweisen, wobei allerdings die N-terminalen Bereiche voneinander abweichen. Das zinkbindende Motiv HEXXH befindet sich in beiden Proteinen im gleichen vermutlich nach innen gerichteten Sequenzabschnitt. Somit ist es wahrscheinlich, daß sich auch die potentiellen Substrate dieser Metalloproteasen im Cytosol befinden.

Nicht nur diese drei erwähnten Proteine, STRAMP, Ste24p und das homologe *R. solanacearum*-Protein, sondern alle Mitglieder der Peptidase-Familie M48 weisen hochkonservierte Sequenzen auf, die in Vertretern unterschiedlichster evolutionärer Stufen auftreten. Obwohl zum gegenwärtigen Zeitpunkt ihre Funktionen nicht bekannt sind, ist diese

1	MSAYTFTLLFAVAIVAMTGTKLWLASRQVRFVAAHRARVPAQFRETIP <del>LA</del> AHQRAADYTI	60
	-----	
61	ERTRLTMFEIVVSSAVLVGLTLLGGVGALDSL <del>LAGW</del> LGHGYGQ <del>VALVA</del> AVLV <del>ISSA</del> ADL	120
		DL
122	-----LCFLGLLSSSLSTLVDL	137
121	PFEYYRQFGIEERFGFNRM <del>T</del> KRLFF <del>T</del> DLAKNALLGAALGLPLLFVVLWLMNQ--AGALWW	178
	P YY F ●EE●FGFN● T L● TD ●K ● L● AIG P●L●● L ● LW●	
138	PLSYSSHVLEEKFGFNKLT <del>V</del> QLWITDMIKSLT <del>L</del> AYAIGGPILYLFLKIFDKFPTDFLWY	197
179	LWTWIVVWVGFQMLVLVLYPTFIAPIFNKFEPLSDDALRARI <del>E</del> GLMKRCGFAAKGLFVMDG	238
	● ●● V Q L ● P FI P FNKF PL D L● IE L R GF ●FV DG	
198	IMVFLFVV--QILAMTIIPVFI <del>M</del> PMFNKFTPLEDGELKKSIE <del>S</del> LADR <del>V</del> GFPLDKIFVIDG	255
239	SRRSAHGNAYFTGFG-ASKRIVFFDTLLARLTGGEIEAVLAHE <del>L</del> GHFKRRHVMKRM <del>L</del> WTF	297
	S●RS H NAYFTG SKRIV FDTL● ● EI AVLAHE●GH● ● H● ●●●	
256	SKRSSHSNAYFTGLPFTSKRIVLFDTLVNSNSTDEITAVLAHE <del>I</del> GHWQKNHIVNMVIFSQ	315
298	ALSLALLALLGWLAQRAWFYTGLG-VMP <del>S</del> LSGSNAGIALVLF <del>F</del> LSMPGFLFF---VTPLG	353
	● ● L ● FY G ●GS ● GF F ●TPL	
316	LHTFLIFSLFTSIYRNTSFYNTFGFFLEKSTG <del>S</del> FVDPVITKEFP <del>I</del> IIGFMLFNDLLT <del>P</del> LE	375
354	-----SLSSRKHEFEA-DAFAASQTDARDLVNALVKLYEDNASTLTPDPVYTA <del>F</del> Y <del>S</del> H	405
	SL SR HE● A DA●A L AL● L N ST DP●Y●●YSH	
376	CAMQFVMSLISR <del>T</del> HE <del>Y</del> QA- <del>D</del> AYAKKLG <del>Y</del> KQNL <del>C</del> RALIDLQIKNLSTMNVDPLYSSYHYSH	434
406	PPASQRIDRL 415	
	P R● L	
435	PTLAERLTAL 444	

**Abbildung 39:** Aminosäuresequenz von STRAMP (oben) und Primärstrukturvergleich mit der homologen Teilsequenz des Protein Ste24p von *Saccharomyces cerevisiae* (unten). Rote Buchstaben: identische Aminosäure; roter Punkt: chemisch ähnliche Aminosäuren; grau unterlegte Sequenzbereiche: Transmembrandomänen; blau: zinkbindendes Sequenzmotiv HEXXH; unterstrichen: vorhergesagte O-GlcNAc-Glycosylierung.

Tatsache ein Hinweis darauf, daß diese Proteine wichtige Funktionen ausfüllen. Eine klar definierte Funktion ist nur von dem Protein Ste24p von *S. cerevisiae* bekannt, wobei es nicht möglich ist, von seiner Funktion Rückschlüsse auf die Funktionen der anderen, insbesondere von STRAMP, zu ziehen. Während die Funktion von Ste24p in der Prozessierung von Faktoren für die geschlechtliche Fortpflanzung von *S. cerevisiae* liegt, wurde STRAMP in *B. pseudomallei* identifiziert, einem Bakterium, das sich ungeschlechtlich vermehrt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß es sich bei STRAMP vermutlich um eine zinkbindende Metalloprotease mit sieben Transmembranregionen handelt. Es weist eine hochkonservierte Domäne aus etwa 300 Aminosäuren auf, die es der Peptidasefamilie M48 (Clan MA) zuordnet. Sequenzhomologien zu evolutionär entfernten Organismen wie *Campylobacter jejuni*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* weisen auf eine wichtige physiologische Funktion hin. Diese ist gegenwärtig noch nicht bekannt, hat aber direkt oder indirekt Auswirkungen auf die Virulenz des Pathogens *B. pseudomallei*.

Einen vielversprechender Ansatz zur Aufklärung der Funktion von STRAMP kann die Anwendung von Technologien liefern, die im Rahmen der Proteomik eingesetzt werden. Wie in Abschnitt 5.5.6 durch differentielle 2D-gelelektrophoretische Analyse gezeigt, unterscheiden sich die Proteinmuster des Wildtyps und von P7:80 sowohl hinsichtlich der Überstände als auch der zellulären Extrakte. In beiden Proben der Mutante sind bereits nach oberflächlicher Betrachtung eine Vielzahl von zusätzlichen, fehlenden und intensitätsveränderten Banden erkennbar. Die entsprechenden Proteine müssen in charakteristischer Weise mit der fehlenden Aktivität von STRAMP verknüpft sein. In zukünftigen Arbeiten sollte eine möglichst vollständige Analyse der über- oder unterexprimierten Proteine der nichtvirulenten Mutante durchgeführt werden. Eine derartige Identifizierung von Proteinen - z.B. nicht umgesetzte Substrate oder fehlende Produkte der Aktivität von STRAMP - ist geeignet, um zur Aufklärung molekularer Mechanismen der Virulenz beizutragen. Es ist allerdings festzuhalten, daß es momentan noch keine Erkenntnis darüber gibt, ob STRAMP direkt zur Virulenz beiträgt. Es wird erwartet, daß die zum Abschluß dieser Arbeit begonnene Identifizierung von auffälligen Proteinbanden Ansatzpunkte zur Untersuchung der Beteiligung der Proteine an Pathogenitätsmechanismen eröffnet.

*In trans*-Komplementation von *stramp* in P7:80 soll beweisen, daß dieses Gen für den Unterschied in der Virulenz zwischen Wildtyp und der Mutante P7:80 verantwortlich ist und nicht eine unzureichende Transkription nachfolgender Gene. Weitere wesentliche experimentelle Untersuchungen könnten durch *site-directed mutagenesis*, z.B. gezielte Mutation des putativ zinkbindenden Motivs, zeigen, daß STRAMP tatsächlich eine Metalloprotease ist. In diesem Zusammenhang spielt die Aufklärung der Substratspezifität des Enzyms eine besonders wichtige Rolle.

## 6.5 Unbewegliche Mutanten bewirken keine wesentliche Virulenzreduktion

Das Vorhandensein von Flagellen und damit die Bewegungsfähigkeit eines Organismus wird oft mit der pathogenen Eigenschaft von Bakterien in Verbindung gebracht [103, 97]. Da bekannt ist, daß *B. pseudomallei* WT mehrere Flagellen besitzt und damit beweglich ist [34], wurde die Mutantenbank auf nicht motile Varianten untersucht.

Keine der drei gefundenen unbeweglichen Mutanten 102, P5:28 und P5:81 rief ein verzögertes Sterben von *C. elegans* hervor. Da dieses Ergebnis eine Virulenzreduktion im Mausmodell nicht ausschloß, wurden Mäuse beider Mausstämmen mit den unbeweglichen Mutanten infiziert. Die Applikation von P5:28 und P5:81 in C57BL/6-Mäusen ergab Sterbekurven vergleichbar mit denen durch *B. pseudomallei* Wildtyp, während für die Mutante 102 eine leichte Verzögerung des Sterbens beider Mausstämmen festgestellt wurde. Obwohl dieses Resultat reproduziert wurde, ließ der schlechte Zustand der länger lebenden Tiere nicht darauf schließen, daß die Mutante 102 eine signifikant reduzierte Virulenz aufweist. Bestimmung der Keimzahlen der drei Mutanten in verschiedenen Organen der Mäuse 24 Stunden nach der

Infektion zeigte nur bei der Mutante 102 sowohl nach intranasaler als auch nach intravenöser Applikation einen geringen, aber signifikanten Unterschied zum Wildtyp in Lunge, Leber und Milz. Trotz dieses Befundes kann weder bei der *fliC*-Mutante 102, noch bei den beiden anderen unbeweglichen Mutanten von einer Virulenzreduktion im Vergleich zum *B. pseudomallei* Wildtyp gesprochen werden. Diese Resultate bestätigen Berichte von DeShazer et al. [34], in denen gezeigt wurde, daß systemische Infektionen mit *B. pseudomallei*-Mutanten, die ein defektes Flagellin aufweisen, im Syrischen Hamster-Modell und im Modell der diabetischen Ratte zu keiner reduzierten Virulenz führen. Weitere unbewegliche *B. pseudomallei*-Mutanten mit Defekten in unterschiedlichen Genen des Bewegungsapparates wurden von DeShazer et al. im Tiermodell bezüglich ihrer Virulenz nicht untersucht [34]. Abweichend von diesen Resultaten beschreiben Gan et al. [46, Abstract], daß eine durch *site-directed mutagenesis* hergestellte Flagellinmutante keine Krankheit in Mäusen hervorrief. Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzliche Aussage könnte die Untersuchung verschiedener Stämme von *B. pseudomallei* sein.

Die molekularbiologische Analyse der drei unbeweglichen Mutanten ergab für die gleichen phänotypischen Eigenschaften Defekte in unterschiedlichen Genen. Die Mutante 102 ist eine echte Flagellinmutante, d.h. sie besitzt eine Transposoninsertion im Flagellin *fliC* von *B. pseudomallei*. Dies wurde zum einen eindeutig durch Homologievergleich mit der bekannten *fliC*-Sequenz und zum anderen durch die Komplementation von *fliC* in 102 zu einer normal beweglichen Komplementante bestätigt. Diese Tatsache ist auch in technischer Hinsicht von Bedeutung, da sie die Eignung des hierfür gewählten Vektors für zukünftige Komplementationen virulenzreduzierter Mutanten von *B. pseudomallei* bestätigt. Im Gegensatz zur Mutante 102 weisen die Mutanten P5:28 und P5:81 Defekte in anderen Genen auf. Diese weisen hohe Homologien zu *flagellar motor switch*-Genen naher Verwandter auf, die am Aufbau des bakteriellen Bewegungsapparates, wahrscheinlich am Antrieb, beteiligt sind. Für P5:28 besteht die höchste Homologie zum entsprechenden *fliM*-Gen von *R. solanacearum*, während P5:81 eine große sequentielle Ähnlichkeit zum vergleichbaren *fliG*-Gen von *B. cepacia* besitzt. In diesem Zusammenhang ist festzustellen, daß Gene ähnlicher Funktion bei nahen verwandten Bakterien durchaus Sequenzen ohne signifikante Homologie aufweisen können. Auf Basis der Analyse der Mutanten 102, P5:28 und P5:81 erscheint es, daß Unbeweglichkeit allein, bedingt durch einen Defekt in einem Teil des bakteriellen Flagellenapparates, nicht zu einer reduzierten Virulenz von *B. pseudomallei* führt.

## 6.6 Ein Defekt im Typ-II-Sekretionsapparat verhindert die Sekretion von Enzymen

Bakterielle Phospholipasen wie die Lecithinasen spielen für die Virulenz unterschiedlicher Erreger wie z.B. Yersinien, Clostridien und Listerien eine bedeutende Rolle [58, 5, 127]. Die Suche nach Defektmutanten mit entsprechend gestörter Enzymfunktion ist in experimenteller Hinsicht ebenso einfach [133, 37, 91] wie ein Test auf Aktivität eines anderen Enzyms, der

Chitinase. Von letztgenanntem Enzym war bisher nicht bekannt, ob es ähnlich wie bei *B. cepacia* auch bei *B. pseudomallei* vorkommt. Da sezernierte Chitinasen parasitärer Erreger von Tropenkrankheiten, z.B. Leishmaniose, Malaria und Schlafkrankheit, durch Zerstörung chitinhalte Strukturen ihrer (Zwischen-)Wirte wichtige virulente Funktionen im Zuge der Infektion ausüben [125, 81, 126], wurde auch nach Defektmutanten bezüglich dieser Funktion gesucht. Dabei wurde die Mutante F12 gefunden, die auch bezüglich der Lecithinase negativ ist. Experimente mit getrennten Untersuchungen des Kulturüberstandes und der zellulären Extrakte ergaben, daß sowohl Lecithinase als auch Chitinase von der Mutante F12 zwar produziert, nicht aber sezerniert werden.

Die molekularbiologische Charakterisierung der Mutante F12 bietet eine Erklärung für das beschriebene Phänomen. Bei dem durch Transposonmutagenese zerstörten Gen handelt es sich um das *general secretory pathway protein D* (*gspD*), das ursprünglich für den Stamm 1026b als Komponente des Typ II-Sekretionssystems beschrieben wurde [33, GenBank AF110185]. Der Typ-II-Sekretionsapparat ist unter Proteobakterien weit verbreitet und bei diesen verantwortlich für die Sekretion von Toxinen und hydrolytischen Enzymen, die vielfach zur Pathogenese in Pflanze und Tier beitragen. Protein D wird zur Familie der Sekretine gezählt, die durch Ausbildung eines Oligomers aus 12-14 Untereinheiten die Pore des Sekretionsapparates in der äußeren Membran darstellen [121]. Offenbar läuft die Synthese von Phospholipasen und Chitinasen im Zellinneren unbeeinflusst vom durch Transposoninsertion gestörten Gen ab. Ein intaktes Protein D scheint für deren Sekretion erforderlich zu sein. Auch DeShazer et al. hatten Transposonmutanten in verschiedenen Enzymassays untersucht und dabei u.a. ebenfalls Mutanten mit Defekt im Protein D-Gen gefunden. Sie stellten fest, daß alle untersuchten Mutanten ohne Proteasesekretion gleichzeitig weder Lipase noch Phospholipase C (PLC) sezernierten [33]. Der Umkehrschluß, daß eine Lecithinase-mutante ebenfalls eine negative Proteasereaktion aufweist, kann durch eigene Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die Mutante F12 ist deutlich positiv in der Nachweisreaktion für Proteaseaktivität, und zwar sowohl der Überstand als auch der zelluläre Extrakt. Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm *B. pseudomallei* E8 scheint somit nicht den gleichen Sekretionsapparat für Proteasen, Lipasen und PLC zu benutzen. Es bleibt offen, ob diese voneinander abweichenden Ergebnisse bezüglich der Funktion des Typ-II-Sekretionsapparates dadurch zustande gekommen sind, daß unterschiedliche Stämme untersucht wurden.

Im *C. elegans*-Assay war das Sterbeverhalten der Würmer, die der Mutante F12 ausgesetzt waren, nicht von dem derjenigen Würmer zu unterscheiden, die dem Wildtyp ausgesetzt waren. Da auch im Mausmodell kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp gefunden wurde, wird das Ergebnis von DeShazer et al. unterstützt, daß Exoprodukte wie Lecithinasen, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese von *B. pseudomallei* zukommt.



## 6.7 Ein Defekt in der Synthese von Polyhydroxyalkanoaten ist von Bedeutung für die Virulenz von *B. pseudomallei*

Der ursprüngliche Grund zum Einsatz des Farbstoff-Assays mit Sudan Schwarz B lag in der Absicht, Defektmutanten für die Produktion von Exopolysacchariden (EPS) zu detektieren. Es ist bekannt, daß Sudan Schwarz B als lipophiler Diazofarbstoff den EPS-produzierenden Wildtyp von *Rhizobium meliloti* nicht färbt, wohl aber eine entsprechende Defektmutante [90]. Im Gegensatz zu diesem Beispiel wird der *B. pseudomallei* Wildtyp durch den Farbstoff angefärbt. Dementsprechend sind in diesem Fall nicht-färbbare Mutanten von Interesse. EPS gelten - nicht nur bei *B. pseudomallei* - als putative Virulenzfaktoren. Reckseidler et al. haben gezeigt, daß eine Defektmutante bezüglich einer bei der EPS-Synthese beteiligten Glykosyltransferase eine um den Faktor  $10^5$  erhöhte LD<sub>50</sub> im Tiermodell mit dem Syrischen Hamster aufweist [115]. Auf der Suche nach gleichermaßen virulenzreduzierten Mutanten wurden die beiden nicht-färbbaren *B. pseudomallei*-Mutanten P3:89 und P8:45 detektiert.

Wie die molekularbiologische Charakterisierung der Mutanten zeigt, haben beide einen durch Transposoninsertion erzeugten Defekt im *polyhydroxyalkanoate biosynthesis gene cluster*, der Gene für eine Polyhydroxyalkanoatpolymerase, eine  $\beta$ -Ketothiolase und eine Acetoacetyl-CoA-Reduktase enthält. Da durch die Transposoninsertionen von P3:89 und P8:45, die beide im Gen für die Polyhydroxyalkanoatpolymerase lokalisiert sind, vermutlich die Synthese von Polyhydroxyalkanoaten unterbunden oder zumindest unterdrückt ist, fehlt dem Farbstoff ein Substrat zum Färben, die Mutanten sind nicht anfärbbar. Dies korreliert mit Literaturangaben, die zeigen, daß Sudan Schwarz B Polyhydroxybutyrate dunkel anfärbt [106]. Von Polyhydroxyalkanoaten ist bekannt, daß sie von vielen Bakterien als intrazelluläre Kohlenstoff- und Energiequelle synthetisiert und genutzt werden [163]. Ein Beitrag von Polyhydroxyalkanoatpolymerasen zur Virulenz ist bislang jedoch nicht bekannt. Die eigenen Untersuchungen zeigen, daß die Infektion von Balb/c-Mäusen mit diesen Mutanten ein deutlich attenuiertes Sterben im Vergleich zu mit Wildtyp infizierten Tieren zur Folge hat, wobei die Überlebensrate von *C. elegans* durch die Mutanten nicht beeinflusst wird. Wie allerdings eine gestörte Polyhydroxyalkanoatsynthese zu einer reduzierten Virulenz bei der Maus führen kann, ist heute noch unbekannt und bedarf weiterer umfassender Arbeiten.

## 6.8 Ausblick

Obwohl die Anzahl an Berichten, die sich mit der Krankheit Melioidose und ihrem bakteriellen Erreger *B. pseudomallei* beschäftigten, in den letzten Jahren stetig angestiegen ist, sind die Kenntnisse über die Pathogenese der Melioidose und die zugrundeliegenden Virulenzmechanismen von *B. pseudomallei* noch immer begrenzt. Diagnose und Therapie wurden zwar verbessert, doch gibt es bis heute keine zuverlässige Therapie oder gar einen verlässlichen Impfstoff gegen diese nicht mehr nur auf die Tropen beschränkte Infektionskrankheit.

Die zeitgleich mit Abschluß der vorliegenden Arbeit fertiggestellte Sequenzierung des Genoms von *B. pseudomallei* bietet, insbesondere mit dem erst in jüngster Zeit etablierten Tiermodell mit dem Nematoden *C. elegans* und der Technik der Transposonmutagenese eine solide Basis zur erfolgversprechenden Identifizierung und Analyse von Virulenzfaktoren. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß mit einer Kombination der genannten Techniken tatsächlich bakterielle Faktoren, die zur Virulenz beitragen, detektiert werden können. Zur Funktionsaufklärung definierter Virulenzgene und -proteine können die Möglichkeiten der Proteomforschung genutzt werden. Auch eine Erweiterung des Repertoires an Screening-Assays, insbesondere an solchen mit einer hohen Spezifität, kann zur Identifizierung von Virulenzfaktoren beitragen. So wird gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe beispielsweise mit einem Plaque-Assay unter Einsatz von Zellkulturen nach Mutanten gesucht, die nicht mehr in der Lage sind, eine gerichtete Aktinpolymerisation in der Wirtszelle zu induzieren. Diese gerichtete Aktinpolymerisation induziert die interzelluläre Ausbreitung von *B. pseudomallei*. Ebenso ist es vielversprechend, zusätzlich zu den hier beschriebenen weitere im *C. elegans*-Assay auffälligen Mutanten aufzufinden und wie gezeigt auf molekularer Ebene zu analysieren. Auch Untersuchungen, die die Kombination mehrerer putativer Virulenzgene miteinbeziehen, können von großem Wert sein.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] **Aballay, A., P. Yorgey und F. M. Ausubel.** 2000. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**:1539-1542
- [2] **Akerley, B., E. Rubin, A. Camilli, D. Lampes, H. Robertson und J. Mekalanos.** 1998. Systematic identification of essential genes by in vitro mariner mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8927-8932
- [3] **Andrew, P. A. und W. L. Nicholas.** 1976. Effect of bacteria on dispersal of *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae). *Nematologica* **22**:451-461
- [4] **Ashdown, L. R. und J. M. Koehler.** 1990. Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2331-2334
- [5] **Augustynowicz, E., A. Gzyl und J. Slusarczyk.** 2002. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* with a duplex PCR. *J. Med. Microbiol.* **51**:169-172
- [6] **Barrett, A. J., N. D. Rawlings und J. F. Woessner (Hrsg.).** 1998. Metallopeptidases and Their Clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, S. 989-991
- [7] **Berg, D. E.** 1989. Transposon Tn5. In: Berg, D. E., and M. M. Howe (Hrsg.) *Mobile DNA*. Am. Soc. Microbiol., Washington DC, S. 183-208
- [8] **Birnboim, H. C. und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1522
- [9] **Boyartchuk, V. L., M. N. Ashby und J. Rine.** 1997. Modulation of ras and a-factor function by carboxy-terminal proteolysis. *Science* **275**:1796-1800
- [10] **Brenner, S.** 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94
- [11] **Brett, P. J. und D. E. Woods.** 2000. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. *Acta Tropica* **74**:201-210
- [12] **Brett, P. J., D. DeShazer und D. E. Woods.** 1997. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiol. Infect.* **118**:137-148
- [13] **Brett, P. J., D. DeShazer und D. E. Woods.** 1998. *Burkholderia thailandensis* sp. Nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48Pt1**: 317-320
- [14] **Burtnick, M. N., A. J. Bolton, P. J. Brett, D. Watanabe und D. E. Woods.** 2001. Identification of the acid phosphatase (*acpA*) gene homologues in pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia* spp. Facilitates *TnphoA* mutagenesis. *Microbiology* **147**:111-120
- [15] **Cash, P.** 2000. Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis* **21**:1187-1201
- [16] **Chaiyaroj, S. C., K. Kotrnon, S. Koonpaew, N. Anantagool, N. J. White und S. Sirisinha.** 1999. Differences in genomic macrorestriction patterns of arabinose-positive (*Burkholderia thailandensis*) and arabinose-negative *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol. Immunol.* **43**:625-630
- [17] **Chambon L. und J. Fournier.** 1956. Constitution antigénique de *Malleomyces pseudomallei*. I. Caracteres morphologiques, culturaux, biochimiques et variations de type immunologique. *Ann. Inst. Pasteur* **91**:355-362
- [18] **Chaowagul, W.** 2000. Recent advances in the treatment of severe melioidosis. *Acta Tropica* **74**:133-137
- [19] **Chaowagul, W., Y. Suputtamongkol, D. A. Dance, A. Rajchanuvong, J. Pattaraarechachai und N. J. White.** 1993. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. *J. Infect. Dis.* **168**:1181-1185

- [20] **Chodimella, U., W. L. Hoppes, S. Whalen, A. J. Ognibene und G. W. Rutecki.** 1997. Septicemia and suppuration in a Vietnam veteran. *Hosp. Pract.* **32**:219-221
- [21] **Choy, J. L., M. Mayo, A. Janmaat und B. J. Currie.** 2000. Animal melioidosis in Australia. *Acta Tropica* **74**:153-158
- [22] **Clarke, L. und J. Carbon.** 1976. A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**:91-99
- [23] **Corkill, M. M. und B. Cornere.** 1987. Melioidosis: a new disease to New Zealand. *N. Z. Med. J.* **100**:106-107
- [24] **Currie, B. J., D. A. Fisher, D. M. Howard, J. N. C. Burrow, S. Selvanayagam, P. L. Snelling, N. M. Anstey und M. J. Mayo.** 2000. The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea. *Acta Tropica* **74**:121-127
- [25] **Dance, D. A.** 1990. Melioidosis. *Rev. Med. Microbiol.* **1**:143-150
- [26] **Dance, D. A. B.** 1991. Melioidosis: the tip of the iceberg? *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:52-60
- [27] **Dance, D. A. B.** 1998. Melioidosis and glanders. In: W. J. Hausler Jr., and M. Sussman (Hrsg.) *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th edition, Volume 3: Bacterial infections. Arnold Press, London, S. 919-929
- [28] **Dance, D. A. B.** 2002. Melioidosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**:127-132
- [29] **Dance, D. A., V. Wuthiekanun, P. Naigowit und N. J. White.** 1989. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practise: use of simple screening tests and API 20NE. *J. Clin. Pathol.* **42**:645-648
- [30] **Darby, C. und S. Falkow.** 1999. A plague on your worms: Bacteria of the genus *Yersinia* inhibit the growth of *C. elegans*. *Worm Breeder's Gazette* **16**:39
- [31] **Darby, C., C. L. Cosma, J. H. Thomas und C. Manoil.** 1999. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:15202-15207
- [32] **DeSazer, D., P. J. Brett und D. E. Woods.** 1998. The type II O-antigenic polysaccharide moiety of *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide is required for serum resistance and virulence. *Mol. Microbiol.* **30**:1081-1100
- [33] **DeShazer, D., P. J. Brett, M. N. Burtnick und D. E. Woods.** 1999. Molecular characterization of genetic loci required for secretion of exoproducts in *Burkholderia pseudomallei*. *J. Bacteriol.* **181**:4661-4664
- [34] **DeShazer, D., P. J. Brett, R. Carlyon und D. E. Woods.** 1997. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. *J. Bacteriol.* **179**:2116-2125
- [35] **Dodin, A. und R. Ferry.** 1974. Recherches epidemiologiques du bacille de Whitmore en Afrique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **67**:121-126
- [36] **Ebrecht, D.** 2002. Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-Modells zur Virulenzanalyse von human- und tierpathogenen Bakterienspezies der Gattung *Burkholderia*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- [37] **Esselmann, M. T. und P. V. Liu.** 1960. Lecithinase production by gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **81**:939-945
- [38] **Ewbank, J. J.** 2002. Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes Infect.* **4**:247-256
- [39] **Ferry, R., B. Poutrel und F. Bruneau.** 1973. Isolement du bacille de Whitmore a partir de lesions rencontrees chez le porc a l'abattoir de Niamey au Niger. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **66**:42-45
- [40] **Finlay, B. B.** 1999. Bacterial disease in diverse hosts. *Cell* **96**:315-318
- [41] **Fraser, C. M., J. A. Eisen und S. L. Salzberg.** 2000. Microbial genome sequencing. *Nature* **406**:799-803

- [42] **Fujimura-Kamada, K., F. J. Nouvet und S. Michaelis.** 1997. A novel membrane-associated metalloprotease, Ste24p, is required for the first step of NH<sub>2</sub>-terminal processing of the yeast a-factor precursor. *J. Cell. Biol.* **136**:271-285
- [43] **Fuller, P. B., D. E. Fisk, R. B. Byrd, G. A. Griggs und M. R. Smith.** 1978. Treatment of pulmonary melioidosis with combination of trimethoprim and sulfamethoxazole. *Chest* **74**:222-224
- [44] **Galimand, M. und A. Dodin.** 1982. Le point sur la melioidose dans le monde. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **75**:375-383
- [45] **Gallagher, L. A. und C. Manoil.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J. Bacteriol.* **183**:6207-6214
- [46] **Gan, Y. H., Y. Y. Chan und K. L. Chua.** 2001. Flagella is a virulence factor of *Burkholderia pseudomallei* in mice. Abstract World Melioidosis Congress, Perth 2001
- [47] **Gan, Y.-H., K. L. Chua, H. H. Chua, B. Liu, C. S. Hii, H. L. Chong und P. Tan.** 2002. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. *Mol. Microbiol.* **44**:1185-1197
- [48] **Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood und F. M. Ausubel.** 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:10892-10897
- [49] **Girard, G.** 1936. Le porc peut-il etra un porteur sain de bacille de Whitmore. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **29**:712-716
- [50] **Guilbault, G. G. und D. N. Kramer.** 1966. Ultra sensitive, specific method for cyanide using *p*-nitrobenzaldehyde and *o*-dinitrobenzene. *Anal. Chem.* **38**:834-836
- [51] **Haase, A., J. Janzen, S. Barrett und B. Currie.** 1997. Toxin production by *Burkholderia pseudomallei* strains and correlation with severity of melioidosis. *J. Med. Microbiol.* **46**:557-563
- [52] **Hamer, L., T. M. DeZwaan, M. V. Montenegro-Chamorro, S. A. Frank und J. E. Hamer.** 2001. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**:67-73
- [53] **Häußler, S., M. Nimtz, T. Domke, V. Wray und I. Steinmetz.** 1998. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* **66**:1588-1593
- [54] **Häußler, S., M. Rohde und I. Steinmetz.** 1999. Highly resistant *Burkholderia pseudomallei* small colony variants isolated in vitro and in experimental melioidosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **188**:91-97
- [55] **Heckly, R. J.** 1964. Differentiation of exotoxin and other biologically active substances in *Pseudomonas pseudomallei* filtrates. *J. Bacteriol.* **88**:1730-1736
- [56] **Heckly, R. J. und C. Nigg.** 1958. Toxins of *Pseudomonas pseudomallei* II. Characterization. *J. Bacteriol.* **76**:427-436
- [57] **Hensel, M., J. Shea, C. Gleeson, M. Jones, E. Dalton und D. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-403
- [58] **Hinnebusch, B. J., A. E. Rudolph, P. Cherepanov, J. E. Dixon, T. G. Schwan und A. Forsberg.** 2002. Role of Yersinia murine toxin in survival of Yersinia pestis in the midgut of the flea vector. *Science* **296**:733-735
- [59] **Hodgkin, J., P. E. Kuwabara und B. Corneliussen.** 2000. A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. *Curr. Biol.* **10**:1615-1618
- [60] **Hope, I. A (Hrsg.).** 1999. *C. elegans: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York

- [61] **Hoppe, I., B. Brenneke, M. Rohde, A. Kreft, S. Häußler, A. Reganzerowski und I. Steinmetz.** 1999. Characterization of a murine model of melioidosis: comparison of different strains of mice. *Infect. Immun.* **67**:2891-2900
- [62] **Howe, C., A. Sampath und M. Spotnitz.** 1971. The pseudomallei group: a review. *J. Infect. Dis.* **124**:598-606
- [63] <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>
- [64] <http://www.who.org>
- [65] **International Human Genome Sequencing Consortium.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921
- [66] **Ismail, G., M. N. Embi, O. Omar und N. Razak.** 1987. Toxigenic properties of *Pseudomonas pseudomallei* extracellular products. *Trop. Biomed.* **4**:101-110
- [67] **John, T. J.** 1995. Final thoughts on India's 1994 plague outbreaks. *Lancet* **346**:765
- [68] **Jones, A., T. J. Beveridge und D. E. Woods.** 1996. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* **64**:782-790
- [69] **Judson, N. und J. J. Mekalanos.** 2000. Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes. *Trends Microbiol.* **8**:521-526
- [70] **Kanai, K. und E. Kondo.** 1994. Recent advances in biomedical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (basonym: *Pseudomonas pseudomallei*). *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **47**:1-45
- [71] **Kanaphun, P., N. Thirawattanasuk, Y. Suputtamongkol, P. Naigowit, D. A. Dance, M. D. Smith und N. J. White.** 1993. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: a prospective study in 1000 hospitalized children in Northeast Thailand. *J. Infec. Dis.* **167**:230-233
- [72] **Kespichayawattana, W., S. Rattanachetkul, T. Wanun, P. Utaisincharoen und S. Sirisinha.** 2000. *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. *Infect. Immun.* **68**:5377-5384
- [73] **Kondo, E., S. Dejsirilert, N. Wejprasit, D. Chiewsilp und K. Kanai.** 1991. Heat-stable and heat-labile components of non-specific acid phosphatase detected in *Pseudomonas pseudomallei*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **44**:51-62
- [74] **Kondo, E., V. Petkanchanapong, P. Naigowit, T. Kurata und K. Kanai.** 1991. Demonstration of acid phosphatase activity in antigenic glycoprotein fractions obtained from the culture filtrate of *Pseudomonas pseudomallei*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **44**:213-224
- [75] **Korbsrisate, S., N. Suwanasai, A. Leelaporn, T. Ezaki, Y. Kawamura und S. Sarasombath.** 1999. Cloning and characterization of a nonhemolytic phospholipase C gene from *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3742-3745
- [76] **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II und K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176
- [77] **Kunakorn, M., P. Jayanetra und D. Tanphaichitra.** 1991. Man-to-man transmission of melioidosis. *Lancet* **337**:1290-1291
- [78] **Kurioka, S. und M. Matsuda.** 1976. Phospholipase C assay using *p*-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal. Biochem.* **75**:281-289
- [79] **Kurz, C. L. und J. J. Ewbank.** 2000. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **8**:142-144
- [80] **Labrousse, A., S. Chauvet, C. Couillault, C. L. Kurz und J. J. Ewbank.** 2000. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol.* **10**:1543-1545

- [81] **Langer, R. C., F. Li, V. Popov, A. Kurosky und J. M. Vinetz.** 2002. Monoclonal antibody against the Plasmodium falciparum chitinase, PfCHT1, recognizes a malaria transmission-blocking epitope in Plasmodium gallinaceum ookinetes unrelated to the chitinase PgCHT1. *Infect. Immun.* **70**:1581-1590
- [82] **Lee, M.-A. und Y. Liu.** 2000. Sequencing and characterization of a novel metalloprotease from *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**:67-72
- [83] **Lee, S. S., Y. C. Liu, J. H. Wang und S. R. Wann.** 1998. Mycotic aneurysm due to *Burkholderia pseudomallei*. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1013-1014
- [84] **Leelarasamee, A.** 2000. Melioidosis in southeast asia. *Acta Tropica* **74**:129-132
- [85] **Leelarasamee, A. und S. Bovornkitti.** 1989. Melioidosis: review and update. *Rev. Infect. Dis.* **11**:413-425
- [86] **Lehoux, D. E., F. Sanschagrín und R. C. Levesque.** 2001. Discovering essential and infection-related genes. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:515-519
- [87] **Leyns, F., G. Borgonie, G. Arnaut und D. De Waele.** 1995. Nematocidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Fund. Appl. Nematol.* **18**:211-218
- [88] **Li, L., Z. Lu und H. Liang.** 1994. Epidemiology of melioidosis in China. *Zhonghua Liu Xing. Bing. Xue. Za Zhi* **15**:292-295
- [89] **Liu, B., G. C. Koo, E. H. Yap, K. L. Chua und Y. H. Gan.** 2002. Model of differential susceptibility to mucosal *Burkholderia pseudomallei* infection. *Infect. Immun.* **70**:504-511
- [90] **Liu, M., J. E. Gonzalez, L. B. Willis und G. C. Walker.** 1998. A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4600-4602
- [91] **Liu, P. V.** 1957. Survey of hemolysin production among species of Pseudomonads. *J. Bacteriol.* **74**:718-727
- [92] **Mahajan-Miklos, S., L. G. Rahme und F. M. Ausubel.** 2000. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol. Microbiol.* **37**:981-988
- [93] **Mahajan-Miklos, S., M.-W. Tan, L. G. Rahme und F. M. Ausubel.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**:47-56
- [94] **Masoud, H., M. Ho, T. Schollaardt und M. B. Perry.** 1997. Characterization of the capsular polysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* 304b. *J. Bacteriol.* **179**:5663-5669
- [95] **Mays, E. E. und E. A. Ricketts.** 1975. Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure. *Chest* **68**:261-263
- [96] **Merriman, T. R. und I. L. Lamont.** 1993. Construction and use of a self-cloning promoter probe vector for gram-negative bacteria. *Gene* **126**:17-23
- [97] **Moens, S. M. und J. Vanderleyden.** 1996. Functions of bacterial flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* **22**:67-100.
- [98] **Mollaret, H. H.** 1988. "L'affaire du jardin des plantes" ou comment la melioidose fit son apparition en France. *Medicine et Maladies Infectieuses* **18**:643-654
- [99] **Nigg, C., R. J. Heckly und M. Colling.** 1955. Toxin produced by *Malleomyces pseudomallei*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**:17-20
- [100] **Nimtz, M., V. Wray, T. Domke, B. Brenneke, S. Häußler und I. Steinmetz.** 1997. Structure of an acidic exopolysaccharide of *Burkholderia pseudomallei*. *Eur. J. Biochem.* **250**:608-616
- [101] **O'Quinn, A. L., E. M. Wiegand und J. A. Jeddloh.** 2001. *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cell. Microbiol.* **3**:381-393

- [102] **Palleroni, N. J.** 1984. Genus I. *Pseudomonas* M gula 1894. In: Krieg, N. R., and J. G. Holt (Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, S. 141-199
- [103] **Penn, C. W. und C. J. Luke.** 1992. Bacterial flagellar diversity and significance in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**:331-336.
- [104] **Perry, M. B., L. L. MacLean, T. Schollaardt, L. E. Bryan und M. Ho.** 1995. Structural characterization of the lipopolysaccharid O antigens of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* **63**:3348-3352
- [105] **Phetsouvanh, R., S. Phongmany, P. Newton, M. Mayxay, A. Ramsay, V. Wuthiekanun und N. J. White.** 2001. Melioidosis and Pandora's box in the Laos People's Democratic Republic. *Clin. Infect. Dis.* **32**:653-654
- [106] **Pitt, T. L.** 1998. *Pseudomonas, Burkholderia* and related genera. In: A. Balows, and B. I. Duerden (Hrsg.) *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Volume 2: Systematic Bacteriology. Arnold Press, London, S. 1109-1138
- [107] **Pitt, T. L., S. Trakulsomboon und D. A. B. Dance.** 2000. Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Tropica* **74**:181-185
- [108] **Pongsunk, S., N. Thirawattanasuk, N. Piyasangthong und P. Ekpo.** 1999. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by a monoclonal antibody assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3662-3667
- [109] **Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kristjansson, J. N. Maslow und R. D. Arbeit.** 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **20**:95-102
- [110] **Pujol, N., E. M. Link, L. X. Liu, L. C. Kurz, G. Alloing, M.-W. Tan, K. P. Ray, R. Solari, C. D. Johnson und J. J. Ewbank.** 2001. A reverse genetic analysis of components of the Toll signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11**:809-821
- [111] **Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins und F. M. Ausubel.** 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**:1899-1902
- [112] **Rahme, L. G., M.-W. Tan, L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood und F. M. Ausubel.** 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:13245-13250
- [113] **Rajchanuvong, A., W. Chaowagul, Y. Suputtamongkol, M. D. Smith, D. A. Dance und N. J. White.** 1995. A prospective comparison of co-amoxiclav and the combination of chloramphenicol, doxycycline, and co-trimoxazole for the oral maintenance treatment of melioidosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**:546-549
- [114] **Read, T. D., S. R. Gill, H. Tettelin und B. A. Dougherty.** 2001. Finding drug targets in microbial genomes. *Drug Discov. Today* **6**:887-892
- [115] **Reckseidler, S. L., D. DeShazer, P. A. Sokol und D. E. Woods.** 2001. Detection of bacterial virulence by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect. Immun.* **69**:34-44
- [116] **Reich, K., L. Chovan und P. Hessler.** 1999. Genome scanning in *Haemophilus Influenzae* for identification of essential genes. *J. Bacteriol.* **181**:4961-4968
- [117] **Riddle, D. L., T. Blumenthal, B. J. Meyer und J. R. Priess (Hrsg.).** 1997. Introduction to *C. elegans*. In *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, S. 1-22
- [118] **Riecke, K., S. Wagner, J. Eller, H. Lode und T. Schaberg.** 1997. Pulmonale Melioidose bei einem deutschen Südostasientouristen. *Pneumologie* **51**:499-502
- [119] **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B.**



- Mullis und H. A. Erlich.** 1987. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**:487-491
- [120] **Samatey, F. A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto und K. Namba.** 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**:331-337
- [121] **Sandkvist, M.** 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**:271-283
- [122] **Sanford, J. P.** 1990. *Pseudomonas* species (including melioidosis and glanders). In: G. L. Mandell, R. G. Douglas, and J. E. Bennett (Hrsg.) Principles and Practice of Infectious Disease. Churchill Livingstone, New York, S. 1692-1696
- [123] **Schwyn, B. und J. B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**:47-56
- [124] **Sexton, M. M., A. L. Jones, W. Chaowagul und D. E. Woods.** 1994. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*. *Can. J. Microbiol.* **40**:903-910
- [125] **Shahabuddin, M. und J. M. Vinetz.** 1999. Chitinases of human parasites and their implications as antiparasitic targets. *EXS.* **87**:223-234
- [126] **Shakarian, A. M. und D. M. Dwyer.** 2000. Pathogenic leishmania secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp. Parasitol.* **94**:238-242
- [127] **Shetron-Rama, L. M., H. Marquis, H. G. Bouwer und N. E. Freitag.** 2002. Intracellular induction of *Listeria monocytogenes* actA expression. *Infect. Immun.* **70**:1087-1096
- [128] **Simon, R., J. Quandt und W. Klipp.** 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene* **80**:161-169
- [129] **Simpson, A. J., Y. Suputtamongkol, M. D. Smith, B. J. Angus, A. Rajanuwong, V. Wuthiekanun, P. A. Howe, A. L. Walsh, W. Chaowagul und N. J. White.** 1999. Comparison of imipenem and ceftazidime as therapy for severe melioidosis. *Clin. Infect. Dis.* **29**:381-387
- [130] **Smith, C. J., J. C. Allen, M. N. Embi, O. Othman, N. Razak und G. Ismail.** 1987. Human melioidosis: an emerging medical problem. *MIRCEN J.* **3**:343-366
- [131] **Smith, M. D., B. J. Angus, V. Wuthiekanun und N. J. White.** 1997. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* **65**:4319-4321
- [132] **So, S. Y., P. Y. Chau, Y. K. Leung und W. K. Lam.** 1984. First report of septicaemic melioidosis in Hong Kong. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**:456-459
- [133] **Sokol, P. A., D. E. Ohman und B. H. Iglewski.** 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **9**:538-540
- [134] **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517
- [135] **Stanton, A. T. und W. Fletcher.** 1921. Melioidosis, a new disease of the tropics. *Trans. 4<sup>th</sup> Congr. Far Eastern Assoc. Trop. Med.* **2**:196-198
- [136] **Stanton, A. T. und W. Fletcher.** 1925. Melioidosis, a disease of rodents communicable to man. *Lancet* **1**:10-13
- [137] **Steinmetz, I., A. Reganzerowski, B. Brenneke, S. Häußler, A. Simpson und N. J. White.** 1999. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **37**:225-228
- [138] **Steinmetz, I., M. Rohde und B. Brenneke.** 1995. Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. *Infect.*

- Immun. **63**:3959-3965
- [139] **Suputtamongkol, Y., A. J. Hall, D. A. Dance, W. Chaowagul, A. Rajchanuvong, M. D. Smith und N. J. White.** 1994. The epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, northeast Thailand. *Int. J. Epidemiol.* **23**:1082-1090
- [140] **Tam, A., Fujimura-Kamada, K., and S. Michaelis.** 1997. Ste24 protease. In: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Hrsg.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, S. 1094-1096
- [141] **Tam, A., W. K. Schmidt und S. Michaelis.** 2001. The multispanning membrane Protein Ste24p catalyzes CAAX proteolysis and NH<sub>2</sub>-terminal processing of the yeast a-factor precursor. *J. Biol. Chem.* **276**:46798-46806
- [142] **Tan, M.-W. und F. M. Ausubel.** 2000. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:29-34
- [143] **Tan, M.-W., L. G. Rahme, J. A. Sternberg, R. G. Tompkins und F. M Ausubel.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:2408-2413
- [144] **Tan, M.-W., S. Mahajan-Miklos und F. M. Ausubel.** 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:715-720
- [145] **Tang, C. M. und E. R. Moxon.** 2001. The impact of microbial genomics on antimicrobial drug development. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**:259-269
- [146] **The C. elegans Sequencing Consortium.** 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**:2012-2017
- [147] **Thomas, A. D., J. Forbes-Faulkner und M. Parker.** 1979. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths. *A. J. Epidemiol.* **110**:515-521
- [148] **Torrens J. K., P. H. M. McWhinney und D. S. Tompkins.** 1999. A deadly thorn: a case of imported melioidosis. *Lancet* **353**:1016
- [149] **Visca P., G. Cazzola, A. Petrucca und C. Braggion.** 2001. Travel-associated *Burkholderia pseudomallei* infection (Melioidosis) in a patient with cystic fibrosis: a case report. *Clin. Infect. Dis.* **32**:E15-16
- [150] **Walsh, A. L., M. D. Smith, V. Wuthiekanun, Y. Suputtamongkol, V. Desakorn, W. Chaowagul und N. J. White.** 1994. Immunofluorescence microscopy for the rapid diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Pathol.* **47**:377-379
- [151] **Wassenaar, T. M. und W. Gaastra.** 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:1-7
- [152] **Wehmhöner, D.** 2002. Proteomanalyse unterschiedlicher Morphotypen von *Pseudomonas aeruginosa*, isoliert von Patienten mit zystischer Fibrose. Dissertation, Universität Hannover
- [153] **White, N. J., D. A. B. Dance, W. Chaowagul, Y. Wattanagoon und N. Pitakwatchara.** 1989. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet* **2(8665)**:697-701
- [154] **Whitmore, A.** 1913. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. *Journal of Hygiene* **13**:1-34
- [155] **Whitmore, A., and C. S. Krishnaswami.** 1912. An account of the discovery of a hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. *Indian Med. Gaz.* **47**:262-267
- [156] **Winstanley, C., B. A. Hales, J. E. Corkill, M. J. Gallagher und C. A. Hart.** 1998. Flagellin gene variation between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* contrasts with the invariance among clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **47**:689-694
- [157] **Wuthiekanun, V., M. D. Smith und N. J. White.** 1995. Survival of *Burkholderia*

- pseudomallei* in the absence of nutrients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **89**:491
- [158] **Yabuuchi, E. und M. Arakawa.** 1993. *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis be aware in temperate area. Microbiol Immunol. **37**:823-836
- [159] **Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki und M. Arakawa.** 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. **36**:1251-1275
- [160] **Yang, H., C. D. Kooi und P. A. Sokol.** 1993. Ability of *Pseudomonas pseudomallei* malleobactin to acquire transferrin-bound, lactoferrin-bound, and cell-derived iron. Infect. Immun. **61**:656-662
- [161] **Yang, H., W. Chaowagul und P. A. Sokol.** 1991. Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. Infect. Immun. **59**:776-780
- [162] **Yazdanpanah, Y., X. Lemaire, E. Senneville, V. Delcey, N. Viget, Y. Mouton, F. Ajana und L. Dubreuil.** 2002. Melioidotic osteomyelitis of the femur occurring in a traveller. J. Travel Med. **9**:53-54
- [163] **Zinn, M, B. Witholt und T. Egli.** 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv. Drug Deliv. Rev. **53**:5-21

## **8. Anhang**

### **8.1 Nukleotidsequenzen der durch Transposoninsertion gestörten Gene von *B. pseudomallei*-Mutanten**

#### **8.1.1 Mutante P7:80**

#### **8.1.2 Mutante P10:21**

#### **8.1.3 Mutante 102**

#### **8.1.4 Mutante P5:28**

#### **8.1.5 Mutante P5:81**

#### **8.1.6 Mutante F12**

#### **8.1.7 Mutanten P3:89 und P8:45**

### 8.1.1 Mutante P7:80\*

```

                                                    tcgctctga
  tggatcgcga gcaccggccc ctcgaccgcy atgtcgaggg tcgaattggt gacgacgacg
  gcgatctcga tgatgcggtc ggtgtccggg tccaggcccg tcatttccat gtcgagccaa
  acgaggttca gttcgttgcy aacgagcgcy ggctggcccg ccacggcggg gatatcggtc
  atgagcaatc ctgggaaatg ggcggacggc gcgcgcgcgc cggggcgggc cggcaaacia
  caagcgggccc gggtcgcgaa gaacataata ttctcgcata gataccacc agcgccttcg
  1  ATGTCCGCCT ATACCTTCAC CCTGCTCTTC GCCGTCGCGA TCGTCGCGAT GACGGGCACC
  61  AAGCTGTGGC TCGCGTCGCG GCAGGTCCGC TTCGTCGCCG CGCATCGCGC CCGCGTGCCC
  121 GCGCAGTTCC GCGAAACGAT CCCGCTCGCC GCGCACCAGC GCGCCGCCGA CTACACGATC
  181 GAGCGCACGC GGCTCACGAT GTTCGAGATC GTCGTCTCCT CGGCGGTGCT TGTGCGCCTC
  241 ACGCTCCTCG GGGGCGTCGG CGCGCTCGAT TCGCTGCTCG CCGCTGGCT CGGCCACGGC
  301 TACGGCCAGC AGGTGGCGCT CGTCGCCGCG GTGCTCGTGA TCTCCAGCGC GGCCGATCTG
  361 CCGTTCGAGT ACTACCGCCA GTTCGGCATC GAAGAGCGCT TCGGCTTCAA CCGGATGACG
  421 AAGCGGCTGT TCTTCACCGA TCTCGCGAAG AACCGCGCTGC TCGGCGCGGC GCTCGGCCTG
  481 CCGCTCCTGT TCGTCGTGCT GTGGCTGATG AACCAGGCGG GCGCGCTATG GTGGCTGTGG
  541 ACGTGGATCG TGTGGGTCGG CTTCCAGATG CTCGTTCTCG TGCTCTACCC GACCTTCATC
  601 GCGCCGATCT TCAACAAGTT CGAGCCGCTT TCCGACGACG CGCTGCGCGC GCGCATCGAA
  661 GGGCTGATGA AGCGCTGCGG CTTGCGGGCG AAGGGCCTCT TCGTATGGA CGGCAGCCGC
  721 CGCTCCGCGC ACGGCAACGC GACTTTCACG GGCTTCGGCG CGTCGAAGCG GATCGTGTTT
  781 TTCGATACGT TGCTCGCCC CCTGACGGG GCGGAGATCG AAGCGGTGCT CGCGCACGAG
  841 CTCGGCCATT TCAAGCGCCG CCACGTGATG AAGCGGATGC TGTGGACCTT CGCGCTCAGC
  901 CTCGCGCTGC TCGCGCTGCT CGGCTGGCTC GCGCAGCGCG CGTGGTTCTA CACGGGCCTC
  961 GCGGTGATGC CGTCGCTCTC GGGCAGCAAC GCGGGCATCG CGTCTGTGCT GTTCTTCCTG
  1021 TCGATGCCGG GGTTCCTGTT CTTGCTCACG CCGCTTGGCA GCCTGAGCTC GCGCAAGCAC
  1081 GAGTTCGAGG CCGACGCGTT CGCCGCGAGC CAGACCGATG CGCGCGATCT CGTCAACGCG
  1141 CTCGTGAAAC TCTACGAAGA CAATGCGTCG ACGCTCACGC CCGACCCCGT CTACACCGCG
  1201 TTCTACTACT CGCATCCGCC CGCGTCGAG CGTATCGACC GGCTGCTCCA GCACTCATGA
  agcgcgcgcc gacgaagcag ccggccaagc ccgccgcgcg cggcggtgaa cgcgcgcagg
  ggcgcgtgat c

```

\* Großbuchstaben: Gensequenz, 1260 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 474 bp.

Rot: Startcodon.

Grau unterlegt: Primer BF11 und BF12 zur Gensynthese für die Komplementation.

## 8.1.2 Mutante P10:21\*

```

c gtttgcgtgt gcacgtgcac catcaggteg
atcgacgaag gcgcgatgcc cgtcgaatcg acgagcgcgc cgatcgcgcg cgacgcgagc
tcgacctcgc tcgtctgcgg cgccgcgtgg aagaaccggc agcccgattc gaggatcgcg
tcgacctgcg cgcgcggcca tgcgtggcgg gccgcccacg cgccgatctc gatcgccgcg
tcgggcagct cgtacgcggc ggcgtcgatg ccgatccagt ggttcgcttg atctgggcgc
1 ATGGCGTCAC ATGTCCAGGG CGAGCGGCAT GTCTTCGTAA TCGATCACGT CGAGCTGCTC
61 GAAGGTCCGG CGCACGCGCG GCGTGAGCAG GCCGATCTCG CGGATCGTCG GCACGAGGCG
121 GCGGAAGATC GAGCGGCGCA GCGCGCGCGA CACCTCGGAT TCGCGCACCA TCTGCGCGCA
181 GGCCTGCTTC GAATAGCCGA GCGGCTCCCA GATGTCGTCC GCGCACAGGT GCTCGTACAG
241 CACCGATGCG CCCTCGCTCA CGAATTCCTC GCGCTCCTTC ATCTCGGCGG ACGTCATGTC
301 CGAATACACG CGGGCGAGCG TGAGCCGGCC GACCGCGAAA TGGCGCGCCT CGTCGCGCTG
361 GATGCGCGCG AACAGATCCT TGACGAACGG ATCGGCGCTG AACGCGACGA CGGTCTGGAA
421 AGTCGACAGC GCGATTCCCT CGACGAGCAC CTGCATGCCG AGGTTTCGTGA TGTGAGCGC
481 GCTCGACGTG ACGGTGTCCT TCAGCAGCCC TTCGAGCGAG CGGTCATCG GGTAGCGCAC
541 GCTGATCTTC TCGTTGACGA GCTTCGCGTA CGCCTCGACG TGGCGCGCCT CGTCCATGAT
601 CTGCGCGGCC GCGCACAGGC GCGCGGGCAG GCTCTGCTCG GCGCTCGCGA GCTTCGATGC
661 GCAGATGAGC GCCGCTGCT CGCCGTGCAG GATCTGCGAC AGCAGCCACC CCTGCCAGTG
721 ATGGCGCATC TCCGCGCGCT CGGCCGCGCC GAGCTTGTGC CACAGATCGG TGCCGAACAC
781 GAGCAGCATT CCGTCGGGCA TGCCGAGCGG ATTGTGCGGG TCGAGCGTCA CGTTCAGTC
841 GATGTCGCGG TTGACGTCCC ACTGGGCGGC CTTCGCCTTG TGGTACAGGT TCGTGAGCGC
901 GGTCTCGCGG TATTCGTAAT CGCCCATCAT CAGCGCGTCG ACGGGCATCG ACCAGCGCTG
961 GCTGCGGGCG GCGTCTTCGT ACGGTTGCAT AGTGGCTTCC ATGGTTCGGTT AGGCGAAGCG
1021 GGCGGGCGGC CGCGCGGGTT GGCCGGCGGC GTCGGCGGCG CGCGCGAGGC GGATCGCGTA
1081 GCGCGGCCAG TCGCGCAGCA GCGCGGCTTC CAGCGCGTCG AGCCGGCGCT CGTTCGCGCA
1141 CGCGAACGCG AGCGTGTGT CGCCCGGGTA ATCGAGATCG CGGCGAATCC GGTCGACGAT
1201 GCCGATGCC GGCTGCGCCT CGACGCGCGA CCAGAACGCC ATCTGCGTGT CGAGGCCGCT
1261 GCCGATCAGC ACGCGCGGGT CGAGCAGGTT CACGGGCAGC GCGCCGTTGT ACGGCATGCG
1321 GAACCGGACG AACACGCGCG TCTCGGCACC GAGCGCCTGC CACAACGCAT CGACGAGCTC
1381 CGACATGAAG CGCACGTACT GCGCGTGATC GAGCAGCACG GGCGCCGTCG AATCCGGCTG
1441 ATACGCGGCG AGGCGCGCGT AATCGTCGGC GGTGCGGGCG GGGATGCCGT AGCTCGACGC
1501 GCGCACGAGC ACCGGCGTGC GGGGCGCGCG TTCGAGCCGG TAGCGGCGCA GGGCGAAGGG
1561 CGTCATGCTG TGTCGTCCAG GCGAAAGCGG GCGGCGGCGT CGTAGccgat ctcgcgatc
gcgaagtagc cgttgagcgc gagcgagccg acgatcgcgc gcgcggcggc cggcgcgcgc
ggcgcgcagc ggtgcagcag cagcgagatc cacggatcgc tgccgaacgc gtggccgaag
cgcgcgaagg cgtccgatg cacgggcgcg tcgcccaggc acttgagcag cgcgcggcgc
gacgcctcct tgaagaacgg cggcgcgacc ggcacgcggc cgcgttcgcg gccgaacgcg
gcgaaccgcg ggccgagcat cgcgagcgcg tgcgcgggcg gcgcccgcgc

```

\*Großbuchstaben: Gensequenz, 1605 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 327 bp.

Rot: Startcodons für ORF 1605, 1266 und 885 bp.

### 8.1.3 Mutante 102\*

```

      gccgta aacggcaaag gcgtgacaga aatctcaatt cagcccgccca tcataacagg
taaacgtcgg ctcgaccagt ggtttaccgc ttttccgcgc gggcgatccg tgtccacgcc
cgttcgcgcc gccttgcggg ccgccggacg gcgcgccgtc cgcgatgcgcg attcgtgcgc
atccaacggt ggctcaccga acgatcgaca caaaaaattc gggccgaatc tcgccctgcc
ccctcaagtt tttttggcgt acgccgaaat cctgcacaag gcggccggca aagaacgagt
gcttccgccc gcgccaatag tggcattgat gggcttatac agctcaattt ggagattttc
1  ATGCTCGGAA TCAACAGCAA CATTAACTCG TTGGTCGCTC AACAGAACCT CAACGGCTCG
61  CAAGGCGCCC TGTCCCAAGC GATCACCCGC CTGTCGTCGG GCAAGCGCAT CAACAGCGCG
121 GCGGACGATG CGGCCGGCCT CGCGATCGCC ACCCGGATGC AAACGCAGAT CAACGGCCTG
181 AACCAGGGCG TGTCGAACGC GAACGACGGC GTGTCGATCC TGCAAACGGC ATCGAGCGGC
241 CTGACCTCGC TCACCAACAG CCTGCAGCGT ATCCGCCAGC TCGCCGTGCA GGCCTCGAAC
301 GGCCCGCTGA GCGCGAGCGA CGCGTCGGCG CTGCAACAGG AAGTCGCGCA GCAGATCTCG
361 GAAGTGAACC GTATCGCTTC GCAGACGAAT CTTTTCGGCA AGAACATCCT CGACGGCTCG
421 GCAGGCACGC TGAGCTTCCA GGTGCGCGCG AACGTCGGCC AGACGGTCTC CGTCGACCTC
481 ACGCAAAGCA TGTCGGCGGC GAAGATCGGC GCGGCATGG TTCAGACGGG CCAGACGCTC
541 GGCACGATCA AGGTGGCGAT CACTCGAGC GCGCGGCCT GGTGTCGGG CAGCACCGGC
601 CAGGAGACGA CGCAGATCAA CGTCGTGTCG GACGGCAAGG GCGGCTTAC GTTCACCGAT
661 CAGAACAACC AGGCGCTGTC GTCGACGGC GTGACCGCGG TGTTCGGTTC AGCGACCGCT
721 GGTCGGGCA CGGCCGCCTC GCCTGCGTTC CAGACGCTGG CGTGTGCGC GTCGGCAACC
781 AGCGCGCTGA CCGCGACGGA CCAGGCGAAC GCCACGGCGA TGGTTGCGCA GATCAACCGC
841 GTCAACAAGC CGCAAACGGT CTCGAACCTC GACATCAGCA CGCAGACGGG CGCGTACCAG
901 GCGATGGTAT CGATCGACAA CGCACTCGCG ACGGTCAACA ATCTGCAGGC AACGCTCGGC
961 GCGGCGCAA ACCGCTTAC CGCGATCGCG ACGACGCAGC AAGCCGGCTC GAACAACCTC
1021 GCGCAGGCGC AATCGCAAAT CCAGAGCGCG GACTTTGCTC AGGAAACCGC GAACCTGTCTG
1081 CGCGCGCAAG TGCTCCAGCA AGCCGGCATC TCGGTGCTCG CGCAAGCGAA CTCGCTGCCG
1141 CAGCAAGTGC TGAAGCTCCT GCAATAAcgt gtaccgaacg acgggccgcg ctgccaggcg
      gcccgccttt gtgcggcgga gcaacaccct cgtggccgcc gcacgttttt gctttctgat
      tcttccgaat tccgcgaaat tcgccggccg tctgcggcgg cgaaggagc caccgatgt
      ccacgcccgt caccagcagc acgcagcagc aaaccaactc ggcgctgcag ca

```

\*Großbuchstaben: Gensequenz, 1167 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 756 bp.

Rot: Startcodon.

Grau unterlegt: Primer BF13 und BF14 zur Gensynthese für die Komplementation.

### 8.1.4 Mutante P5:28\*

```

                                                    gcgcgcc
gggcgggctc tttccggcac tcgcgcgcc cggcaggcgg cgctttcgcc gcctgcccgcg
gccgcgcgcg gtcgcgagcg cgcgtgacgc gtccggccga ggcttgccgg cgcttatteg
tttcgcttcg ttccgctccc gcccgttcgc ggccgcacgc tgcaggggcg tgcaggggcg
tgcaggggcg tgcgctgcgg cggtcgctcg cgttgcgatt cggtcagtc tggcgcggcg
cggcgccgtc tcggccgcgt cgcgcgccgc tcatccccgc ccgagcgcgg ccgcttcggct
1  ATGCCAGCCC GCTTGACCCG TTCGGCCTCG CTCGCTCCGG CGGCGCCGGC TCGCTCACTC
61 CGTCCCGCCG CCCGCGCGGC CCGGTGAGG CTTCGCCCAT CACCGCCGGT TGCGCCGCGC
121 GTTCGGCCCG ATTTTCCGGC TCACGCCGGC GCGCACGCCG GTTGTCTTCC GGCCCTTTCA
181 GCCGCGCGGC CAGGCCCGGC GCCTCGCCTC GCGCGCCGGC CCGCCCGCTC CCGGCCGCGC
241 TCGCCGCCGC CGATCGCCGT TCGCCGCGCT CGCCCGCCCG GCGACAAAC GGCTGAGATA
301 GCCGCAAATC CCCCTCTAT TCCGCCCATC GTGCGCGGCC CGGATGCCGA ACAATGCAGG
361 CTACTTAGAG TCTTCCGCA GGCACGCCAT GGCTACCACC GCAAACCCGA CCGTCGACAA
421 ACCGGCCTCG TCCGGCAAGC TCAAGGCCTT CGTCCTTTTT CTGCTGATCG GGATCGTTGC
481 CGCCGCCGCC GCCGCGGGCG GCACGTACTT CATGCTGTCTG AAGGAAGGCG CGCACAGCGC
541 CGCGCCGAGC GCGCCCGCGC CGCTCGCCGT GCCCGCGTTC TTCCCGCTCG AGCCGCTCAC
601 CGTGAATCTG CTGTGCGACG ACGGCATTCA GCATTACCTG CGCGTCGGCC TGTCGCTGAA
661 GCTGACCGAT CGGAAGGCGC AGGAATACCT GACGCAGCAC ATGCCGGAGC TGCGCAGCCG
721 GATTCTGCTC GCGCTGTCGA ACAAGCATCC CGAGCAGCTC GCGACGCTCG AAGGCAAGCA
781 CGCGCTCGCC GACGAGCTGA AGACGCTGAT CGAGCAGCCG ACCCAGCCGG GCAATCAGAG
841 CGCACGCGTC GACGACGTGC TGTTACCCGA GTTCGTCGTC CAATAACGCC GCCGGCAAAG
901 GAGCGCGCAT GGGCCACGAA GAATTCATGT CCCAGGAGGA GGTGGATGCA CTCTCAAGG
961 GCGTCACGGG CGAAGACGAC TCGGCCGACG AACCGGCCGA GCGTCCGGGC ATTCGCCCTT
1021 ACAACATCGC GACGCAGGAG CGGATCGTTC GCGGCCGGAT GCCCGGCCTC GAAATCATCA
1081 ACGATCGCTT CGCGCGCCTC TTGCGGATCG GCATCTTCAA CTTCATGCGG CGCACGCGCG
1141 AAATCTCCGT GAgccccggtg aaggtgcaga agtacagcga gttcacgcgc aacctgccga
tcccgaccaa tctgaacctc gtgcacgtga agccgctgcg cggcacgctc ctgttcggtg
tcgatccgaa cctcgtgttc ttcgctcgtc acaacctggt cggcggcgac gggcgtttcc
acacgcgcgt cgaagggcgc gacttcacgg cgaccgaaca gcggatcatc ggcaagctgc
tcaatctcgt gttcagagcac tacgcgagcg cgtggaagag cgtgcggccg ttgcagttcg
agttcgtgcg ctcggagatg cacacgcagt tcgcgaacg

```

\*Großbuchstaben: Gensequenz, 1152 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 311 bp.

Rot: Startcodon.



### 8.1.5 Mutante P5:81\*

```

                cgagc cccgacaaga agcagcttgc cgaggaggac gaagagcatc
cggcgctcct cgccttcgaa aacgagagga accgctacga acgcaatctc gactacgcgc
gcacgatcgc gcgccaggat ccgaagatcg tgcgaaccgt cgtgaagaac tgggtgtccg
1  ATGAACGCTG AAGGCTTGAA CAAGAGCGCG CTCCTGCTGA TGTCGATCGG CGAGGAAGAG
61  GCCGCGCAGG TATTCAAATT CCTCGCGCCG CGCGAAGTGC AGAAGATCGG CGCGGCAATG
121  GCCGCGCTGA AGAACGTCAC GCGCGAGCAG GTCGAGGACG TGCTCAACGA TTTCGTGCAG
181  GAAGCGGAGA AGCACACCGC GCTGTCTGCTC GATTCGAGCG AGTACATCCG CACGGTGCTG
241  ACGAAGGCGC TCGGCGAGGA CAAGGCGGGC GTGCTGATCG ACCGCATCCT GCAAGGCAGC
301  GACACGAGCG GCATCGAAGG GCTCAAGTGG ATGGACTCGG CGGCCGTGGC CGAGCTCATC
361  AAGAACGAGC ATCCGCAGAT CATCGCGACG ATTCTCGTGC ACCTCGACCG CGATCAGGCC
421  TCCGAGATCG CGTCGTGCTT CACCGAGCGG CTGCGCAACG ACGTGCTGCT GCGGATCGCG
481  ACGCTCGACG GCATCCAGCC GACCGCGCTG CGCGAGCTCG ACGACGTGCT GACGGCCTC
541  TTGTCCGGCA GCGACAACCT CAAGCGCGCG CCGATGGGCG GCATCCGCAC CGCGGCCGAG
601  ATCCTGAACT TCATGACGAG CGTGCACGAG GAGGCGGTGA TCGAGAACGT CAAGCAATAC
661  GATCCCGACC TCGCGCAGAA GATCATCGAT CAGATGTTTCG TGTTCGAGAA CCTGCTCGAT
721  CTCGAGGACC GCGCGATCCA GCTGCTGCTC AAGGAAGTCG AATCGGAGGC GCTGATCATC
781  GCGCTCAAGG GCGCGCCGCC CGCGCTGCGC CAGAAGTTCC TGTCGAACAT GTCGCAGCGC
841  GCGGCCGAGC TGCTCGCCGA GGATCTCGAC GCGCGCGGCC CGGTGCGCGT GTCCGAAGTC
901  GAGACGCAGC AGCGCAAGAT CCTGCAGGTC GTGCGCAATC TCGCCGAGAG CGGCCAGATC
961  GTGATCGGCG GCAAGGCGGA AGACGCTTAT GTCTGAtcgc gcgagcgcgt cggacaagcc
      cgtcaccgca taccagcggg gggagatggc ttcgttcgat cccccgccgc cgccgccgcc
      cgatgacggc ggcgcggcgg cggccgcgct cgccgccgaa ctgcagcgcg tgcgcgacgc
      cgcgcacgcg gaagggctcg ccgccggcca cgtcgaaggc caggcgcctcg gctatcaggc
      cggttacgag cag

```

\*Großbuchstaben: Gensequenz, 996 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 471 bp.

Rot: Startcodon.

### 8.1.6 Mutante F12\*

```

                                gccgc cggcatcgat ccattactcc
1  ATGACAAGAA CTCGCTTTGC TTTGCGGGCGC GTCGCAACGG CGCTCGTCGT CGCCGGAATT
61  GTCGCCGCGC AGGCCGCTCA CGCTCAGGTC ACGCTCAATT TCGTCAATGC GGACATCGAT
121 CAGGTCGCCA AGGCGATCGG CGCCGCGACG GGCAAGACGA TCATCGTCGA TCCTCGCGTC
181 AAGGGGACAG TGAACCTCGT CGCCGAGCGT CCGGTGCCCG AAGATCAGGC GCTGAAGACG
241 CTGCAGTCCG CGCTGCGGAT GCAGGGCTTC GCGCTCGTCC AGGATCACGG CGTCTTGAAG
301 GTCGTGCCGG AAGCCGACGC GAAGCTGCAG GCGGTGCCGA CATAATCGG CAACGCGCCG
361 CAGGCGCGCG GCGACCAGGT GGTCACGCAA GTGTTTCGAGC TGCGCAACGA ATCGGCGAAC
421 AACTTGCTTC CGGTGCTGCG CCCGCTGATC TCGCCGAACA ACACGATCAC CGCGTATCCG
481 GCCAACAACA CGATCGTCGT CACCGATTAC GCGGACAACG TGCGCCGGAT CGCGCAGATC
541 ATCGCGGGCG TCGACAGCGC GCGGGGCTCG CAAGTCGCCG TCGTGCCGCT CAAGAACGCG
601 AATGCGATCG ACATCGCCGC GCAACTGACG AAGCTGCTCG ACCCGGGCGC GATCGGCAAC
661 ACCGACCGCA CGCTGAAAGT CACCGTGCAG GCCGATCCGC GAACCAATGC GCTGCTGCTG
721 CGCGCATCGA ACGCGCAGCG CCTCGCCACG GCGAAGAAGA TCGCGCAGCA GCTCGACGCG
781 CCGAGCGGTG TGCCGGGCAA CATGCACGTC GTGCCGCTGC GCAATGCGGA AGCGGTGAAG
841 CTCGCGAAGA CGCTGCGCGG GATGCTCGGC AAGGGCGGCG GCGAAAGCGG CTCTGTCGGC
901 AGCTCGAACG ACGCGAACGC GTTCAATCAG GGCGGCTCGC AAAGCGGCTC GAACTTCTCG
961 ACGGGCGCAT CGGGCACGCC GCCGCTGCCG TCGGGGCTGT CGTCGAATTC ATCGGGCGGC
1021 GCGGGCGGCA CGACGGGCGG CGGCGGGCTC GGCAATGCGG GGCTGCTCGG CCGCGACAAG
1081 GACAAGGGCG ACGACAACCA GCCGGGCGGA ATGATCCAGG CGGACGCGGC GTCGAATTCG
1141 CTCATCATCA CCGCGTCGGA TCCGGTATAC CGGAATCTGC GGGCCGTGAT CGACCAGCTC
1201 GATGCGCGGC GCGCGCAGGT GTACATCGAG GCGCTGGTTC TCGAGCTGCA GGCGACGACC
1261 AGCGCCAATC TGGGCATTCA ATGGCAGGTT GCGAACAACG CGTCTATGC GGGCACC AAT
1321 CTGGTGACGG GGCAGACCGG CCTCGGCAAC AGCATCGTCA ATCTGACGGC GGGAGCCGTG
1381 ACCAATCCGG GCGGCACGCT GGGGTGCTGT GGCTCGATCA CGAACGGCCT GAACATCGGT
1441 TGGTTGCACA ACATGTTTCGG CGTGCAGGGT TTGGGCGCCT TGCTGCAGTT CTTGCGGGC
1501 TCGAGCGACG CAAACGTGCT GTCGACGCCG AACCTCGTCA CGCTGGACAA TGAGGAGGCG
1561 AAGATCGTGG TCGGCCAGAA CGTGCCGATT CCGACGGGCT CGTACTCGAA CCTGACGAGC
1621 GGCACGACCG CCAACGCGTT CAACACATAC GACCGGCGCG ATGTCGGCCT GACGCTGCAC
1681 GTGAAGCCGC AAATCACCGA GGGCGGCATT CTGAAGCTGC AGCTGTACAC GGAAGATTCC
1741 GCGGTGGTGC CCGGCACGAA CACGACGTCG GCCAATTTCG CCGGGCCGAC GTTCACGAAG
1801 CGCTCGATCC AGTCGACGGT GCTGGCGGAC AACGGCGAGA TCATCGTGCT CCGCGGGTTG
1861 ATGCAGGATA ACTACCAGGT ATCGAATACG AAGGTGCCGC TCCTCGGCGA CATTCCGTGG
1921 ATCGGCCAGC TGTTCCGCTC CGAGGGCAAG ACGCGCCAGA AGACGAACCT GATGGTGTTC
1981 CTGCGCCCCG TGATCATCAA CGACCGCGAG ACCGCGCAGG CGGTGACCTC GAACCGCTAC
2041 GACTACATCC AGGGCGTGAC GGGCGCGTAC AAGTCGGACA ACAACGTCAT TCGCGACAAG
2101 GACGACCCGA TCGTCCCGCC GATGCCGCTC GGCCCGAGCC AGGGCGGCTC GCCCGCGATG
2161 AACCTGTTTC ACCTCGACAA GATGCGGCGC CAGCAGCTCG CTCCGCCCGC GCCCGCCAGC
2221 GCGCCGGCGG CGGCGAGCGA CGCCGGCACC GCGTCGCCGG GAGCCCGTCC GTGAcgcagg
cgctcgcgca aggcgccccg gatcagcccg ccgcccggcgc gccgctcgccg atcgcccgcg
ggctgttgcc gtacggcttc gcgaaggccg gccagatcct gatc

```

\*Großbuchstaben: Gensequenz, 2274 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 507 bp.

Rot: Startcodon.

### 8.1.7 Mutante P3:89 und P8:45\*

```

      cagcttcg cggacccggc ccggggcggcc gcgggcgacg caccgtcgcc gtcgcccgcg
      ccgttcgcgg cgttccagcc gccgcagccg tttgcgttcg cgatgcctgc gatgccgccc
1   ATGCCGATT GGTCCGGCGC GGCCCGCTCG TTCGCGGGGC TCGCGCCCGT CGCGTCGGTG
61  CCGCCCGCGC GGCTGCAGAA GCTGCAGGCC GATTATTCGC GCGATTGCCT CGCGCTGATC
121 CAGCAGGCGA GCGCCGCGAC GCCGACCGTT CCCGAGCTGA AGGACCGGCG TTTACAGCGC
181 GACGCCTGGA AGGCTTCACC CGCGCACGGG TTCGCGGCCG CCTGGTATCT GCTGAACGCG
241 CGCTACCTGC AGGAGCTCGC CGACGCGCTC GAGACCGACC CGAAGACGCG CGAGCGGATC
301 CGCTTCACGG TCCAGCAGTG GACGGCCGCC GCGTCGCCGA GCAACTTCCT CGCGCTCAAT
361 CCGGAGGCGC AGAAGAATCT CGTCGAGACG CAGGGCGAGA GCCTGCGTCT CGGGATGATG
421 AACCTGCTCG CCGACATGCA GCGCGGCAAG ATTTTCGAGA CGGACGAATC GCAATTCGTC
481 GTCGGCAAGA ATCTCGCGGT GACGCCGGGC GCGGTCGTCT ACGAGAACGA TCTGATCCAG
541 TTGATCCAGT ACACGCCAC GACAGCCACC GTCTTCGAGC GGCCGCTGCT CATCGTGCCG
601 CCGTGCATCA ACAAGTTCTA CATCCTCGAT CTGCAGCCGG AGAATTCGCT CGTCGCGCAC
661 GCGCTGTCTG GCGGCCATCA GGTGTTCTC GTGTCGTGGC GCAATGCCGA CGCGTCGGTC
721 GCGACAAGA CGTGGGACGA CTACATCGAC GAGGGCCTGC TCGCCGCGAT CGACGTCGTC
781 CAGCAGGTGA GCGGGCGCGA GCAGATCAAC ACGCTCGGCT TCTGCGTCGG CGGCACGATG
841 CTTGCGACGG CGCTCGCGGT GCTCGCCGCG CGCGGCGAGC ACCCGGCCGC GTCGATGACG
901 CTGCTCACCT CGATGCTCGA CTTCTCCGAC ACGGGCATT CCGACGTGTT CGTCGACGAG
961 GCGCACGTGC AGATGCGCGA GCAGACCATC GCGGCAAGG GCGGCGCGCC CGCGGGCTTG
1021 ATGCGCGGCG TCGAGTTCGC GAACACGTTT TCGTTTCTTC GTCCGAACGA TCTCGTGTGG
1081 AACTACGTCG TCGACAATA CCTGAAGGGC CGCACGCCCG CGCCGTTCGA TCTGCTGTAC
1141 TGGAACGGCG ATTTCGACGAG CCTGCCCGGC CCGATGTACG CGTGGTATCT GCGGAATACC
1201 TATCTCGAAA ACAAGTGGC CGAGCCGGAT GCGCTCACGG TGTGCGGCGA GCCCGTCGAT
1261 CTGTCGCGCA TCGACGTGCC GACGTTATC TACGGCTCGC GCGAGGATCA CATCGTGCCG
1321 TGGCAGACTG CGTACGCGTC GACGTCGCTG CTGACGGGGC CGCTGAAGTT CGTGTGGGGC
1381 GCGTCGGGCC ACATCGCAGG CGTGATCAAT CCGCCCGCGA AGCGCAAGCG CAGCTACTGG
1441 AGCTACGACG CGAGCGCGAA GGAGCTGCCG GAATCGGCGA ACGACTGGCT CGATGCGGCC
1501 GTCGAGCACC CTGGCAGTTG GTGGCCGGTA TGGATCGAGT GGCTCGATCA GTACGGCGGC
1561 AAGAAGGTGA AGCCGCGCGC GCACCTCGGC TGCGCGCGCT TCCCGGTGAT CGAGCCCGCG
1621 CCGGGCCGAT ATGTGTTGCA ACGCGATTGa cgaacggcgc aaggcggagc acgctttgcg
      tcgcgaccga tttttaacag ggcggttcgc ggcgcgccgt gccgcgcgcg cccggaggat
      agtgaaatga ctgacgtagt gatcgtatcg gccgcgcgca ccgcggtcgg caagttcggc
      ggctcgctcg cgaagatcgc cgcgcgccgag ctcggcgcgca gcgtgattcg cgcggtgctc
      gaacgtgcgg gcgtgaagcc cgagcaggtc agcgaagtga ttctgggcca ggtgctgacg
      gcgggctcgg gccagaatcc ggcgcgccag gcgctgatcg cggcggggct gccgaacgcg
      gtgccgggca tgacgatcaa caaggtgtgc ggctccggcc tgaaggccgt gatgcttgcc
      gcgaacgcgg tcgctcgcgg cgatgcggag atcgtcgtcg cggcgggcca ggagaacatg
      agcgcgcgcg cccacgtgct gccgggctcg cgc

```

\*Großbuchstaben: Gensequenz, 1650 bp.

Kleinbuchstaben: die anschließenden Basenpaare sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende.

Unterstrichen: experimentell ermittelte Sequenz, 300 bp für P3:89 (unten) und 298 bp für P8:45 (oben).

Rot: Startcodon.

## Danksagungen

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Dem Direktor des Instituts, Herrn Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann, möchte ich dafür danken, daß ich die Arbeit in diesem vielfältigen wissenschaftlichen Umfeld durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ivo Steinmetz für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche Betreuung, sein stetes Interesse und eine uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft, die diese Arbeit begleiteten.

Herrn Professor Dr. Walter H. Müller danke ich für die Übernahme des Koreferates und seine stets verfügbare Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die im Verlauf meines Studiums immer gegeben war.

Ohne die Kollegen der Arbeitsgruppe wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen: Birgit Brenneke danke ich für das Lösen zahlloser allgemeiner Laborfragen und die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten. Jessica Garlisch hat durch Organisation des Radios nicht nur die Stimmung im S3-Labor gesteigert, sondern durch ihren großen Einsatz und die exzellente technische Durchführung und Auswertung der Mausexperimente wichtige Beiträge zu dieser Arbeit geleistet. Dafür vielen Dank. Dr. Susanne Häußler möchte ich für wissenschaftliche Diskussionen zwischen Labor, Schwimmbad und indischem Restaurant danken. Senthil Selvan (GBF, Braunschweig) danke ich für die Durchführung der 2D-gelelektrophoretischen Analysen. Dr. Ralf Vonberg hat durch spontane, stets hilfreiche Lösungsvorschläge zu jeder Art von Computerfragen viel Freude bereitet. Besonderen Dank haben auch meine „Wurm-Kollegen“ Dr. Doreen Ebrecht, Meike Diedrich, Doris Jordan und Isabel Ziegler verdient, deren Unterstützung so manches Wurmexperiment ermöglichte und zu Erfolg führte.

Aber auch den anderen Kollegen der Gruppe sei für die gute Stimmung gedankt: Katrin Breitbach, Dr. Ellen Dollries, Franz von Götz, Ahmed Hegazy, Sonja Klocke, Alexandra Löttl, Florian Schenck, Dirk Wemhöner und Dr. Markus Wendt.

Ebenso möchte ich mich bei allen anderen Kollegen des Instituts herzlich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die mir von allen Seiten entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für Spiel, Spaß und Spannung neben der Arbeit, besonders Knut für seine vielfältige Unterstützung während der verschiedenen Phasen dieses Projektes. Außerdem sei Henry, seinen Freunden und deren Eltern dafür gedankt, daß sie mir so manchen „freien“ Nachmittag für meine Arbeit schufen.

Für das tapfere Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Gisela, Hartmut, Karin und Knut bedanken.

---

## Publikationsliste

### Kongressbeiträge

Posern, G., J. Zheng, K. B. Müller, W. Oehrl, S. Ruf, J. Voss, B. Knudsen, H. Hanafusa, **B. Fehlhaber**, I. Moarefi, J. Kuriyan, D. Cowburn, S. M. Feller. Rational development of highly selective inhibitors of *crk/crkl* SH3-domain mediated signal transduction. 9<sup>th</sup> AEK Symposium of the Division of Experimental Cancer Research of the German Cancer Society (Scientific Proceedings, Abstracts), März 1997, Heidelberg, Germany. Publiziert im Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Supplement 1 to volume 123 (1997).

**Fehlhaber, B.**, D. Ebrecht, I. Ziegler, S. Häußler, B. Brenneke, J. Garlich, and I. Steinmetz. Elucidating *Burkholderia pseudomallei* virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. World Melioidosis Congress: Emerging Infectious Diseases of the Indian Ocean Rim (EIDIOR) Workshop. September 2001, Perth, Western Australia.

### Originalveröffentlichungen

**Fehlhaber, B.**, D. Ebrecht, J. Garlich, S. Häußler, I. Ziegler, L. Eberl, B. Brenneke, and I. Steinmetz. Elucidating mammalian virulence of *Burkholderia pseudomallei* using a *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. Eingereicht bei Cellular Microbiology.

## CURRICULUM VITAE

Name	Beate Dagmar Fehlhaber
Geboren	04. Juli 1967 in Uelzen
Familienstand	Verheiratet, Sohn Henry geboren am 08.05.1998
Aug. 1973 - Juli 1977	Lucas-Backmeister-Schule, Uelzen
Aug. 1977 - Juni 1986	Herzog-Ernst-Gymnasium, Uelzen
Aug. 1983 - Juli 1984	12. Klasse, Severna Park Senior High School, MD, USA
Juni 1986	Abitur am Herzog-Ernst-Gymnasium, Uelzen
Aug. 1986 - Juni 1988	Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin (BTA) an der Bernd-Blindow-Schule, Hannover
Juli 1988 - Juli 1990	Tätigkeit als BTA bei der IBR Forschungs GmbH, Hannover
Juli 1990 - April 1991	Aufenthalt als BTA im Projekt der Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit „Lagunenfischerei in Südbenin“ im Rahmen des Programmes „Arbeits- und Studienaufenthalte in der 3. Welt“ in Cotonou, Benin, West-Afrika
Juni 1991 - Sep. 1991	Tätigkeit als BTA bei der IBR Forschungs GmbH, Hannover
Okt. 1991 - Sep. 1992	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig
Okt. 1992	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Hannover
Sep. 1994	Diplomvorprüfung im Studienfach Biochemie
März 1995 - Mai 1995	Laborpraktikum in der Immunoparasitologischen Abteilung des Walter and Eliza Hall Institutes of Medical Research, Melbourne, Australien
Feb. 1996 - April 1996	Laborpraktikum in der Abteilung Molekulare Biophysik der Rockefeller University, New York City, USA
April 1997	Diplomhauptprüfung im Studienfach Biochemie
Mai 1997 - Nov. 1997	Diplomarbeit am Max-Planck Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover; Titel „Trennung adenohypophysärer Zellen mittels selektiver Fluoreszenzmarkierung von Follikulostellarzellen“
Seit Sep. 1999	Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Medizinischen Hochschule Hannover

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere ferner, daß die zugrundeliegenden Ergebnisse nicht für eine andere Prüfungsarbeit verwendet worden sind.

Hannover, im Oktober 2002

Beate Fehlhaber