

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Medizinischen Hochschule Hannover
durch das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-Modells zur Virulenzana-
lyse von human- und tierpathogenen Bakterienspezies der Gattung
*Burkholderia***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Doreen Ebrecht

aus Alfeld/Leine

Hannover 2002

Wissenschaftliche Betreuung: Priv.-Doz. Dr. Ivo Steinmetz

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Gerald-Friedrich Gerlach

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2002

IN DANKBARKEIT

MEINEN ELTERN

GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
2	SCHRIFTTUM	10
2.1	Melioidose	10
2.1.1	Taxonomie	10
2.1.2	Epidemiologie und geographische Verbreitung	10
2.1.3	Kulturcharakteristika und Diagnostik	13
2.1.4	Virulenzfaktoren bei <i>B. pseudomallei</i>	14
2.1.5	Verbreitung der Melioidose bei Tieren.....	16
2.1.6	Klinische Manifestation und Pathogenese.....	17
2.1.7	Therapie und Prophylaxe.....	19
2.2	Infektionen mit <i>Burkholderia cepacia</i>	20
2.2.1	Taxonomie	20
2.2.2	Epidemiologie und geographische Verbreitung	21
2.2.3	Kulturcharakteristika und Diagnostik	22
2.2.4	Virulenzfaktoren bei <i>B. cepacia</i>	23
2.2.5	Klinische Manifestation und Pathogenese.....	25
2.2.6	Therapie und Prophylaxe.....	26
2.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	27
2.3.1	Vorkommen und Bedeutung in der biologischen Grundlagenforschung	27
2.3.2	Anatomie.....	28
2.3.3	Lebenszyklus und Entwicklung	30
2.4	<i>C. elegans</i>-Bakterium-Interaktionen	31
2.4.1	Bedeutung des <i>C. elegans</i> -Modells als Pathogenitätsmodell	31
2.4.2	Auswirkung der Kulturbedingungen auf die <i>C. elegans</i> -Bakterien-Interaktionen am Beispiel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
2.4.2.1	”Slow killing”	33
2.4.2.2	”Fast killing”	33
2.4.2.3	”Letale Paralyse“.....	34
2.5	Zielsetzung der Arbeit	36
3	MATERIAL UND METHODEN	37
3.1	Bakterien	37
3.1.1.	Bakterienstämme	37
3.1.2	Kulturbedingungen.....	38

3.1.3	Keimzahlbestimmung	39
3.1.4	Kulturkonservierung	39
3.2	Basistechniken mit <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
3.2.1	Versuchstiere	39
3.2.2	Herstellung der bakteriellen Nahrungsquelle	40
3.2.3	Übersetzen von <i>C. elegans</i> zur Erhaltung der Stockplatten	41
3.2.4	Reinigung kontaminierter Stockplatten	42
3.2.5	Unterscheidung der einzelnen Entwicklungsstadien	43
3.2.6	<i>C. elegans</i> -Eipräparation	44
3.2.7	Einfrieren und Auftauen von <i>C. elegans</i>	45
3.3	Infektionsmodell	46
3.3.1	Durchführung der <i>C. elegans</i> -Assays	46
3.3.1.1	“Slow killing“- Assay auf NG (Nematode Growth)-Agar	46
3.3.1.2	“Fast killing“- Assay auf PGS (Pepton Glucose Sorbitol)-Agar	47
3.3.1.3	Modifizierter “fast killing“- Assay auf GS (Glucose Sorbitol)-Agar	47
3.3.1.4	<i>C. elegans</i> -Assays auf anderen Testmedien	48
3.3.2	Hitzeinaktivierung von Bakterien	48
3.3.3	Nitrocellulose-Assay	49
3.3.4	Modifizierter Nitrocellulose-Assay	49
3.3.5	Durchführung eines Transferexperiments	50
3.3.6	Mikroskopische Darstellung fluoreszenzmarkierter Bakterien im Wurmdarm	50
3.3.7	Lebendkeimzahlbestimmung im Verdauungstrakt von <i>C. elegans</i>	51
3.3.8	Berechnung der $LT_{50\%}$	52

4 ERGEBNISSE

4.1	Etablierung eines <i>Caenorhabditis elegans</i> - <i>Burkholderia pseudomallei</i> - Pathogenitätsmodells	53
4.1.1	Unterscheidung der verschiedenen <i>C. elegans</i> -Entwicklungsstadien	53
4.1.2	Charakterisierung des “slow killings“	54
4.1.2.1	Absterbekinetik unter Standardbedingungen	54
4.1.2.2	Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik	56
4.1.2.3	Vergleich vitaler Bakterien mit hitzeinaktivierten Bakterien	58
4.1.2.4	Vergleich adulter Würmer mit L4-Larven	58
4.1.2.5	Ermittlung der minimalen Expositionszeit	60
4.1.2.6	Einfluss des “egg-laying-defects“ auf das “slow killing“	62
4.1.3	Charakterisierung des “fast killings“	64
4.1.3.1	Absterbekinetik unter Standardbedingungen	64
4.1.3.2	Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik	66
4.1.3.3	Vergleich vitaler Bakterien mit hitzeinaktivierten Bakterien	67
4.1.3.4	Vergleich adulter Würmer mit L4-Larven	67
4.1.3.5	Auswirkung unterschiedlicher Bakterienkonzentrationen auf die Absterbekinetik	69
4.1.3.6	Nitrocellulose-Assay auf PGS-Agar	70
4.1.3.7	Einfluss von oxidativem Stress beim “fast killing“	71

4.1.4	Einfluss der Kulturbedingungen auf die <i>C. elegans</i>-<i>B. pseudomallei</i>-Interaktionen	73
4.1.4.1	<i>C. elegans</i> auf Brain Heart Infusion-Agar.....	73
4.1.4.2	<i>C. elegans</i> auf GS-Agar.....	75
4.1.4.3	Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar.....	78
4.1.4.4	Modifizierter Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar.....	80
4.1.5	Vergleich des <i>B. pseudomallei</i>-Stammes NCTC 7431 vor und nach Mauspassage	82
4.2	Etablierung eines <i>Caenorhabditis elegans</i>-<i>Burkholderia cepacia</i>-Pathogenitätsmodells: Vergleich des <i>B. cepacia</i>-Wildtypstammes H111 mit der Autoinducer-negativen Mutante H111 m64.....	84
4.2.1	Charakterisierung des “slow killings“	84
4.2.1.1	Absterbekinetik unter Standardbedingungen.....	84
4.2.1.2	Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik.....	86
4.2.1.3	Ermittlung der minimalen Expositionszeit.....	88
4.2.1.4	Mikroskopische Darstellung der fluoreszenzmarkierten <i>B. cepacia</i> -Stämme H111 (pUT-rfp) und H111 m64 (pBBR-5-gfp) im Verdauungstrakt von <i>C. elegans</i>	89
4.2.1.5	Analyse der Keimzahlen im Verdauungstrakt von <i>C. elegans</i> mittels CFU-Bestimmung.....	92
4.2.1.6	Einfluss des “egg-laying-defects“ auf das “slow killing“.....	95
4.2.2	Charakterisierung des “fast killings“	97
4.2.2.1	Absterbekinetik unter Standardbedingungen.....	97
4.2.2.2	Nitrocellulose-Assay.....	98
4.2.2.3	Einfluss von oxidativem Stress beim “fast killing“.....	100
4.2.3	Einfluss der Kulturbedingungen auf die <i>C. elegans</i>-<i>B. cepacia</i>-Interaktionen	102
4.3	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>, <i>B. gladioli</i> und <i>B. multivorans</i> im “slow“- und “fast killing“-Assay sowie auf GS-Agar.....	103
5	DISKUSSION	107
5.1	Charakterisierung der <i>B. pseudomallei</i>-, <i>B. thailandensis</i>- und <i>B. cepacia</i>-<i>C. elegans</i>-Interaktionen unter “slow killing“-Bedingungen.....	107
5.2	Charakterisierung der <i>B. pseudomallei</i>-, <i>B. thailandensis</i>- und <i>B. cepacia</i>-<i>C. elegans</i>-Interaktionen unter “fast killing“-Bedingungen.....	111
5.3	<i>B. pseudomallei</i>, <i>B. thailandensis</i> und <i>B. cepacia</i> unter modifizierten Kulturbedingungen.....	115
5.4	Einfluss des “Quorum sensings“ der beiden <i>B. cepacia</i>-Stämme H111 und H111 m64 auf die <i>C. elegans</i>-Absterbekinetik.....	118
5.5	Eignung des <i>C. elegans</i>-Modells als Pathogenitätsmodell für <i>Burkholderia pseudomallei</i>, <i>Burkholderia thailandensis</i> und <i>Burkholderia cepacia</i>.....	120

6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	121
7	LITERATURVERZEICHNIS	123
8	ANHANG	144
8.1	Geräte	144
8.2	Gebrauchsmaterialien	145
8.3	Medien und Zusätze	145
8.4	Lösungen und Puffer	147
8.5	Chemikalien	148
8.6	Tabellen- und Abbildungs-Verzeichnis	149
8.7	Abkürzungsverzeichnis	151

1 Einleitung

Genetische Analysen der Interaktionen zwischen eukaryontischen Wirten und pathogenen Bakterienstämmen erfordern das Vorhandensein eines geeigneten Systems, mit dessen Hilfe sowohl der Wirt, als auch das Bakterium kostengünstig und in großen Mengen genetisch gescreent werden können. Viele Virulenzfaktoren werden erst durch den Wirt induziert und können daher nur mittels Techniken identifiziert werden, die den Wirt mit einbeziehen. Aus diesem Grund wurde im Jahr 1999 von der Gruppe um FREDERICK M. AUSUBEL ein Nematoden-Bakterien-Pathogenitätsmodell vorgestellt, welches sich mit den Einflüssen von *Pseudomonas aeruginosa* auf den Fadenwurm *Caenorhabditis (C.) elegans* befasst, und mit dessen Hilfe Interaktionen zwischen Virulenzfaktoren des Bakterienstammes und den Wirtsabwehrmechanismen analysiert werden können (TAN et al., 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; TAN et al., 2000). Bereits bestehende Pathogenitätsmodelle mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Pflanze *Arabidopsis thaliana* als Wirtssysteme konnten durch das *C. elegans*-Modell erfolgreich erweitert werden. *C. elegans* besitzt eine mindestens 37%ige genetischen Äquivalenz zum Menschen, und TAN et al. (1999, 2000) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) konnten am Beispiel von *Pseudomonas (P.) aeruginosa* die Übertragbarkeit des Wurmmodells auf Vertebraten nachweisen.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des *C. elegans*-Modells zur Virulenzanalyse von human- und tierpathogenen Bakterienspezies der Gattung *Burkholderia*. *Burkholderia (B.) pseudomallei* und *B. thailandensis* sind saprophytische Boden- und Umweltkeime, die vorwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten, wie Südostasien und Nordaustralien vorkommen. *B. pseudomallei* gilt bei Mensch und Tier als Erreger der Melioidose, einer bakteriellen Infektionskrankheit, über deren Pathogenese und Virulenzfaktoren trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren, insgesamt betrachtet, noch relativ wenig bekannt ist. Im Gegensatz zu *B. pseudomallei* ist bei *B. thailandensis* bisher noch kein Fall einer natürlichen Infektion beim Menschen bekannt. Bei *B. cepacia* handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, welches vor allem pflanzenpathogen ist, jedoch auch ein großes Problem bei Mukoviszidose-Patienten (syn.: Cystische Fibrose) darstellt. Auch hier sind Pathogenese und Virulenzfaktoren noch weitgehend ungeklärt.

2 Schrifttum

2.1 Melioidose

2.1.1 Taxonomie

Burkholderia pseudomallei wurde erstmals von A. WHITMORE und C. S. KRISHNAS-WAMI im Jahr 1912 bei mangelernährten und morphiumpabhängigen Patienten in Rangoon (Burma) isoliert. Aufgrund der ähnlichen Symptomatik der Erkrankung zum Pferderotz, hervorgerufen durch den Erreger *Bacillus mallei* (heute: *Burkholderia mallei*), bekam der Keim den Namen “*Bacillus pseudomallei*“. Einige Jahre später gaben STANTON und FLETCHER (1921, 1925) der Krankheit den Namen Melioidose, abgeleitet vom griechischen Wort für “Rotz oder Krankheit der Esel“ und dem verursachenden Erreger, nach seinem Entdecker, den Namen “*Bacillus whitmorei*“. In den nachfolgenden Jahren durchlief die Spezies zusammen mit *Bacillus mallei* immer wieder andere Namensgebungen, bevor sie von PALERONI (1984) in die Gattung der Pseudomonaden aufgenommen wurden. Auf Vorschlag von YABUUCHI et al. (1992) wurden sie später schließlich zusammen mit einigen anderen Spezies in die Gattung *Burkholderia* überführt, zu der sie seitdem gehören.

2.1.2 Epidemiologie und geographische Verbreitung

Bei *B. pseudomallei* handelt es sich um einen saprophytischen Bodenkeim, der vorwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten, insbesondere in Südostasien und Nordaustralien vorkommt (DANCE, 1999; YABUUCHI u. ARAKAWA, 1993). *B. pseudomallei* ist vor allem im Erdboden und in Oberflächengewässern der Endemiegebiete zu finden und persistiert während der Trockenzeit in tieferen, noch feuchten Bodenschichten, um während der Regenzeit wieder in

höhere Erdschichten aufzusteigen. Die meisten Melioidosefälle wurden bisher in Thailand beschrieben, vor allem in der Region von Ubon Ratchatani (CHAOWAGUL et al., 1989). Weitere Daten kommen aus Nordaustralien, wo etwa 20–50 Krankheitsfälle pro Jahr auftreten. Aufgrund der Zunahme von Einzelfallberichten aus anderen tropischen und subtropischen Gebieten wie z.B. den pazifischen Inseln, Zentralafrika, Zentral- und Südamerika, China, Indien und der Karibik wird angenommen, dass Südostasien und Nordaustralien in Bezug auf die weltweite Verbreitung der Melioidose nur die “Spitze des Eisberges“ darstellen. Aufgrund von Tourismus und Migration gibt es für die Krankheit immer mehr Möglichkeiten, sich ausgehend von den Endemiegebieten in anderen geeigneten Regionen auszubreiten (DANCE et al., 2000). Sogar in gemäßigten Zonen Europas wurden einzelne Melioidosefälle beobachtet, bei denen es sich jedoch um importierte Fälle handelte, da *B. pseudomallei* hier nicht in der Umwelt vorkommt. Den wohl spektakulärsten Fall zeigte der als “L’affaire du Jardin des Plantes“ bekannte Ausbruch Mitte der 70er Jahre in einem Pariser Zoo, wo es zu einzelnen Melioidosefällen bei Tieren kam, und sich die Krankheit über die Grenzen des Zoos hinaus auch in anderen französischen Zoos und Reitställen verbreitete. Es kam zu Todesfällen bei mehreren Tieren und sogar bei einzelnen Menschen. Trotz aufwendiger Desinfektionsmaßnahmen konnte *B. pseudomallei* selbst nach Jahren noch im Erdboden nachgewiesen werden. Die Ursache dieser Infektion blieb unklar. Es wurde jedoch vermutet, dass entweder ein infizierter Panda-Bär, der anlässlich eines Besuches von Mao-Tse-Tung in Frankreich dem Pariser Zoo geschenkt wurde, oder aber aus dem Iran importierte infizierte Pferde für die Einführung des Erregers verantwortlich waren. Die Tatsache, dass in diesem Fall das Überleben und die Ausbreitung des Keimes selbst in gemäßigten Zonen möglich war, zeigt, dass die Krankheit durchaus in diesen Breitengraden manifest werden könnte. Da auch immer wieder von erkrankten Tropentouristen und Immigranten berichtet wird (RIECKE et al., 1997), sollte bei Krankheitssymptomen wie unklarem Fieber, Septikämie, multiplen Abszessen und chronisch-eitrigen Prozessen im Zusammenhang mit Auslandsaufenthalten immer auch die Melioidose als Differentialdiagnose berücksichtigt werden.

Viele Fälle von Melioidoseerkrankungen wurden in der Literatur im Zusammenhang mit militärischen Einsätzen in Südostasien beschrieben. So wurden während des Vietnamkrieges (1946–75) mehrere hundert Fälle von infizierten US-Soldaten registriert, bei denen es oft erst Jahre nach ihrer Rückkehr in die USA zum Ausbruch der Erkrankung kam (DANCE, D.A.B., 1990). Insgesamt schenkte man der Melioidose bis zum Vietnamkrieg wenig Beachtung, bis der Tod amerikanischer Soldaten an akuten Pneumonitiden das Interesse an der Krankheit weckte

(WEBER et al., 1969). Durch die lange Latenzzeit von *B. pseudomallei* (beschrieben sind Einzelfälle bis zu 26 Jahren) und die immer wieder neu auftretenden Melioidosefälle bei Vietnamveteranen spricht man auch von der "Vietnamesische Time-Bomb-Disease". Die Infektion von Mensch und Tier mit *B. pseudomallei* erfolgt in der Regel durch die Inokulation oder Kontamination von kleinen Wunden und Schleimhautläsionen mit erregerehaltigem Bodenmaterial oder Oberflächenwasser (SUPUTTAMONGKOL et al., 1994a). In Endemiegebieten wie im Nordosten Thailands scheinen die Reisbauern für die Erkrankung der Melioidose prädisponiert zu sein, da sie meist barfuß und ohne ausreichenden Schutz die Reisfelder bearbeiten. Mit Hilfe entsprechender Selektivmedien konnte *B. pseudomallei* aus 68-78% aller Reisfelder Thailands isoliert werden (WUTHIEKANUN et al., 1995). Als eine weitere Infektionsquelle wird die Inhalation von erregerehaltigem Staub diskutiert, wodurch das Auftreten vermehrter Melioidosefälle bei Helikopterbesatzungen amerikanischer Soldaten während des Vietnamkrieges zu erklären wäre (HOWE et al., 1971). Die Rolle der Ingestion erregerehaltigen Materials für die Infektion, sowie die Verbreitung des Erregers über Vektoren wie z.B Insekten ist zweifelhaft. Obwohl Erkrankungen durch *B. pseudomallei* auch bei einer Reihe von Tieren diagnostiziert wurden, ist eine Übertragung von Tier zu Mensch bzw. von Mensch zu Mensch extrem selten. Iatrogene Infektionen mittels kontaminierter Gerätschaften wurden ebenso beschrieben wie Laborinfektionen.

SUPUTTAMONGKOL et al. (1994a) analysierten die Epidemiologie von kulturpositiven Melioidosepatienten über einen Zeitraum von 5 Jahren in Ubon Ratchatani im Nordosten Thailands. Hier erkrankten etwa 2000-5000 Menschen jährlich, wobei die Inzidenzrate mit 4,4 Fällen auf 100.000 Einwohner angegeben wurde. Das Haupterkrankungsalter lag zwischen 40 und 60 Jahren, das Verhältnis von Mann zu Frau bei 3:2. 75% der Melioidosefälle traten während der fünfmonatigen Regenzeit auf, wobei Reisbauern und deren Familien prädisponiert waren. Während dieser Zeit ist *B. pseudomallei* bei allen ambulant erworbenen Septikämien der häufigste aus Blutkulturen isolierte Erreger (CHAOWAGUL et al., 1989).

2.1.3 Kulturcharakteristika und Diagnostik

B. pseudomallei ist ein ovoides, 0,4 µm dickes und < 2 µm langes gramnegatives Stäbchen. Das aerobe, begeißelte Bakterium kann sich mit Hilfe seiner bipolaren Flagellen fortbewegen, ist oxidase-positiv und vermag Nitrat zu Nitrit zu reduzieren (LEELARASAMEE et al., 1989). Seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei ca. 37 °C, das Bakterium toleriert jedoch auch sowohl höhere (bis zu 42 °C), als auch niedrigere Temperaturen (bis 5 °C) und schlechte Wachstumsbedingungen (YABUUCHI et al., 1993). *B. pseudomallei* wächst auf zahlreichen Nährböden, wie z.B. Schafblutagar oder MacConkey-Agar, sowie in verschiedenen Flüssigmedien. Nach einer Übernacht-Inkubation auf Schafblutagar bei 37 °C erscheinen beim Wildtyp runde Kolonien von 1-2 mm Durchmesser. Die Morphologie der einzelnen Kolonien variiert je nach Stamm von glatt und schleimig bis rau, uneben und faltig. Die Pigmentierung reicht von graubraun-gelb bis hin zu grau-weißlich und metallisch glänzend. Typisch für *B. pseudomallei* ist der erdig-muffige Geruch und die α -Hämolyse auf Schafblutplatten.

Die vielgestaltige Manifestation der Melioidose macht eine rein klinische Diagnostik dieser Krankheit unmöglich. Der Keim kann aus Materialien wie Blut, Speichel oder Urin isoliert werden. Die mikroskopische Untersuchung eines gramgefärbten Ausstriches zeigt allerdings lediglich bipolar oder ungleichmäßig gefärbte gramnegative Stäbchen, was weder spezifisch noch sensitiv ist. Zur sicheren Isolierung und Identifizierung bietet sich das von L. R. ASHDOWN beschriebene Selektivmedium mit Gentamicin-Zusatz an. Auf diesem nimmt *B. pseudomallei* nach 48 h seine typische Morphologie und seinen charakteristischen Geruch an. Die Gentamicin- und Colistinresistenz von *B. pseudomallei* sichert dabei die Diagnose ab. Diese Kultivierungsmethode ist in endemischen Gebieten immer noch die Methode der Wahl, da sie relativ einfach und kostengünstig durchzuführen ist. Ihr Hauptnachteil ist jedoch die lange Zeitspanne, bis sich die charakteristische Koloniemorphologie entwickelt. Ein weiteres, relativ einfach durchzuführendes Nachweisverfahren ist der biochemische API 20NE-Kit (DANCE et al., 1989), der jedoch ebenfalls erst nach 48 h zu einer sicheren Diagnose führt. Aufgrund der häufig fatalen Verlaufsform der septischen Melioidose innerhalb der ersten 24-48 h und einer daher notwendigen schnellen und effektiven Therapie, ist eine rasche und zuverlässige Diagnostik jedoch wichtig und oftmals lebensrettend. Hierfür kommen mittlerweile mehrere mögliche diagnostische Methoden in Frage: ein direkter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test mit einer Sensitivität von 73% und einer Spezifi-

tät von 99%, mit dessen Hilfe innerhalb von zwei Stunden eine befriedigende Diagnose gestellt werden kann (WALSH et al., 1994). Des weiteren ermöglicht ein Latex-Agglutinationstest, basierend auf einem spezifischen monoklonalen Antikörper (3015) gegen das Exopolysaccharid (EPS) von *B. pseudomallei*, eine schnelle und mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% auch eine zuverlässige Diagnose (STEINMETZ et al., 1999). Dieser Test erkennt selektiv nur virulente, sogenannte "arabinosenegative"-Stämme, wohingegen avirulente, "arabinosepositive" *B. thailandensis*-Stämme (s.u.) nicht erkannt werden. Zudem wurden einige immunologische Assays zur Identifizierung von *B. pseudomallei*-Antikörpern aus Patientenmaterialien entwickelt. Viele dieser Methoden, wie z.B. ein indirekter Hämagglutinationstest (IHA), führen zwar zu einem schnellen Ergebnis, weisen allerdings eine geringe Spezifität bei Patienten auf, die in Endemiegebieten wohnen und stetigen Kontakt mit *B. pseudomallei* haben, da ein großer Teil der Bevölkerung positive Antikörpertiter aufweist. Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis von *B. pseudomallei*-DNA aus Patientenmaterial mittels PCR-Diagnostik (DHARAKUL et al., 1996). Die Entwicklung von spezifischen und sensitiven Nachweismethoden ist dringend erforderlich, um in potentiellen Endemiegebieten durch den Einsatz solcher Tests zu erfahren, ob und in welchem Umfang Infektionen mit *B. pseudomallei* bei der Bevölkerung vorkommen.

2.1.4 Virulenzfaktoren bei *B. pseudomallei*

B. pseudomallei besitzt eine Vielzahl von Faktoren, die evtl. zur Virulenz beitragen könnten, aber die genaue Rolle eines jeden davon im natürlichen Infektionsgeschehen ist bisher noch unklar. Für die Entwicklung von Vakzinestrategien und verbesserten Therapieformen sind Kenntnisse über die Pathogenese der Erkrankung und Virulenzfaktoren von *B. pseudomallei* jedoch von großer Bedeutung. PERRY et al. (1995) charakterisierten die Struktur des von *B. pseudomallei* exprimierten Lipopolysaccharids (LPS) und beschrieben zwei sich in ihrer chemischen Struktur unterscheidende Seitenketten, O-PS I und O-PS II. Drei Jahre später fanden DeSHAZER et al. (1998) mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen die O-PS II-Seitenkette heraus, dass diese bei serumsensitiven *B. pseudomallei*-Transposonmutanten fehlte. Stämme, die beide Seitenketten aufwiesen, waren dagegen serumresistent. Dieses Ergebnis konnte im Tier-

versuch bestätigt werden, da auch hier die Mutanten attenuierter waren als der Wildtyp, der beide Seitenketten des Lipopolysaccharids exprimiert. Die O-PS II-Seitenkette scheint somit einen Beitrag zur Virulenz und Serumresistenz von *B. pseudomallei* zu liefern. Weiterhin wurde von STEINMETZ et al. (1995) ein auf der bakteriellen Oberfläche exprimiertes Exopolysaccharid (EPS) von *B. pseudomallei* beschrieben, bei dem es sich um eine aus Galaktose und Ketodesoxyoctonsäure bestehende "tetrasaccharide repeating unit" handelt (NIMTZ et al., 1997). Exopolysaccharide, auch Kapselpolysaccharide genannt, stellen bei vielen grampositiven und gramnegativen Bakterien Virulenzfaktoren dar, die in der Lage sind, pathogene Bakterien vor den Angriffen des Immunsystems zu schützen (STEINMETZ et al., 2000). Untersuchungen zeigten, dass *B. pseudomallei* zusätzlich noch ein zweites Exopolysaccharid synthetisieren kann, an dessen Strukturaufklärung jedoch noch gearbeitet wird. Seit einiger Zeit wurde die Bedeutung toxischer Exoprodukte von *B. pseudomallei* für die Virulenz des Bakteriums diskutiert. 1998 gelang HÄUSSLER et al. der Nachweis, dass *B. pseudomallei* ein zytotoxisches Exolipid produziert. Hierbei handelt es sich um ein Rhamnolipid, welches in der Lage ist, Makrophagen und andere Zellen zu lysieren und in niedrigeren Konzentrationen den programmierten Zelltod (Apoptose) zu induzieren. Die genaue Rolle dieses Rhamnolipids im Infektionsgeschehen muss jedoch noch geklärt werden. Als weitere potentielle Virulenzfaktoren werden diskutiert: ein hitzelabiles letales Exotoxin (HECKLY, 1964), sowie verschiedenen Enzyme wie Proteasen (GAUTHIER et al., 2000), Hämolyse, Lipasen und Lecithinasen (ASHDOWN et al., 1990). Das intrazelluläre Überleben von *B. pseudomallei* in Phagozyten (JONES et al., 1996) trägt vermutlich zur Pathogenität des Bakteriums bei und erklärt auch die langen Latenzzeiten von bis zu 26 Jahren, sowie die Tendenz zu Rezidiven. HOPPE et al. (1999) konnten durch mehrmalige Passagen in Laborieren eine Virulenzsteigerung bei *B. pseudomallei* nachweisen.

Aus dem Erdreich Thailands konnten zwei verschiedene Typen von *B. pseudomallei* isoliert werden, die zwar eine ähnliche Morphologie und Antigenität aufwiesen, sich aber in ihrer Fähigkeit, L-Arabinose zu assimilieren, unterschieden: einen virulenten, arabinosenegativen (Ara^-) Typ (*B. pseudomallei*) und einen avirulenten, arabinosepositiven (Ara^+) Typ (*B. thailandensis*). Bei schätzungsweise 25% aller Bodenisolat aus dem Nordosten Thailands handelt es sich um Ara^+ Stämme, aber nur die Ara^- gehen mit einer klinischen Manifestation der Melioidose einher. Den Ara^+ Stämmen, die bis vor kurzem noch zusammen mit den Ara^- Stämmen die Bakterienart *Burkholderia pseudomallei* bildeten, wurde mittlerweile unter der Bezeichnung *Burkholderia thailandensis* ein eigener Speziesstatus zuerkannt (BRETT et al., 1998). Anhand der Assi-

milation des Pentose-Zuckers L-Arabinose lässt sich somit eine zuverlässige Einteilung in virulente *B. pseudomallei*-Stämme und avirulente *B. thailandensis*-Stämme vornehmen (SMITH et al., 1997).

2.1.5 Verbreitung der Melioidose bei Tieren

STANTON und FLETCHER (1932) diagnostizierten als erste die Melioidose bei Tieren. Sie betrachteten die Krankheit als eine durch die Sekrete von Nagetieren übertragbare Zoonose. Später stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei *B. pseudomallei* um einen ubiquitären, saprophytischen Erreger handelt, der sowohl Tiere als auch den Menschen befallen kann. Das Spektrum der empfänglichen Tierarten ist sehr breit und reicht von Nagern, Hunden, Katzen Vögeln und Primaten über Schafe, Ziegen, Schweine, Rinder und Pferde bis hin zu Koalabären, Känguruhs, Kamelen, Pandabären und einzelnen Kaltblütern wie Krokodilen. Sogar bei Delphinen und Kilerwalen wurden in den letzten Jahren einzelne Fälle bekannt. Das Ausmaß und die Manifestation der Melioidose bei den verschiedenen Tierarten variiert dabei beträchtlich. Während z.B. in Australien Schafe, Ziegen und Schweine die am häufigsten infizierten Tiere sind, tritt die Melioidose bei Hunden, Katzen und Rindern extrem selten auf, und wenn, dann meist im Zusammenhang mit einer Immunsuppression (CHOY et al., 2000). Hühner und Wasserbüffel scheinen hingegen nur wenig empfänglich zu sein (SMITH et al., 1987). Von einer Infektion von Tier zu Mensch wurde bisher äußerst selten berichtet.

2.1.6 Klinische Manifestation und Pathogenese

Bei der Melioidose handelt es sich um eine Krankheit mit mannigfaltiger klinischer Manifestation, da praktisch alle Organe des Körpers betroffen sein können. *B. pseudomallei* ist ein Eitererreger, welcher lokalisierte Abszesse oder Granulome am Ort der Primärinfektion verursacht und eine Septikämie, wenn das Blutsystem betroffen ist. Die Inkubationszeit der Krankheit kann nicht genau definiert werden, aber in der Literatur wurden Zeiten von wenigen Tagen bis hin zu 26 Jahren beschrieben (LEELARASAMEE et al., 1989). Nach Eindringen des Erregers über eine Hautläsion kann sich ein kleiner Knoten in der Haut mit Lymphangitis und Lymphadenopathie der regionalen Lymphknoten ausbilden. Die Patienten sind febril und fühlen sich krank. Diese lokalisierte Infektion kann schnell in eine generalisierte, septikämische Form übergehen. Als Symptome treten Fieber, Verwirrtheit, Gelbsucht, Diarrhoe, Anämie sowie metastatische Abszesse in multiplen Organen auf (DANCE et al., 1990; LEELARASAMEE et al., 1989; HOWE et al., 1971). Trotz antibiotischer Therapie geht die septikämische Form häufig mit einer hohen Letalität einher. In endemischen Gebieten wie in Ubon Ratchatani im Nordosten Thailands macht die septische Form der Melioidose 60% der diagnostizierten Melioidosefälle und 40% der jährlichen Todesfälle aller außerhalb der Klinik erworbenen Septikämien aus (CHAOWAGUL et al., 1989). Die häufigste unter den lokalisierten Formen ist die pulmonale Melioidose, die durch eine Inhalation des Erregers zustande kommt. Pulmonale Symptome treten sehr schnell auf und reichen von der akuten Form mit hohem Fieber und Bronchitis bis hin zur chronischen Form mit ausgeprägter Kavernenbildung, gefolgt vom Auftreten viszeraler Abszesse. Da sie röntgenologisch der Tuberkulose ähnelt, wird sie häufig mit dieser bzw. mit Lungenabszessen, die durch andere Krankheiten hervorgerufen werden (z.B. Tularämie), verwechselt. Selbst histopathologisch ist die Melioidose aufgrund ihres ebenfalls z.T. granulomatösen Charakters nicht gut von einer Tuberkulose zu unterscheiden (PIGOTT et al., 1970). Ohne Behandlung tritt der Tod innerhalb weniger Tage ein. Die lokalisierte Melioidose manifestiert sich vor allem in Organen wie Leber und Milz; sie kann außerdem zu kutanen und subkutanen Abszessen, sowie zu Osteomyelitis, Lymphadenitis und Epididymo-Orchitis führen. Eine spezielle Form der lokalisierten Melioidose ist die akute eitrige Parotitis, die im Kindesalter auftritt und meist gesunde Kinder ohne immunschwächende Grunderkrankung betrifft (DANCE et al., 1989). Vermutlich durch eine orale Kontamination mit erregerehaltigem Material beim Spielen verursacht, treten die meisten

Fälle unilateral und in Form von parotitischen Abszessen auf. Hinzu kommen Fieber und eine schmerzhaftige Schwellung, die eine chirurgische Drainage notwendig machen.

Abgesehen von der akuten und chronischen Form der Melioidose gibt es noch die subakute Verlaufsform. Die subakute Melioidose ist gekennzeichnet durch dauerhafte febrile Krankheitssymptome, begleitet von multiplen Abszessen in diversen Organen. Zu einem späteren Zeitpunkt dieses Stadiums kann der Erreger aus Blut, Eiter, Urin und anderen Körpersekreten und -geweben isoliert werden (LEELARASAMEE et al., 1989; SMITH et al., 1987). Ohne Behandlung tritt der Tod innerhalb weniger Wochen oder Monate ein. Die meisten Infektionen mit *B. pseudomallei* verlaufen jedoch asymptomatisch und manifestieren sich nur durch eine Seroconversion. Diese subklinische oder chronische Form der Melioidose bleibt zumeist solange undiagnostiziert, bis sie durch andere immunschwächende Grunderkrankungen aktiviert wird. In Australien wurden von WOODS et al. (1992) einige Fälle einer neurologischen Melioidose beschrieben. Diese relativ seltene Verlaufsform ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Hirnabszessen und Enzephalitiden. Auch Meningoencephalitiden mit unterschiedlicher Beteiligung von Hirnstamm, Cerebellum und Rückenmark wurden beschrieben. Als Leitsymptome wurden Fieber und starke Kopfschmerzen genannt (WOODS et al., 1992; CURRIE et al., 2000).

Rezidive der Melioidose sind häufig und treten meist nach vermeintlich erfolgreicher Antibiotikatherapie auf. Die Mechanismen dieser Latenz und der Überlebensort von *B. pseudomallei* im Wirt sind noch weitgehend unbekannt. Die Auswirkungen einer Infektion hängen wahrscheinlich vom Immunsystem des Wirtes, der Virulenz des *B. pseudomallei*-Stammes und von der Größe sowie dem Infektionsweg des Inokulums ab. Eine Prädisposition für Melioidose ist eine geschwächte Immunabwehr des Wirtes, denn 50-70% aller Erkrankten leiden an einer sie für die Melioidose prädisponierenden immunschwächenden Grunderkrankung (CHAOWAGUL et al., 1989). Dazu zählen z.B. Diabetes mellitus, maligne Erkrankungen, Lebererkrankungen, chronische Nierenerkrankungen sowie Alkohol- und Drogenabusus. Aber auch eine Schwangerschaft oder eine immunsuppressive Therapie machen für eine Neuinfektion oder den Ausbruch einer latenten Infektion mit *B. pseudomallei* und der klinischen Manifestation der Melioidose anfällig (DANCE et al., 1991).

Einmal infiziert, entwickelt ein Großteil der Patienten eine wirksame Immunität. Über die spezifischen Immunmechanismen, die für die Abwehr verantwortlich sind, ist wenig bekannt. Patienten mit klinischer Melioidose zeigen in der Regel sowohl eine humorale als auch eine zelluläre

Immunantwort. Über 90% aller kulturpositiven Melioidose-Patienten haben nachweisbare IgG- und IgM-Antikörper während eines Stadiums ihrer Krankheit im Blut (SMITH et al., 1987).

2.1.7 Therapie und Prophylaxe

B. pseudomallei zeigt Resistenzen gegenüber einer Reihe von Antibiotika, insbesondere Aminoglykosiden und frühen β -Lactam-Antibiotika sowie Cephalosporinen der 1. und 2. Generation. Aufgrund dieser verschiedenen Resistenzen schlägt die bei der septikämischen Form der Erkrankung in den Tropen oft empirisch angewandte Kombinationstherapie von Penicillin und Gentamicin überhaupt nicht an (CHAOWAGUL et al., 1989). Bis Mitte der 80er Jahre wurde zur Behandlung der Melioidose häufig eine Kombination von Chloramphenicol, Doxyzyklin und Trimethoprim-Sulphamethoxazol verwendet. Studien haben jedoch gezeigt, dass die Sterblichkeit bei der akuten Melioidoseform durch die Anwendung neuerer β -Lactam-Antibiotika wie Ceftazidim oder Amoxicillin/Clavulansäure deutlich reduziert werden konnte (WHITE et al., 1989; SUPUTTAMONGKOL et al., 1994b). Daher ist momentan Ceftazidim das Mittel der Wahl und sollte in hohen Dosen von 120 mg/kg/Tag über 2-4 Wochen intravenös verabreicht werden. Allerdings sind mittlerweile auch hier Resistenzen beobachtet worden. Neuere Studien haben bewiesen, dass mit einer Therapie mit Carbapenemen (Imipenem, Meropenem), Amoxicillin/Clavulansäure oder Cefoperazon/Sulbactam + Trimethoprim-Sulphamethoxazol ebenfalls gute Erfolge erzielt werden können (CHAOWAGUL, 2000; VORACHIT et al., 2000; SMITH et al., 1994 u. 1996). Diese Antibiotika könnten somit bei Ceftazidim-resistenten Keimen eingesetzt werden. Aufgrund des langsamen Ansprechens auf die Antibiotikatherapie und auch um Rezidive zu vermeiden, die bei bis zu 23% aller Patienten trotz initialer Therapie vorkommen (CHAOWAGUL et al., 1993), sollte nach der parenteralen Behandlung auf jeden Fall oral weiterbehandelt werden. Dabei bietet sich eine Kombinationstherapie mit Chloramphenicol (40 mg/kg/Tag), Doxyzyklin (4 mg/kg/Tag) und Trimethoprim-Sulphamethoxazol (50 mg/kg/Tag) oder eine Therapie mit Amoxicillin-Clavulansäure (750 mg alle 8 h) über einen Zeitraum von 6 Wochen bis zu 6 Monaten an (CHAOWAGUL, 2000). Patienten mit septikämischer Melioidose benötigen für gewöhnlich eine intensivmedizinische Behandlung. Besondere Aufmerksamkeit

sollte der Korrektur des Flüssigkeitsverlustes, den respiratorischen und renalen Fehlfunktionen, sowie der Hyperglykämie oder der Ketoazidose geschenkt werden. Abszesse sollten nach Möglichkeit drainiert werden. Wichtig ist ein früher Beginn der antibiotischen Therapie, denn eine Verzögerung oder eine falsche Wahl der Antibiotika sind Faktoren, die zu einer erhöhten Mortalität führen können (CHAOWAGUL et al., 1989). Die Sterblichkeit bei der akuten Melioidose ist trotz optimaler Behandlung weiterhin hoch (ca. 40%). Patienten, die die Krankheit überleben, entwickeln teilweise eine chronische Erkrankung und bedürfen über einen langen Zeitraum intensiver Beobachtung, um Rückfälle zu vermeiden.

2.2 Infektionen mit *Burkholderia cepacia*

2.2.1 Taxonomie

B. cepacia wurde erstmals 1950 als Erreger der Zwiebelhäule (lateinisch: cepacia = zwiebelähnlich) unter dem Namen *Pseudomonas cepacia* beschrieben (BURKHOLDER, 1949). Lange Zeit ordnete man *B. cepacia* zunächst unter dem Namen *Pseudomonas multivorans* (STANIER et al., 1966), dann unter dem Namen *Pseudomonas kingii* (JONSSON, 1970) dem Genus *Pseudomonas* innerhalb der Familie der *Pseudomonadaceae* zu. 1981 führten PALLERONI u. HOLMES den Namen *Pseudomonas cepacia* wieder offiziell ein (PALLERONI u. HOLMES, 1981). Seit 1992 wird *B. cepacia* dem Genus *Burkholderia* zugeordnet (YABUUCHI et al., 1992). Diesem Genus gehören neben *B. cepacia* noch *B. gladioli*, *B. pseudomallei*, *B. caryophylli*, *B. plantarii*, *B. glumae*, *B. vandii*, *B. cocovenenans*, *B. vietnamiensis*, *B. thailandensis* und der Zoonoseerreger *B. mallei* an (GOVAN et al., 1996b; SEGONDS et al., 1999). *B. cepacia* umfasst mindestens sieben Genomovare (I-VII), die als "B. cepacia-Komplex" (GILLIS et al., 1995; VANDAMME et al., 1997; VANDAMME et al., 2000; COENYE et al.;) bezeichnet werden, und die z.T. bereits Speziesstatus erlangt haben. Neben den Genomovaren I, III und VI gehören folgende vier neue Spezies zum "B. cepacia-Komplex": *Burkholderia multivorans* (Genomovar II), *Burkhol-*

deria stabilis (Genomovar IV), *Burkholderia vietnamiensis* (Genomovar V) und *Burkholderia ambifaria* (Genomovar VII).

2.2.2 Epidemiologie und geographische Verbreitung

B. cepacia ist ein ubiquitäres Bakterium mit einer im Gegensatz zu *B. pseudomallei* weltweiten geographischen Verbreitung. Das Bakterium konnte aus dem Erdboden, verrottenden Baumstämmen, Oberflächengewässern und Wasserleitungen isoliert werden. BUTLER et al. (1995) wiesen *B. cepacia* in 12 von 55 Pflanzenproben eines botanischen Gartens nach. Der Keim kommt zwar nur mit geringer Frequenz in Nahrungsmitteln wie Milch, Salaten oder anderen Gemüsesorten vor, konnte aber von MORTENSEN et al. (1995) zu 18% im menschlichen Haushalt nachgewiesen werden. Ein Stamm konnte sogar von der National Aeronautics and Space Administration (NASA) aus einem Space Shuttle-Wassersystem isoliert werden (PYLE et al., 1994). Der Keim, der zunächst fast ausschließlich als pflanzenpathogen galt, wurde jedoch Ende der 80er Jahre als ein wichtiger Erreger bei nosokomialen Infektionen, bei chronischer Granulomatose und Cystischer Fibrose (syn.: Mukoviszidose) beschrieben. Eine sehr wichtige Infektionsquelle stellen Krankenhäuser dar, in denen der Keim insbesondere auf feuchten Oberflächen und Instrumenten, Blumenvasen oder wässrigen Lösungen häufig anzutreffen ist. HUMPHREYS et al. (1994) fanden durch Untersuchungen von Proben, die in der Wohnung von an Cystischer Fibrose (CF) erkrankten Patienten gewonnen wurden, heraus, dass eine Übertragung mittels Aerosolen ebenso möglich erscheint, wie die Verbreitung durch direkten sozialen Kontakt oder über kontaminierte Umweltgegenstände (SMITH et al., 1993; GOVAN et al., 1993; WHITEFORD et al., 1995). LEDSON et al. (1998a) beschrieben die Infektion einer gesunden Person mit *B. cepacia*. Die betroffene Patientin ist Mutter zweier Kinder, die beide CF-Patienten sind und in diesem Fall als Infektionsquelle angesehen werden müssen. In sanitären Einrichtungen findet eine Übertragung oft zusätzlich durch kontaminierte Anästhetika, Detergenzien, Desinfektionsmittel und Inhaliergeräte statt.

Besondere Bedeutung hat *B. cepacia* auf dem Gebiet der Landwirtschaft und Biotechnologie erlangt. Die Gründe für das steigende Interesse sind zum einen die Fähigkeit des Organismus,

das Pflanzenwachstum durch eine Antagonisierung der im Erdboden lebenden Pflanzenpathogene zu steigern. Dies ist besonders dann von Wichtigkeit, wenn geeignete Chemikalien für die Kontrolle dieser Pflanzenpathogene fehlen (JAYASWAL et al., 1991; McLOUGHLIN et al., 1992). Zum anderen produziert *B. cepacia* ein Pflanzenwachstumshormon (IAA, indole acetic acid) und kann atmosphärischen Stickstoff binden, der somit für den Gebrauch der Pflanzen zur Verfügung steht (BEVIVINO et al., 1994). Des Weiteren besitzt das Bakterium die Fähigkeit, Kohlenwasserstoffe und aromatische Verbindungen abzubauen, und somit eine Regeneration von kontaminiertem Erdboden und Wasser zu bewirken (BUTLER et al., 1995).

2.2.3 Kulturcharakteristika und Diagnostik

Die Vertreter des *B. cepacia*-Komplexes sind gramnegative, aerobe, begeißelte Stäbchenbakterien, die keine Sporen bilden. Die Länge beträgt 1,0-2,8 µm und die Breite 0,8 µm. Die Kolonien sind opak und von butterartiger Konsistenz nach 24-stündiger Bebrütung auf Standardmedium. Das Temperaturoptimum des Keims liegt bei 30 °C (BURKHARD, 1992). *B. cepacia* ist Urease-negativ und sowohl Katalase- als auch Oxidase-positiv. Wie alle *Burkholderia*-Arten ist auch *B. cepacia* nicht zur Fermentierung von Kohlenhydraten befähigt. *B. cepacia* besitzt die Fähigkeit, sich viele organische Komponenten als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zunutze zu machen. Der Keim ist in der Lage, sich in destilliertem Wasser und Desinfektionsmitteln zu vermehren (BLESSING et al., 1979; LIPUMA, 1998) und kann sogar Penicillin G verstoffwechseln.

Die klassische Bakteriologie mit der Anzucht von *B. cepacia* auf verschiedenen Nährböden und der mikroskopischen Beurteilung von Grampräparaten ist die Grundlage der weiterführenden Diagnostik. Der Nachweis aus Sputumproben oder Respirationstraktsekret von CF-Patienten ist schwierig, da die Kultur häufig von *P. aeruginosa* überwuchert wird (STABLEFORTH u. SMITH, 1994). Für *B. cepacia* existieren mehrere Selektivmedien, von denen 'Burkholderia cepacia-Selektivagar' (BCSA) am sensitivsten ist. Er hemmt das Wachstum eng verwandter Spezies durch den Zusatz von Polymyxin, Gentamicin und Vancomycin, Antibiotika, gegen die *B. cepacia* resistent ist (HENRY et al., 1997; HENRY et al., 1999). Kommerzielle Testsysteme

wie API 20NE differenzieren Bakterien anhand ihrer biochemischen Eigenschaften. Untersuchungen von SEGONDS et al. (1999) und VAN PELT et al. (1999) zeigten, dass dieser Test nur 51% bzw. 36% der von ihnen untersuchten Kulturisolate als positiv identifizierte. Deshalb sollte dieser Test nicht als einzige Methode für die Identifizierung eingesetzt werden (TAYLOR u. KALAMATIANOS, 1994). Die in den meisten Nachweisverfahren am häufigsten fälschlicherweise als *B. cepacia* identifizierte Spezies ist *B. gladioli* (SHELLY et al., 2000). Nachweise auf der Grundlage der Nukleinsäuren, insbesondere des 23S rRNA-Gens, ermöglichen eine sichere Unterscheidung zwischen *B. gladioli* und dem *B. cepacia*-Komplex (WHITBY et al., 2000). PCR-Analysen aus Bakterienkulturen sind speziesspezifisch (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000), so dass selbst *B. gladioli* zuverlässig klassifiziert und einer eigenen Gruppe zugeordnet werden kann. Kommerzielle, auf biochemischen Verfahren beruhende Testsysteme sind nicht in der Lage, zwischen den einzelnen Genomovaren des *B. cepacia*-Komplexes zu unterscheiden. LIPUMA et al. verglichen 1999 verschiedene Primerpaare auf ihre Eigenschaft, die Spezies des *B. cepacia*-Komplexes spezifisch zu identifizieren. Die Methode der Wahl ist mittlerweile eine Differenzierung mittels PCR auf der Grundlage des *recA*-Gens (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000). Die *recA*-PCRs für jedes Genomovar sind sehr spezifisch, erlauben jedoch aufgrund einer Kreuzreaktion keine Unterscheidung zwischen dem Genomovar VI und *B. multivorans* (HENRY et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit der molekularbiologischen Diagnostik besteht in der Anwendung der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismustechnik (RFLP), bei der nach Verdau mit Restriktionsenzymen und Gelelektrophorese spezifische Wanderungsmuster verglichen werden (SEGONDS et al., 1999; VAN PELT et al., 1999). Eine zuverlässige Abgrenzung des Genomovars VI von *B. multivorans* kann in diesem Fall mittels RFLP des 16 rRNA PCR-Produkts angestrebt werden (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; HENRY et al., 2001).

2.2.4 Virulenzfaktoren bei *B. cepacia*

Obwohl über die Pathogenese von *B. cepacia* bislang nur wenig bekannt ist, stehen eine Reihe von Virulenzfaktoren zur Diskussion. Der Mechanismus, mit dessen Hilfe *B. cepacia* den Respirationstrakt von CF-Patienten besiedelt, ist zwar noch nicht genau analysiert, jedoch ist die Ad-

häsion des Erregers an die Schleimhautepithelien der erste Schritt der Kolonisation. Die Fimbrien auf der Oberfläche von *B. cepacia* scheinen dabei ein Anhaften zu erleichtern (KUEHN et al., 1992; NELSON et al., 1994). SAIMAN et al. (1990) fanden heraus, dass die Adhäsionsrate von *B. cepacia* an die Epithelzellen des Respirationstraktes durch Wechselwirkungen mit dem, meist ebenfalls bei CF-Patienten anzutreffenden Keim *P. aeruginosa* noch erhöht werden kann, indem dessen Exoprodukte die Zelloberflächen verändern und Rezeptoren freisetzen.

Die Produktion von Siderophoren befähigt Bakterien dazu, mit den eisenbindenden Proteinen des Wirtes um freies Eisen zu konkurrieren und ist mit der Fähigkeit verschiedener Bakterien korreliert, Infektionen zu etablieren. *B. cepacia* exprimiert mindestens drei Siderophorvermittelte Eisentransport-Systeme, nämlich Pyochelin, Cepabactin und Azurechelin (SOKOL et al., 1986; SOKOL et al., 1992; MEYER et al., 1989), wobei dem Pyochelin bei der klinischen Manifestation der *B. cepacia*-Infektion bei CF-Patienten die größte Bedeutung zugeschrieben wird.

B. cepacia produziert ein Reihe von extrazellulären Komponenten, wie Protease, Gelatinase, Hämolyisin, Lipase und Exopolysaccharide, deren Bedeutung als mögliche Virulenzfaktoren jedoch noch nicht geklärt ist (McKEVITT et al., 1984; NAKAZAWA et al., 1987; CERANTOLA et al., 1996). STARR et al. (1941) und LONON et al. (1988) fanden heraus, dass Lipasen, insbesondere Phospholipasen, möglicherweise eine wichtige Rolle im Infektionsgeschehen von *B. cepacia* spielen. Bei der Phospholipase C handelt es sich um ein Enzym, welches Phosphatidylcholin, ein wichtiges Lungen-Surfactant, in Phosphorylcholin und Diacylglycerol spaltet. Als weitere, häufig bei CF-Isolaten anzutreffende Faktoren werden genannt: Produktion von Katalase, Ornithin-Decarboxylase, Valin-Aminopeptidase, C14-Lipase, Alginase und Trypsin, Hydrolyse von Harnstoff und Xanthin und vollständige Hämolyse auf bovinen Blutzellen. Aber auch hier ist die Bedeutung dieser Faktoren bei der Kolonisation des Respirationstraktes und dem Infektionsgeschehen von CF-Patienten noch unklar (GESSNER et al., 1990).

McKENNEY et al. (1995) wiesen im Zusammenhang mit den von *B. cepacia* gebildeten Exoprodukten ebenfalls auf eine Wechselwirkung mit *P. aeruginosa* hin. So konnte durch den Einfluss von *P. aeruginosa* bei *B. cepacia* ein signifikanter Anstieg von Siderophoren, Lipasen und Proteasen festgestellt werden, was die Vermutung einer Signalübertragung zwischen mikrobiellen Pathogenitätserregern verschiedener Spezies nahe legt.

Weiterhin wird diskutiert, ob *B. cepacia* eventuell intrazellulär in den Phagozyten der Lunge oder den Epithelzellen des Respirationstraktes überleben kann (BURNS et al., 1996; MARTIN et al., 1999;). Für diese Theorie sprechen die chronische Besiedlung der Lunge trotz Antibiotikaempfindlichkeit und die enge Verwandtschaft zum fakultativ intrazellulären Erreger *B. pseudomallei* (GOVAN et al., 1996b). Die Invasivität und das intrazelluläre Überleben von *B. cepacia* scheinen eine wichtige Rolle bei der Umgehung der Immunantwort des Wirtes und bei der Etablierung einer persistenten Infektion bei CF-Patienten zu spielen.

Ebenfalls von Interesse ist die Frage, auf welche Weise die Produktion der Virulenzfaktoren geregelt wird. Ebenso wie viele andere gramnegative Bakterien reguliert auch *B. cepacia* die Produktion extrazellulärer Virulenzfaktoren mit Hilfe eines als "Quorum Sensing" bezeichneten und von der Zelldichte abhängigen Mechanismus (LEWENZA et al., 1999). Dieser beinhaltet die Produktion diffundierbarer N-Acyl-Homoserin-Lactone, die auch als "Autoinducer" bezeichnet werden. LEWENZA et al. (1999) untersuchten *B. cepacia*-Transposonmutanten mit einer Insertion im *cepI*- und *cepR*-Gen und fanden heraus, dass diese "Autoinducer-negativen" Mutanten in ihrer Virulenz attenuiert waren, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Gene an der Regulation der Virulenzfaktorproduktion von *B. cepacia* wesentlich beteiligt sind.

2.2.5 Klinische Manifestation und Pathogenese

Der erste Bericht der Infektion eines CF-Patienten mit *B. cepacia* stammt aus dem Jahr 1977 (LARAYA-CUASAY et al., 1977; GOLDMANN u. KLINGER, 1986; STABLEFORTH u. SMITH, 1994; JOHN et al., 1994; GOVAN et al., 1996b; SCHÜRMAN u. REINHARDT, 1996). Patienten mit CF besitzen einen erblichen Defekt der Chloridionenkanäle. In der Lunge wird zähes Sekret gebildet, das die Atemwege verlegt und zu einer gestörten mukoziliären Clearance führt. Dies bildet den Nährboden für die bakterielle Besiedlung mit *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* im früheren Krankheitsstadium, sowie den am häufigsten isolierten Organismen *P. aeruginosa* und *B. cepacia* (GOVAN u. DERETIC, 1996a) im späteren Krankheitsstadium. Die Besiedlung mit *B. cepacia* beschränkt sich im Allgemeinen auf einen einzigen Stamm (LEDSON et al., 1998b). Die meisten der isolierten Stämme gehören dem Ge-

nomovar II oder III an (VANDAMME et al., 1997). Die Besiedlung der Lunge von CF-Patienten mit *B. cepacia* manifestiert sich in drei unterschiedlichen Verlaufsformen: es kommt entweder zu einer asymptomatischen Besiedlung der Lunge, zu einem chronischen, langsam fortschreitenden Lungenversagen oder zu einer akut verlaufenden, fatalen, nekrotisierenden Pneumonie, dem sogenannten "Cepacia-Syndrom" (ISLES et al., 1984; GOVAN et al., 1996b), welches von Fieber und häufig auch von einer Bakteriämie begleitet wird und meist innerhalb eines Jahres zum Tod führt. Dieses Phänomen wird nur in Zusammenhang mit *B. cepacia* genannt, andere CF-Pathogene scheinen keine Rolle zu spielen. Die Prognose für die Patienten ist in jedem Fall schlecht.

2.2.6 Therapie und Prophylaxe

Zur Zeit existiert für Mukoviszidose-Patienten keine Therapie, die die Lunge dauerhaft von der Besiedlung mit *B. cepacia* befreit. Ein Grund hierfür sind die ausgedehnten Antibiotikaresistenzen des Bakteriums, die meist von Stamm zu Stamm variieren. Diese werden durch Enzyme (β -Lactamase, Cephalosporinase) und die Undurchlässigkeit der Zellwand vermittelt. Das Auftreten einer Ionenpumpe, die amphipatische Antibiotika aus der Zelle ausschleust, bedingt die Resistenz gegenüber Tetracyclin und Chloramphenicol (HANCOCK, 1998). *B. cepacia*-Isolate aus Sputum sprachen gut auf Temocillin und Meropenem an. Die besten Ergebnisse wurden mit der Kombination Meropenem-Ciprofloxacin erzielt (BONACORSI et al., 1999). RICHARDS et al. (1998) empfehlen für die Therapie eine Kombination aus Ciprofloxacin und Trimethoprim-Sulfonamid. Die wichtigste begleitende Therapiemaßnahme ist eine konsequente Bronchialtoilette. Im Krankenhaus müssen mit *B. cepacia* kolonisierte CF-Patienten unbedingt von nicht infizierten isoliert werden, um deren Besiedlung zu verhindern.

2.3 *Caenorhabditis elegans*

2.3.1 Vorkommen und Bedeutung in der biologischen Grundlagenforschung

C. elegans gehört zu den Nematoden und repräsentiert damit eine weitverbreitete Tierklasse, die derzeit ca. 20.000 Arten umfasst. Er ist nur etwa 1 mm groß und kommt freilebend in den meisten gemäßigten Zonen der Erde vor. Er lebt im Erdreich und ernährt sich als nicht-parasitärer Nematode von den dort vorkommenden Mikroorganismen. In Bezug auf seine Umweltbedingungen ist *C. elegans* relativ anspruchslos, da er für Wachstum und Reproduktion lediglich feuchte Umgebung, gemäßigte Temperaturen, atmosphärischen Sauerstoff sowie Bakterien als Nahrungsquelle benötigt. Zwei Stämme haben historische Bedeutung. Der erste Stamm, Bergerac, wurde von Victor Nigon von der Universität in Lyon aus dem Erdboden in Frankreich isoliert; der zweite Stamm, Bristol, von L.N. Staniland aus Pilzabfällen in der Nähe von Bristol, England.

Seit der britische Molekularbiologe Sydney Brenner in den 60er Jahren *C. elegans* als Modellorganismus einführte, stieg das wissenschaftliche Interesse, begründet durch die vielen Vorteile des Wurmes als Modellsystem in der biologischen Grundlagenforschung. So war *C. elegans* der erste multizelluläre Organismus, dessen Genom bereits 1998 vollständig sequenziert war. Die vorliegende Sequenz und die Möglichkeit, diese genetisch zu manipulieren, machen für die Aufklärung grundlegender biologischer Vorgänge auch ein Arbeiten mit definierten Wurmmutanten möglich. Die Sequenzierung hat gezeigt, dass mindestens 37% der 19.000 exprimierten Proteine von *C. elegans* Äquivalente im Menschen besitzen. So kann, trotz der großen evolutionären Distanz zwischen Mensch und Nematode, *C. elegans* als ein gültiges, auch auf den Säugetierwirt übertragbares Modell für infektionsbiologische Studien herangezogen werden. *C. elegans* kann, z.B. beim Screening von Bakterien zur Identifizierung von Virulenzfaktoren, als Vorstufe zum Mausmodell genutzt werden, was besonders aus tierschutzrechtlichen, aber auch aus Kostengründen von Vorteil ist. Die Entwicklung aller Zellen aus der Eizelle ist mittlerweile vollständig aufgeklärt. Neben einer kurzen Generationszeit (s. 2.4.3), die innerhalb weniger Tage eine umfangreiche Population entstehen lässt, ist vor allem die überschaubare Anatomie von großem Vorteil. Bereits *Drosophila melanogaster* besitzt mit ca. 100.000 Neuronen ein ungleich komplizierteres Nervensystem als *C. elegans* mit seinen 302 Nervenzellen. Unter Laborbedingungen

wachsen die Nematoden auf mit *Escherichia (E.) coli* beimpften Petriplatten, so dass der Platzaufwand aufgrund der geringen Größe minimal ist. Die Basistechniken mit *C. elegans* sind unkompliziert, und auch die Anschaffung (möglich über das Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, St. Paul, USA) und Haltung gestaltet sich kostengünstig. Im Bedarfsfall können die Würmer beliebig oft bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und selbst nach mehreren Monaten unbeschadet aufgetaut werden, wodurch die Stammhaltung stark vereinfacht wird. Da *C. elegans* unter mikroskopischer Betrachtung transparent erscheint, können auch Abläufe innerhalb des Wurmes ohne großen Aufwand untersucht werden. Als multizellulärer Organismus mit komplexen Strukturen (z.B. Nerven) und Verhaltensweisen (z.B. Bewegung, sensorische Wahrnehmung) ist er ein geeigneter Modellorganismus für die Studie von Entwicklung und Verhalten.

2.3.2 Anatomie

Bei *C. elegans* unterscheidet man zwei Geschlechter: Hermaphroditen (XX), die sowohl Spermien als auch Eizellen produzieren und sich durch Selbstbefruchtung fortpflanzen, und männliche Würmer (X0). Diese bilden nur Spermien und müssen sich zum Zweck der Reproduktion mit den Hermaphroditen paaren. Nach der Begattung verdrängt das männliche Spermium das der Hermaphroditen und befruchtet die Eizelle, so dass der größte Teil der Nachkommen das Produkt dieser Kreuz-Fertilisation ist. Kreuz-Fertilisation produziert männliche Würmer und Hermaphroditen zu gleichen Teilen, wohingegen Selbst-Fertilisation fast ausschließlich Hermaphroditen hervorbringt (EMMONS u. STERNBERG, 1997). Aus diesem Grund besteht die Population des *C. elegans* N2-Wildtypstammes auch nur zu 0,2% aus männlichen Würmern (HODGKIN et al. 1979; MEYER 1997). Beide Geschlechter besitzen, mit Ausnahme des Reproduktionstraktes, die gleiche anatomische Grundstruktur. Mikroskopisch betrachtet erscheint der männliche Wurm etwas kürzer und schlanker als die Hermaphroditen.

Die Körperhöhle von *C. elegans* besteht aus einer einzelligen dickschichtigen Hypodermis, von welcher die die Wurmoberfläche umgebende Kutikula produziert wird (KRAMER, 1997). Unterhalb der Hypodermis ziehen vier aus Muskelzellen bestehende Bänder entlang des Wurmes nach subdorsal bzw. subventral (MOERMAN u. FIRE, 1997), durch deren abwechselnde Kon-

traktionen die sinusidalen Wurmbewegungen zustande kommen (DRISCOLL u. KAPLAN, 1997). Die 302 Nervenzellen der Hermaphroditen bzw. die 381 Nervenzellen der männlichen Würmer verteilen sich auf den circumpharyngealen Nervenring, den ventralen Markstrang, den dorsalen Nervenstrang und die Schwanzregion (RAND u. NONET, 1997); im Kopfbereich befinden sich zudem sensorische Zellen. Dieses Nervensystem koordiniert das Verhalten und die Reaktion auf Umweltreize, denn *C. elegans* vermag auf Temperaturunterschiede, sowie auf chemische und mechanische Stimuli zu reagieren.

Den größten Teil der inneren Organe, die von der Körperwand durch das flüssigkeitsgefüllte Pseudocoelom getrennt werden, nehmen Verdauungs- und Reproduktionstrakt ein. Die Körperform wird durch den internen hydrostatischen Druck aufrechterhalten, der jedoch mit zunehmender Lebensdauer nachlässt. Die Mundöffnung von *C. elegans* befindet sich am Kopfende, während der Anus der Hermaphroditen bzw. die Kloake der männlichen Würmer ventral nahe der Schwanzregion zu finden ist. Der Darmtrakt, bestehend aus Pharynx und Darmkanal, erstreckt sich vom Kopf bis hin zum hinteren Wurmende. Durch Muskelkontraktionen werden die Bakterien in den Pharynx befördert und im Mahlorgan ("Grinder") zerkleinert, um schließlich durch die Pharyngeal-Intestinal-Klappe in den Darm transportiert zu werden.

Die Geschlechter unterscheiden sich im Aufbau der Gonaden und der Schwanzregion. Die Gonaden der männlichen Würmer sind einlappig und die Spermien gelangen über die Samenblase und den Samenleiter in die Kloake nahe des Schwanzes. Die Hermaphroditen besitzen zweilappige Gonaden, die durch eine einzige Öffnung in den midventral bei der Vulva gelegenen Uterus münden (SCHEDL u. GREENWALD, 1997). Die Befruchtung der Eizellen findet in der zwischen Eileiter und Uterus befindlichen "Spermatheka" statt. Im Gegensatz zur einfach strukturierten Schwanzregion der Hermaphroditen kennzeichnet die männlichen Würmer ein für die Paarung erforderlicher und als Spikula bezeichneter hakenförmiger Anhang mit fingerförmigen Nervenfasern. Die Osmoregulation von *C. elegans* findet über ein exkretorisch-sekretorisches System statt, welches aus wenigen in der Körperwand lokalisierten Zellen besteht.

C. elegans zeichnet sich durch seine Zellkonstanz aus: die Hermaphroditen besitzen genau 959, die männlichen Würmer 1031 somatische Zellen, sowie eine nicht genau festgelegte Anzahl an Keimzellen. Die Chromosomen bestehen aus fünf Paar Autosomen, sowie zwei (Hermaphroditen) bzw. einem (männliche Würmer) Geschlechtschromosom(en).

2.3.3 Lebenszyklus und Entwicklung

Die Entwicklung von *C. elegans* wird unterteilt in eine prä- und eine postembryonale Phase. Die, auch als Embryogenese bezeichnete, präembryonale Entwicklung reicht von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der Larven. Die postembryonale Entwicklung erstreckt sich über vier Larvenstadien (L1 – L4), bis hin zur letzten Häutung, aus der der adulte Wurm hervorgeht. Die Entwicklung ist temperaturabhängig und variiert zwischen drei Tagen bei 25 °C und sechs Tagen bei 15 °C. Die Embryogenese dauert bei einer Temperatur von 20 °C 14 h; die Häutungen zwischen den einzelnen Stadien finden 29 h, 38 h, 47 h und 59 h post fertilisationem statt. Ein Unterschied zwischen den Larvenstadien und dem adulten Wurm besteht lediglich hinsichtlich der Größe. Ein geschlechtsreifer, adulter Wurm produziert über einen Zeitraum von vier Tagen bis zu 300 Nachkommen.

Unabhängig von den oben beschriebenen Entwicklungsstadien ist *C. elegans* unter bestimmten Umweltbedingungen in der Lage, ein alternatives Stadium zu bilden. Bei Nahrungsmangel bzw. bei zu hoher Populationsdichte entsteht nach der 2. Häutung anstelle der L3-Larve dieses sogenannte Dauerstadium (RIDDLE, 1997). Mikroskopisch betrachtet erscheinen die Würmer dieses Stadiums durch das Einschrumpfen der Hypodermis dünner und dichter als die 3. Larve (CASSADA u. RUSSEL, 1975, ALBERT u. RIDDLE, 1983) und sind resistenter gegenüber Umwelteinflüssen. Aufgrund ihres herabgesetzten Energiehaushaltes verhalten sie sich im allgemeinen ruhiger, wohingegen ihre Bewegungen nach Berührung jedoch hektischer werden, als die der anderen Stadien. Obwohl die Lebenserwartung von *C. elegans* nur maximal drei Wochen beträgt, bleibt das Dauerstadium selbst bei Nährstoffmangel bis zu zehnmal länger überlebensfähig (KLASS u. HIRSH, 1976). Bei einer Verbesserung der Umweltbedingungen häuten sie sich zur 4. Larve und setzen ihre normale Entwicklung fort.

2.4 *C. elegans*-Bakterium-Interaktionen

2.4.1 Bedeutung des *C. elegans*-Modells als Pathogenitätsmodell

Bisher scheiterten genetische Analysen der Interaktionen zwischen eukaryontischen Wirten und pathogenen Bakterienstämmen am Vorhandensein eines geeigneten Systems, mit dessen Hilfe sowohl der Wirt als auch das Bakterium kostengünstig und in großen Mengen genetisch gescreent werden können (TAN et al., 1999). Der eukaryontische Wirt sollte nach Möglichkeit ein Organismus wie der Nematode *C. elegans* sein, dessen gesamtes Genom bereits sequenziert und somit verfügbar ist. Ebenso wäre es von Vorteil, wenn auch die gesamte Genomsequenz des Bakteriums bekannt wäre, und der Bakterienstamm zudem Bedeutung als humaner Krankheitserreger hätte. Viele Virulenzfaktoren werden erst durch den Wirt induziert und können nur mit Hilfe von Techniken identifiziert werden, die den Wirt mit einbeziehen. Aus diesem Grund stellte die Gruppe um FREDERICK M. AUSUBEL im Januar 1999 ein Nematoden-Bakterien-Pathogenitätsmodell vor, welches sich mit den Einflüssen von *P. aeruginosa* auf *C. elegans* befasst (TAN et al., 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; TAN et al., 2000), und mit dessen Hilfe Interaktionen zwischen Virulenzfaktoren des Bakterienstammes und den Wirtsabwehrmechanismen analysiert werden können. *P. aeruginosa* besitzt die Fähigkeit Virulenzfaktoren zu produzieren, die Krankheiten in so unterschiedlichen Wirten wie Pflanzen, Nematoden und Säugetieren verursachen (TAN et al., 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; RAHME et al. 1995), so dass Vergleiche zwischen seinem Verhalten in den unterschiedlichen Wirtssystemen gezogen werden können. TAN et al. (1999, 2000) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) konnten mit ihrem *C. elegans*-Bakterien-Pathogenitätsmodell *P. aeruginosa*-Mutanten isolieren, die sowohl im *C. elegans*-, als auch im Mausmodell attenuiert waren. Diese Tatsache zeigt die Möglichkeit des Modells, Pathogenitätsmechanismen zu detektieren, die auch für den Säugetierwirt von Bedeutung sind.

Es sollte jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass das *C. elegans*-Bakterien-Modell einige Einschränkungen aufweist. So wird das Pathogenitätsmodell z.B. durch die Anzahl der Bakterien limitiert, die *C. elegans* unter Laborbedingungen infizieren können. Hierzu gehören *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *Salmonella* spp. (ABALLAY et al., 2000; LABROUSSE et al., 2000), *M. nematophilum*, *Bacillus megaterium*.

rium, sowie der Pilz *Drechmeria coniospora* (TAN et al., 2000). Zudem fehlt den Nematoden ein entwickeltes (adaptives) Immunsystem; die Aufgabe mancher Virulenzfaktoren besteht jedoch darin, die Immunantwort des Wirtes zu neutralisieren (FINLAY et al., 1999). Des Weiteren wird die Expression vieler Virulenzfaktoren im Säugetierwirt durch das Wirtsmilieu oder durch spezifische Wirtsmoleküle induziert, wobei die Temperatur (für gewöhnlich 37 °C) oftmals ein Schlüsselsignal ist. Man könnte somit einwenden, dass einige für Säugetiere relevante Virulenzfaktoren nicht im Nematoden exprimiert werden, da dieser bei Raumtemperatur gehalten wird. Bisherige Arbeiten mit *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Typhimurium* zeigten jedoch, dass Bakterienmutanten, die eine verminderte Virulenz im Wurmmodell aufwiesen, gleichzeitig auch im Mausmodell attenuiert waren (LABROUSSE et al., 2000; ABALLAY et al., 2000). Somit scheint das *C. elegans*-Bakterien-Modell trotz allem eine geeignete Methode zu sein, um die Interaktionen beider Organismen auf molekularer Ebene zu analysieren.

2.4.2 Auswirkung der Kulturbedingungen auf die *C. elegans*-Bakterien-Interaktionen am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa*

Das von der Gruppe um AUSUBEL vorgestellte Nematoden-Bakterien-Pathogenitätsmodell befasst sich mit den Einflüssen des *P. aeruginosa*-Stammes PA14 auf *C. elegans* (TAN et al., 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; TAN et al., 2000). In diesem Modell wurden zwei verschiedene Arten des Wurmsterbens, das sogenannte "slow killing" und das "fast killing", identifiziert. Diese unterschiedliche Absterbekinetik ist abhängig von der Auswahl der Kulturbedingungen. Die Tatsache, dass TAN et al. (1999, 2000) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) PA14-Mutanten isolieren und identifizieren konnten, die eine reduzierte Virulenz entweder im "slow"- oder im "fast killing" aufwiesen, legt nahe, dass bei beiden unterschiedliche Virulenzfaktoren aktiviert werden, und es sich somit um unterschiedliche Pathomechanismen handelt. Im Dezember 1999 wurde von DARBY et al. eine dritte Absterbekinetik ("letale Paralyse") beschrieben, die sich mit dem Einfluss des *P. aeruginosa*-Stammes PAO1 auf *C. elegans* befasst.

2.4.2.1 "Slow killing"

Dieser erste von TAN et al. (1999) beschriebene Mechanismus, mit dessen Hilfe der *P. aeruginosa*-Stamm PA14 *C. elegans* töten kann, ist gekennzeichnet durch ein langsames Wurmsterben innerhalb mehrerer Tage. Die Anzucht der Bakterien erfolgt auf Nematode-Growth-(NG)-Agar mit 0,35% Pepton. Bei dieser Absterbekinetik ist, im Gegensatz zum "fast killing" (s. 2.4.2.2), die Aufnahme lebender Bakterien erforderlich, und adulte Würmer sind die für das "slow killing" empfindlicheren Stadien. Nach einer Expositionszeit von etwa 24 bis 48 h lässt die Motilität und die pharyngeale Pumpaktivität der Würmer allmählich nach, bis die Nematoden schließlich unbeweglich werden und sterben. In den meisten Fällen tritt bei den Würmern ein sogenannter Eiablagedefekt auf (TAN et al., 1999a), der gekennzeichnet ist durch die Anhäufung von Eiern im Uterus und das anschließende Schlüpfen der Embryonen innerhalb der Muttertiere. Untersuchungen mit *C. elegans*-Mutanten zeigten, dass dieser Eiablagedefekt zwar nicht die einzige Todesursache ist, dass er jedoch die Empfindlichkeit der Würmer für das "slow killing" erhöht. Durch Untersuchungen mit "green-fluorescent-protein" (gfp)-markierten PA14-Stämmen und Wurmmutanten wiesen TAN et al. (1999a) nach, dass dieser Absterbemechanismus bei *C. elegans* zu einem aktiven Infektionsprozess führt, der durch die Besiedlung und Akkumulation von pathogenen Bakterien im Verdauungstrakt der Nematoden gekennzeichnet ist.

2.4.2.2 "Fast killing"

Diese zweite von TAN et al. (1999a) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) beschriebene *C. elegans*-Absterbekinetik ist gekennzeichnet durch ein schnelles Wurmsterben innerhalb weniger Stunden. Als einer der wichtigsten Faktoren beim "fast killing" wurde die Osmolarität des zur Anzucht von *P. aeruginosa* PA14 verwendeten Pepton-Glucose-Sorbitol (PGS)-Mediums genannt. Je höher die Sorbitolkonzentration im Nährmedium ist, desto schneller wird *C. elegans* im "fast killing" getötet. Der zweite kritische Faktor, der sich auf die Absterbekinetik auswirkt, ist das Entwicklungsstadium der Würmer, da die L4-Larven, laut TAN et al. (1999a), wesentlich empfindlicher sind als die adulten Würmer. Die Geschwindigkeit, mit der das "fast killing" ab-

läuft, lässt annehmen, dass der Prozess eher durch diffundierbare Toxine als durch einen Infektionsprozess verursacht wird. Ein Nitrocellulose-Versuch, bei dem die Bakterien auf einem später zu entfernenden Filterpapier angezogen wurden, zeigte, dass ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Würmern nicht zwingend notwendig ist. Um die für das “fast killing“ verantwortlichen bakteriellen Virulenzfaktoren zu identifizieren, wurde von MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) ein Screening-Assay zur Isolierung und Identifizierung von attenuierten PA14-Mutanten entwickelt. Das Ergebnis zeigte, dass Phenazine, insbesondere Pyocyanin, eine für das Wurmsterben verantwortliche Toxinklasse repräsentieren (TAN et al., 1999a). Pyocyanin übt seinen toxischen Effekt über einen Mechanismus aus, der bei *C. elegans* zu oxidativem Stress führt. Bestimmte in Bezug auf oxidativen Stress empfindlichere Wurmmutanten sterben im “fast killing“-Assay schneller als Würmer des N2 Bristol-Wildtypstammes, so dass man sagen kann, dass die Resistenz bzw. Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress mit der Resistenz bzw. Empfindlichkeit gegenüber dem “fast killing“ korreliert. Da die Expression bakterieller Virulenzfaktoren durch verschiedene Umweltsignale reguliert wird, ist es denkbar, dass die Expression der für das “fast killing“ verantwortlichen Toxine durch hohe Osmolarität induziert wird. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass die höhere Sterberate unter Bedingungen erhöhter Osmolarität einzig aus der gesteigerten Expression einer Toxinklasse, den Phenazinen, resultiert. Eine Beteiligung der beiden bekannten Toxine hämolytische Phospholipase C und Exotoxin A konnte jedoch mit Hilfe von Untersuchungen an PA14-Mutanten ausgeschlossen werden (TAN et al., 1999a).

2.4.2.3 “Letale Paralyse“

Unabhängig von den beiden oben genannten Absterbekinetiken wurde 1999 von der Gruppe um DARBY anhand des Stammes PAO1 ein dritter Mechanismus beschrieben, mit dessen Hilfe *P. aeruginosa* *C. elegans* töten kann. Als Medium zur Anzüchtung der Bakterien diente in diesem Fall Brain Heart Infusion-Agar (BHI). Der Mechanismus ist gekennzeichnet durch eine bei den Würmern innerhalb von 4 h eintretende letale Paralyse. Innerhalb weniger Minuten kommt es zu einer Reduktion der pharyngealen Pumpaktionen, sowie zu einem Sistieren von Defäkation und Eiablage. Wurmbewegungen, sowohl spontane als auch induzierte, werden beschwerlicher

und sind oftmals begleitet von spasmodischen Zuckungen. Nach 4 h Bakterienexposition sind alle Würmer vollständig paralytisch. Die Geschwindigkeit dieses letalen Effektes legt nahe, dass der Tod vielmehr durch die Aktivität diffundierbarer Toxine, als durch ein Infektionsgeschehen verursacht wird. Diese Annahme konnten DARBY et al. (1999) durch den Nitrocellulose-Assay (s. 2.4.2.2) bestätigen. Weitere Untersuchungen mit *C. elegans*-Mutanten zeigten, dass die Produktion des bzw. der für die neuromuskuläre Paralyse verantwortlichen Toxine der Regulation zweier Quorum-Sensing-Systeme, LasR und RhIR, unterliegt. Durch die Analyse von PAO1-Mutanten konnten die Proteine Exotoxin A, Exoenzym S, Elastase, staphylolytische Protease, alkalische Protease, hämolytische Phospholipase C und nicht-hämolytische Phospholipase C als Verursacher der toxischen Aktivität ausgeschlossen werden. Die Mutagenisierung von *C. elegans* und die Auswahl im Assay resistenter Mutanten zeigten, dass das auch im Wirbeltier vorkommende Protein EGL-9, dessen Funktion bisher noch unbekannt ist, bei der Empfindlichkeit der Würmer für die letale Paralyse eine wichtige Rolle spielt.

Der von TAN et al. (1999) und MAHAJAN-MIKLOS (1999) im "slow"- und "fast killing" untersuchte und beschriebene *P. aeruginosa*-Stamm PA14 verursacht bei *C. elegans* keine letale Paralyse.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Dissertation sollte untersucht werden, ob es möglich ist ein *C. elegans* - Pathogenesemodell mit Bakterienspezies der Gattung *Burkholderia* zu etablieren, mit dessen Hilfe letztendlich bakterielle Virulenzfaktoren identifiziert und charakterisiert werden können. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf die Spezies *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* und *B. cepacia* gelegt. Es sollte untersucht werden, ob auch bei diesen Organismen, wie bereits bei *P. aeruginosa* beschrieben, abhängig von den experimentellen Bedingungen, unterschiedliche Absterbekinetiken bei den Nematoden beobachtet werden können. Der Einsatz von *C. elegans*-Mutanten sollte helfen, erste Informationen über dabei ablaufende, mögliche Mechanismen zu erlangen. Ziel war es auch, die experimentellen Bedingungen so zu definieren, dass die beobachteten Virulenzunterschiede der unterschiedlichen Bakterienspezies im Säugetier mit dem *C. elegans*-Modell korrelieren.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterien

3.1.1. Bakterienstämme

Tabelle 1: verwendete Bakterienstämme

Gattung	Spezies	Stamm	Herkunft
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	OP50	Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	P. Sunny 1 (gfp-markiert)	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, AG Steinmetz, Medizinische Hochschule Hannover
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	E 8 (Ara ⁻)	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (s.o.)
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	E 208 (Ara ⁻)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	E 213 (Ara ⁻)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	E 237 (Ara ⁻)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	E 202 (Ara ⁻)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>thailandensis</i>	E 201 (Ara ⁺)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>thailandensis</i>	E 27 (Ara ⁺)	s.o.

<i>Burkholderia</i>	<i>thailandensis</i>	E 232 (Ara ⁺)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>thailandensis</i>	E 217 (Ara ⁺)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>thailandensis</i>	E 211 (Ara ⁺)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>thailandensis</i>	E 205 (Ara ⁺)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	NCTC 7431 (Ara ⁻)	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>vietnamiensis</i>	5223	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>gladioli</i>	46897	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>multivorans</i>	208	s.o.
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	H111 (pUT-rfp)	Dr. L. Eberl, TU München
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	H111 m64 (pBBR-5-gfp)	Dr. L. Eberl, TU München

3.1.2 Kulturbedingungen

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden zunächst auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut oder auf LB (Luria-Bertani)-Platten mit Antibiotikazusatz bei 37 °C angezüchtet.

Bakterienvorkulturen wurden angelegt, indem 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37 °C für etwa 8 h im Schüttelinkubator bebrütet wurden. Für die jeweilige Fragestellung wurden die im Anhang aufgelisteten Antibiotika zu dem Medium hinzugegeben.

3.1.3 Keimzahlbestimmung

Die Bakterienzeldichte wurde durch Messung der optischen Dichte von Flüssigkulturen bei 650 nm (OD_{650}) im Photometer ermittelt. Die anschließende Keimzahlbestimmung pro ml Bakteriensuspension erfolgte anhand einer, für die jeweilige Bakterienspezies angelegten Eichkurve. Als Leerwert wurde unbeimpftes Medium eingesetzt.

3.1.4 Kulturkonservierung

Von allen verwendeten Bakterienstämmen wurden Tiefgefrierstammkulturen angelegt. Dazu wurde das Koloniematerial von über Nacht bewachsenen Agarplatten in 1 ml des entsprechenden Mediums mit 10% Glycerin eingerieben. Diese Stammkulturen wurden bei -70 °C konserviert und dienten als Ausgangsmaterial zur Anzucht der Stämme.

3.2 Basistechniken mit *Caenorhabditis elegans*

3.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Nematoden der Gattung *C. elegans* vom Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota, St. Paul, USA verwendet. Es wurde sowohl mit dem N2 Bristol Wildtyp-Stamm, als auch mit den definierten *C. elegans*-Mutanten *eat-1(ad427)IV*, *him-8(e1489)IV*, *fer-1(hc1ts)I*, *age-1(hx546)II* und *mev-1(kn1)III* gearbeitet. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um selbstbefruchtende Hermaphroditen (Anteil männlicher Würmer nur 0,2%), bei denen man vier Larvenstadien (L1 – L4) sowie den adulten Wurm unterscheidet. Lediglich die Mutante *him-8* weist mit 37% einen höheren Anteil an männlichen Würmern auf. Je

nach Fragestellung wurden synchronisierte Wurmpopulationen des gewünschten Entwicklungsstadiums verwendet.

3.2.2 Herstellung der bakteriellen Nahrungsquelle

Als bakterielle Nahrungsquelle für *C. elegans* diente sowohl auf den NGM (Nematode Growth Medium)-Agarplatten als auch in Flüssigkultur und in der Eipräparation der *E. coli*-Stamm OP50.

a.) *E. coli*- NGM-Agarplatten:

Der verwendete *E. coli*-Stamm OP50 wurde auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut bei 37 °C angezüchtet. Zur Beimpfung der NGM-Agarplatten wurde zunächst eine Vorkultur angelegt, indem eine Kolonie *E. coli* OP50 einer Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium resuspendiert wurde. Nach einer Inkubation von etwa 6 h im Schüttelinkubator bei 37 °C wurden jeweils 100 µl der Bakteriensuspension mit einem Drigalskispatel auf den NGM-Platten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über 24 h, die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur.

b.) *E. coli* OP50-Pellets für die Eipräparation:

Von einer *E. coli* OP50-Vorkultur wurden 100 µl in jeweils 4 x 500 ml frisches LB-Medium in großen Erlmeyerkolben gegeben und diese für 24 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden dann für 15 min bei 3000 g in der Beckman-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die abzentrifugierten *E. coli*-Pellets in einem Falcontube bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Übersetzen von *C. elegans* zur Erhaltung der Stockplatten

Es wurden verschiedene Methoden benutzt, um *C. elegans* von einer NGM-Stockplatte (Agarplatte mit einem Durchmesser von 5 cm, auf der *C. elegans* zur Stockerhaltung aufbewahrt wurde) auf andere Platten zu überführen.

a.) Agarstück-Methode:

Aus einer gut mit *C. elegans* besiedelten Agarplatte wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells ein kleines Agarstück herausgeschnitten und auf eine frisch mit *E. coli* OP50 beimpfte Agarplatte übersetzt, ohne dabei die Oberfläche der neuen Platte zu beschädigen. Je nach gewünschter Anzahl an Würmern auf der neuen Platte, wurde das Agarstück auf dieser belassen oder wieder entfernt.

b.) Wurmhaken-Methode:

Diese Methode wurde vor allem dann angewandt, wenn eine definierte Anzahl von Würmern übersetzt werden sollte. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde jeweils ein Wurm mit dem Wurmhaken aufgenommen und auf eine neue Platte übersetzt. Dazu wurde zunächst auf der Ausgangsplatte ein, dem gewünschten Entwicklungsstadium entsprechender Wurm ausgewählt, die Spitze des Wurmhakens unter Sichtkontrolle langsam gesenkt und der Wurm vorsichtig mit einer schaufelnden Bewegung auf dem Drahtende platziert. Da sich auf einer Platte, auf der die Würmer die Bakterien bereits verstoffwechselt hatten, das Anheben der Würmer sehr schwierig gestaltete, wurde zur Erleichterung dieser Technik zeitweise etwas *E. coli* OP50 mit dem Drahtende aufgenommen und anschließend der Wurm leicht von oben berührt. Dieser blieb an den Bakterien haften und konnte somit leichter übersetzt werden. Um einen am Wurmhaken befindlichen Wurm auf einer frischen Platte abzusetzen, wurde das Drahtende bis auf die Agaroberfläche gesenkt und dort solange gehalten, bis der Wurm nach Möglichkeit selbständig herunterkroch. Im Zweifelsfall wurde er vorsichtig vom Haken heruntergewischt. Der Platindraht des

Hakens war am Ende abgeflacht, um Löcher im Agar oder Verletzungen von *C. elegans* zu vermeiden. Beschädigungen der Oberfläche bieten den Würmern die Möglichkeit ins Innere des Agars zu kriechen, von wo aus sie nur noch schwer zu mikroskopieren und zu übersetzen sind. Der Draht wurde nach jedem Übersetzungsvorgang abgeflammt, um eine Kontamination zu verhindern.

c.) Übersetzungsfrequenz:

Die Häufigkeit, mit der die Würmer übersetzt wurden, hing davon ab, bei welcher Temperatur sie gehalten wurden und wofür sie eingesetzt werden sollten. Die Würmer auf den Stockplatten konnten mehrere Wochen ohne weitere Nahrungszufuhr gehalten werden, bevor sie neu übersetzt wurden. Um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, wurden diese mit Parafilm umwickelt und bei 20 °C im Nematodenschrank (Chromatographieschrank 2023, Mini Cold Lab, Fa. Pharmacia) aufbewahrt. Würmer, die für die Eipräparation angezüchtet wurden, mussten alle ein bis zwei Tage transferiert werden, um Platten mit vielen adulten Würmern und Eiern zu erhalten.

3.2.4 Reinigung kontaminierter Stockplatten

Um einer Kontamination der *C. elegans*-Stockplatten durch Hefen oder insbesondere Schimmelpilze vorzubeugen, wurde zu allen Agaransätzen Nystatin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Bei einer starken Verunreinigung mit Bakterien oder Hefen wurde die betroffene Platte mit einer Hypochlorit-Lösung (12%ig) behandelt. Das Hypochlorit zerstörte alle Kontaminanten, sowie alle Würmer mit Ausnahme ihrer Eier. Diese wurden anschließend auf eine frische NGM-Platte gegeben, auf der sich dann eine neue Wurmpopulation entwickeln konnte.

Eine auftretende Kontamination der Stockplatten mit Milben wurde behandelt, indem im Nematodenschrank ein Streifen Nexalotte (Wirkstoff: Chlorpyrifos 0,6 g /Streifen) aufgehängt wurde, der die Milben, nicht aber die Würmer, abtötete. Da eine Besiedlung mit Milben leicht zu einer

Durchmischung der Nematodenpopulationen führen kann, indem die Milben an ihren Beinen Wurmlarven und –eier von Platte zu Platte tragen, wurde das Nexalotte im Wurmschrank belassen und alle drei Monate erneuert.

3.2.5 Unterscheidung der einzelnen Entwicklungsstadien

Bei *C. elegans* unterscheidet man vier Larvenstadien (L1–L4) sowie den adulten Wurm. Es existieren zwei verschiedene Geschlechter: zum einen selbstbefruchtende Hermaphroditen, zum anderen männliche Würmer, die beim Bristol-Wildtypstamm N2 nur 0,2% der Gesamtpopulation ausmachen. Die adulten Hermaphroditen fallen durch ihre Eier enthaltenden Reproduktionsorgane auf, die zusammen mit dem Darmtrakt den größten Teil des Wurmes ausmachen. Ebenfalls kennzeichnend ist die Vulvaöffnung, die sich etwa in der Mitte der Ventralseite des Wurmes befindet. Bei den adulten männlichen Würmern fehlen die Eireihen, dafür findet man am hinteren Ende des Wurmes einen als Spikula bezeichneten, hakenförmigen Anhang.

Mit Ausnahme der 4. Larve, die durch einen ovalen weißen Fleck an der ventralen Körperseite auffällt, unterscheiden sich die Larvenstadien lediglich hinsichtlich ihrer Länge. Da die Entwicklung von *C. elegans* temperaturabhängig ist, wurden die Würmer bei 20 °C gehalten.

Da *C. elegans* maximal 1 mm groß wird, konnte eine Differenzierung der einzelnen Wurmstadien nur mikroskopisch stattfinden, bei 32-facher, 100-facher bzw. 200-facher Vergrößerung. Eine genaue Unterscheidung der Larvenstadien erfolgte durch Längenmessung der Würmer mit Hilfe eines Okulares mit integriertem Raster (CPLW 10x18, Zeiss). Hierbei wurde zu den in der Literatur angegebenen Zeitpunkten post fertilisationem (HOPE, 1999) die Länge der Würmer bestimmt (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Differenzierung der verschiedenen *C. elegans*-Entwicklungsstadien

Entwicklungsstadium	mittlere Körperlänge	Alter in h
mittlere L1-Larve	0,25 mm	20 h post fertilisationem
mittlere L2-Larve	0,35 mm	32 h post fertilisationem
mittlere L3-Larve	0,55 mm	42 h post fertilisationem
mittlere L4-Larve	0,85 mm	50 h post fertilisationem
Adulter Wurm	1,0 mm	65 h post fertilisationem

Tabelle 2 zeigt die Differenzierung der verschiedenen *C. elegans*-Entwicklungsstadien anhand ihrer Körperlänge, sowie die Zeitspanne, nach der das jeweilige Entwicklungsstadium erreicht ist.

3.2.6 *C. elegans*-Eipräparation

Da je nach Versuch unterschiedliche *C. elegans*-Stadien verwendet wurden, musste die Wurmpopulation in ihrer Entwicklung zunächst synchronisiert werden, so dass man Würmer derselben Entwicklungsstufe erhielt. Dies wurde mit Hilfe der Eipräparation erreicht. Zunächst wurde eine Wurmplatte mit vielen Eiern bzw. graviden Hermaphroditen ausgewählt und mit sterilem Wasser gespült, indem das Wasser mehrmals über die Platte pipettiert wurde. Die Flüssigkeit mit den heruntergespülten Würmern und Eiern wurde in einem 15 ml Falcontube gesammelt, wobei das Volumen mindestens 3,5 ml betragen musste. Falls nötig wurde mit sterilem Wasser aufgefüllt. In einem anderen Falcontube wurden 0,6 ml steriles Wasser, 0,5 ml Natriumhypochlorit (12%ig) und 0,4 ml 5 M NaOH miteinander vermischt und anschließend zu der Wurm suspension gegeben. Die Einwirkzeit betrug 10 min, wobei alle 2 min über mehrere Sekunden geschüttelt bzw.

gevoertext wurde, bis sich alle Würmer aufgelöst hatten. Die in der Flüssigkeit zurückgebliebenen Eier wurden gewaschen, indem sie für 30 s bei 1316,6 g in der Minifuge RF zentrifugiert wurden. Die überstehende Flüssigkeit wurde bis auf 0,1 ml verworfen, bevor wieder mit sterilem Wasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt wurde. Nach Wiederholung des Waschschrittes wurden die abzentrifugierten Eier in etwa 30 ml M9-Puffer in einen kleinen Erlenmeyerkolben überführt. Dazu kam eine Spatelspitze konzentrierte *E. coli* OP50-Pellets als Nahrungsquelle für die schlüpfenden *C. elegans*-Larven. Die Eipräparation wurde solange im Nematodenschrank bei 20 °C auf einem Schüttler gelagert, bis die Larven auf die gewünschte Größe herangewachsen waren.

3.2.7 Einfrieren und Auftauen von *C. elegans*

a.) Einfrieren von *C. elegans*:

Zum Einfrieren von *C. elegans* wurden zunächst Platten mit Würmern im geeigneten Stadium ausgewählt, da nur gehungerte L1- bis L2-Larven mit Erfolg eingefroren werden konnten. Die Würmer wurden zunächst mit Puffer A von den Platten heruntergespült, in einem Reagiergefäß gesammelt und 1 min bei 320 g in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser Waschschritt noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde 1 ml Puffer A mit Würmern aus dem Bodensatz mit 1 ml Puffer A + 20% Glycerin versetzt, durchmischt und in Einfrierröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials) überführt. Diese wurden 1 h bei Raumtemperatur gelagert und danach in einer Styroporkiste bei -20 °C langsam heruntergekühlt, bevor sie nach etwa 12 h endgültig in die -70 °C-Truhe überführt wurden.

b.) Auftauen von *C. elegans*:

Ein Einfrierröhrchen mit *C. elegans* wurde der -70 °C-Truhe entnommen und ca. 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Würmer mit 0,5 ml Puffer A verdünnt

und nach kurzem Schütteln erneut 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurden einige Tropfen vom Sediment mit den Würmern auf eine unbeimpfte NGM-Platte gegeben und nochmals mit einigen Mikrolitern Puffer A vermischt, um das noch vorhandene Glycerin zu verdünnen. Nachdem die Würmer anfangen sich zu bewegen, wurden sie noch einige Stunden bei Raumtemperatur gelagert und schließlich mit Hilfe eines Agarstückes oder des Wurmhakens auf eine mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM-Platte übersetzt.

3.3 Infektionsmodell

3.3.1 Durchführung der *C. elegans*-Assays

3.3.1.1 “Slow killing“-Assay auf NG (Nematode Growth)-Agar

Die im “slow killing“-Modell zu untersuchenden Bakterienstämme wurden zunächst auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut bei 37 °C angezüchtet. Anschließend wurde eine Vorkultur erstellt, indem eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium eingerieben wurde. Die Inkubation erfolgte im Schüttler bei 37 °C. Nach 8 h wurde die OD₆₅₀ der Bakteriensuspension gegen LB-Medium als Leerwert bestimmt und die Bakterienzeldichte errechnet. Die Bakteriensuspension wurde mit LB-Medium soweit verdünnt, dass die einzusetzende Suspension eine Konzentration von etwa 13.000 Bakterien pro ml hatte. Die für die entsprechenden Versuche erforderliche Anzahl an Platten wurde beimpft, indem von der Endverdünnung jedes Bakterienstammes 100 µl auf den Agar pipettiert und mit Hilfe eines Glasspatels gleichmäßig verteilt wurden. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden sie für 18 h bei 37 °C bebrütet. Zur Kontrolle der errechneten Bakterienkonzentration wurden alle Ansätze nochmals 1:10 verdünnt und davon 100 µl auf einer Columbia-Blutplatte ausplattiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten auf der Platte ausgezählt. Bei jedem Versuchsansatz wurde *E. coli* OP50 als Negativkontrolle eingesetzt.

Die mit den zu testenden Bakterien beimpften und über Nacht bei 37 °C inkubierten Platten wurden vor Versuchsbeginn noch etwa 6 h bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie mit Würmern besetzt wurden. Hierzu wurde aus einer Eipräparation mit Würmern des gewünschten Stadiums ein Aliquot, das ungefähr die erforderliche Anzahl an Nematoden (etwa 30-40) enthielt, auf den Bakterienrasen der Agarplatte pipettiert. Der Versuch begann mit dem Eintrocknen der Flüssigkeit und dem Freisetzen der Würmer. Dieser Zeitpunkt wurde als 0 h-Wert bezeichnet. Im Anschluss wurde mikroskopisch die auf jeder Platte befindliche Anzahl an Würmern bestimmt. Zur besseren Auszählbarkeit wurden die Platten vor Versuchsbeginn auf der Bodenunterseite mit einem Raster bestehend aus 20 Quadraten versehen. Je nach Fragestellung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Anzahl toter Würmer bestimmt und am Ende des Experimentes in Prozentangaben umgerechnet. Ob ein Wurm tatsächlich tot war wurde überprüft, indem er unter mikroskopischer Kontrolle mit dem Wurmhaken vorsichtig berührt wurde. Erst wenn keinerlei Reaktion mehr feststellbar war, wurde er als tot bezeichnet. Alle Versuche liefen entweder bei Raumtemperatur oder bei 20 °C ab.

3.3.1.2 "Fast killing"-Assay auf PGS (Pepton Glucose Sorbitol)-Agar

Der "fast killing"-Assay wurde analog zum "slow killing"-Assay durchgeführt. Abweichend wurde jedoch höher osmolares Medium, nämlich PGS (Pepton Glucose Sorbitol)-Agar eingesetzt.

3.3.1.3 Modifizierter "fast killing"-Assay auf GS (Glucose Sorbitol)-Agar

In den Grundzügen wurde auch der modifizierte "fast killing"-Assay nach dem Prinzip des "slow killing"-Assays durchgeführt. Abweichend hiervon wurden jedoch aus der 8 h-Bakterienkultur jeweils 400 µl unverdünnt auf den Versuchsplatten ausplattiert (entspricht in etwa einer Konzentration von $1,6 \times 10^8$ Bakterien/Platte), welche nach Eintrocknen der Flüssigkeit 18 h bei Raumtemperatur gelagert wurden. Als Medium wurde in diesem Assay GS (Glucose Sorbitol)-

Agar verwendet, also der gleiche Agar wie beim “fast killing“, jedoch abzüglich des Peptonanteils.

3.3.1.4 *C. elegans*-Assays auf anderen Testmedien

Als weitere zu untersuchende Medien wurden verwendet:

1. Acanthamöbenagar
2. NG (Nematode Growth)-Agar ohne Pepton
3. BHI (Brain Heart Infusion)-Agar

Während der Acanthamöbenagar-Assay analog zum modifizierten “fast killing“-Assay ablief, erfolgte die Durchführung des *C. elegans*-Assays auf peptonfreiem NG-Agar und auf BHI-Agar in gleicher Weise wie beim “slow killing“-Assay beschrieben.

3.3.2 Hitzeinaktivierung von Bakterien

Für den Assay mit hitzeinaktivierten Bakterien wurde zunächst Koloniematerial der zu untersuchenden Bakterienstämme von gut bewachsenen NG- bzw. PGS-Platten in 3 ml LB-Medium resuspendiert und anschließend 30 min im Wasserbad bei 80 °C erhitzt. Von dieser hitzeinaktivierten Bakteriensuspension wurden 400 µl auf der entsprechenden Versuchsplatte ausplattiert. Nach dem Eintrocknen der Flüssigkeit wurden die Platten mit Nematoden aus der Eipräparation besetzt und nach mehreren Stunden bzw. Tagen auf ein Wurmsterben hin kontrolliert. Um ein Wachstum des in der Eipräparation enthaltenen *E. coli* OP50 auf den Versuchsplatten zu verhindern, wurde diesen beim Gießen Carbenicillin in einer Konzentration von 200 µg/ml zugesetzt. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass den Würmern neben dem zu testenden Bakterienstamm kein kontaminierender *E. coli* als Futterquelle zur Verfügung steht. Der parallel ablaufende Assay mit vitalen Bakterien desselben Stammes erfolgte wie unter 3.3.1.1 bzw. 3.3.1.2 beschrieben.

3.3.3 Nitrocellulose-Assay

Der Nitrocellulose-Assay wurde durchgeführt, um die Auswirkung potentiell sezernierter Bakterientoxine auf *C. elegans* zu untersuchen. Hierzu wurde nach Anzucht der Bakterien auf den Versuchsplatten jeweils ein Nitrocellulosefilter mit einem Durchmesser von 4,7 cm und einer Porengröße von 0,45 µm auf den Bakterienrasen gelegt und anschließend eine entsprechende Anzahl an L4-Larven aus der Eipräparation auf den Filter pipettiert. Die Würmer durften dabei keinerlei Kontakt mit den Bakterien haben. Nach einer 24-stündigen Lagerung der Platten bei 20 °C wurden die Filter wieder heruntergenommen und jeweils auf eine unbeimpfte NGM-Platte gelegt. Die auf der Nitrocellulose befindlichen Würmer wurden dann mit 300 µl M9-Puffer heruntergespült und diese Spülflüssigkeit wiederum jeweils auf eine unbeimpfte NGM-Platte pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Flüssigkeit wurde die Anzahl der lebenden bzw. toten Würmer pro Platte bestimmt.

3.3.4 Modifizierter Nitrocellulose-Assay

Im modifizierten Nitrocellulose-Assay wurden die Bakterien direkt auf den Nitrocellulosefiltern (Durchmesser 4,7 cm, Porengröße 0,45 µm), die auf den entsprechenden Versuchsplatten lagen, angezüchtet. Hierzu wurden 100 µl aus einer Übernachtskultur auf dem Filter so verteilt, dass die Bakterien keinerlei Kontakt mit dem darunterliegenden Agar hatten. Anschließend wurden die Platten für 24 h bei 37 °C bebrütet. Nach Entfernen der Filter wurde eine entsprechende Anzahl an L4-Larven auf den zurückbleibenden Agar pipettiert, und zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde die Anzahl der lebenden bzw. toten Würmer bestimmt. Die Sterilität des Agars wurde überprüft, indem eine vom Agar genommene Tupferprobe auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und bebrütet wurde.

3.3.5 Durchführung eines Transferexperiments

Mit Hilfe des Transferexperiments sollte die, für ein effektives Wurmsterben erforderliche minimale Expositionszeit von *C. elegans* auf den zu untersuchenden Bakterienstämmen ermittelt werden. Hierzu wurde nach Anzucht der zu testenden Bakterien auf den Versuchsplatten L4-Larven in genügend großer Anzahl auf den Bakterienrasen pipettiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 20 °C im Nematodenschrank. Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten wurden von diesen Ausgangsplatten jeweils 20 Würmer mit dem Wurmhaken heruntergenommen und jeweils auf eine mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM-Platte mit Tetracyclin bzw. Gentamicin in einer Konzentration von 200 µg/ml überführt. Die Antibiotikazusätze sollten ein Wachstum von *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* bzw. *B. cepacia*, deren Koloniematerial den, von den Ausgangsplatten transferierten Würmern anhaftete, verhindern. Die auf den *E. coli* OP50-Platten befindlichen Würmer wurden bei 20 °C gelagert und in unterschiedlichen Zeitintervallen auf ein mögliches Sterben hin kontrolliert.

3.3.6 Mikroskopische Darstellung fluoreszenzmarkierter Bakterien im Wurmdarm

Hiezu wurde *C. elegans* bei 20 °C auf einer NG-Platte mit dem Bakterienstamm *B. cepacia* H111 (pUT-rfp) bzw. H111 m64 (pBBR-5-gfp) als Teststamm gehalten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde jeweils ein Wurm mit Hilfe des Wurmhakens von der Platte heruntergenommen, auf einem Objektträger in 20 µl Puffer A aufgenommen und vorsichtig mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Aufnahmen erfolgten mit einer am Mikroskop (Axioskop MC80DX, Model J2-21, Zeiss) installierten Kamera. Für die Aufnahmen gfp-markierter Bakterien wurde der 460 nm-Filter verwendet, für die Aufnahmen "red-fluorescent-protein" (rfp)-markierter Bakterien der 580 nm-Filter.

3.3.7 Lebendkeimzahlbestimmung im Verdauungstrakt von *C. elegans*

Mit Hilfe der “colony forming unit“ (CFU)-Bestimmung sollte die Bakterienzahl im Verdauungstrakt von *C. elegans* ermittelt bzw. eine eventuelle Bakterienreplikation untersucht werden. Die Keimzahlbestimmung wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt: der frühe Messwert wurde nach wenigen Stunden ermittelt, der spätere Messwert, welcher eine mögliche Bakterienreplikation zeigen sollte, nach mehr als 24 h. Die Würmer wurden zunächst bei 20 °C auf einer NG-Platte mit dem Bakterienstamm *B. cepacia* H111 bzw. H111 m64 als Teststamm gehalten. Mit Hilfe des Wurmhakens wurden nach einigen Stunden jeweils 30 Würmer von den beiden *B. cepacia*-Ausgangsplatten heruntergenommen und auf eine mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM-Platte mit Gentamicin in einer Konzentration von 200 µg/ml überführt. Zehn dieser Würmer (evtl. mehr, falls während des Waschschrilles Wurmverluste auftreten sollten) wurden für den frühen Messwert bereits nach 1 h von der *E. coli* OP50-Platte heruntergenommen, während die restlichen Würmer für den späteren Messwert noch für weitere 24 h bei 20 °C auf der *E. coli* OP50-Platte belassen wurden. Die von der Platte genommenen Würmer wurden in 1 ml M9-Puffer mit 200 µg/ml Gentamicin suspendiert und für 1 min bei 320 g in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Durch das Waschen der Würmer in antibiotikahaltigem Medium sollten eventuell außen anhaftende Bakterien abgetötet werden. Nach Verwerfen des Überstandes wurde mit frischem M9-Puffer ohne Antibiotikazusatz auf 1 ml aufgefüllt und der Waschschrill wiederholt. Um eine genaue Quantifizierung der Würmer vornehmen zu können, wurde der Bodensatz mit den Nematoden auf eine unbeimpfte NGM-Platte pipettiert, und nach Eintrocknen der Flüssigkeit wurden exakt 10 Würmer in 500 µl Puffer A + 0,5% Bovinem Serum Albumin mit 1% Tergitol überführt und mit dem Homogenisator zerkleinert. Die anschließende Verdünnung mit Puffer A erfolgte in 10er-Schritten, bis zu einer Verdünnung von 1:10⁴. Jeweils 100 µl des unverdünnten Ansatzes und jeder Verdünnungsstufe wurden auf *Cepacia*-Selektivplatten ausgeplattiert und diese für 48 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte durch Auszählung die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten pro Platte und die Errechnung der Bakterienzahl pro Wurmdarm. Mit zehn der noch auf der *E. coli* OP50-Platte befindlichen Würmern des späteren Messwertes wurde nach 24 h ebenfalls eine CFU-Bestimmung, wie oben beschrieben, durchgeführt.

3.3.8 Berechnung der $LT_{50\%}$

Die Ermittlung der $LT_{50\%}$, also der Zeitspanne, die nötig war, um 50% der Würmer eines Versuches zu töten, erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$y = (a - d) / (1 + (x / c)^b) + d$, wobei c die $LT_{50\%}$ darstellt. Für die Berechnungen wurde das Programm SIGMAPLOT (Version 5) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-*Burkholderia pseudomallei*-Pathogenitätsmodells

4.1.1 Unterscheidung der verschiedenen *C. elegans*-Entwicklungsstadien

Auf die genaue Differenzierung der einzelnen *C. elegans*-Entwicklungsstadien wurde bereits unter 3.2.5 sowie in Tabelle 2 eingegangen. Mit den unten aufgeführten Abbildungen sollen nochmals die optisch auffälligen Unterscheidungsmerkmale verdeutlicht werden.

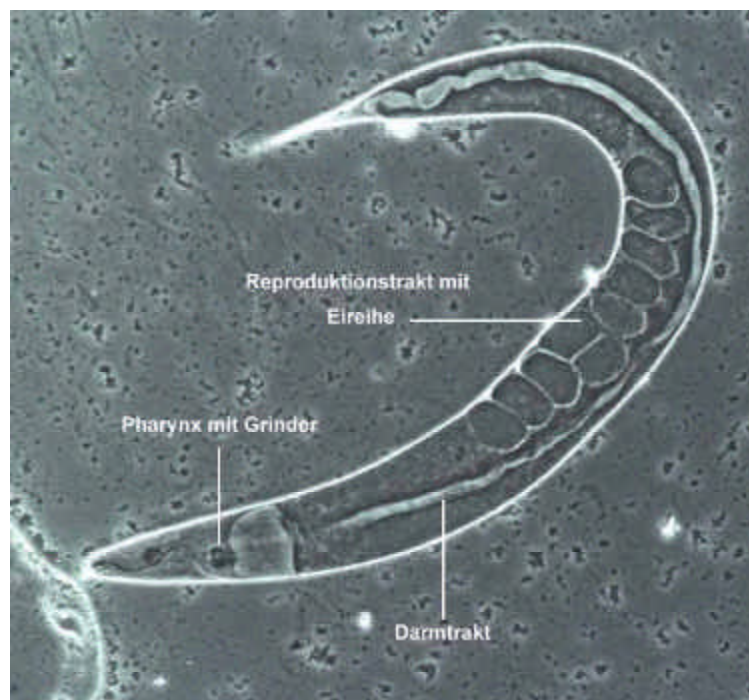


Abb. 1: adulter Hermaphrodit des *C. elegans*-Wildtyp-Stammes N2



Abb. 2: Größenvergleich zwischen adulten Hermaphroditen, L1-Larven und Wurmeiern auf einer, mit *E. coli* OP50 bewachsenen NGM (“Nematode Growth Medium“)-Platte

4.1.2 Charakterisierung des “slow killings“

4.1.2.1 Absterbekinetik unter Standardbedingungen

Um nachzuweisen, ob es auch bei dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (Ara^-) und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (Ara^+) ein, dem “slow killing“ bei *P. aeruginosa* PA14 vergleichbares Wurmsterben gibt (TAN et al. 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; TAN et al. 2000), wurde unter den bereits in der Literatur beschriebenen Bedingungen ein “slow killing“-Assay durchge-

führt (Abb. 3). Da ein konfluenter Bakterienrasen die, für eine exakte Berechnung der Sterberate erforderliche Auffindbarkeit der Würmer auf den Versuchsplatten erheblich erschwerte, wurden für den Großteil aller Versuche einzelne Bakterienkolonien (etwa 1.300 Bakterien/Platte) einem konfluenten Bakterienrasen vorgezogen.

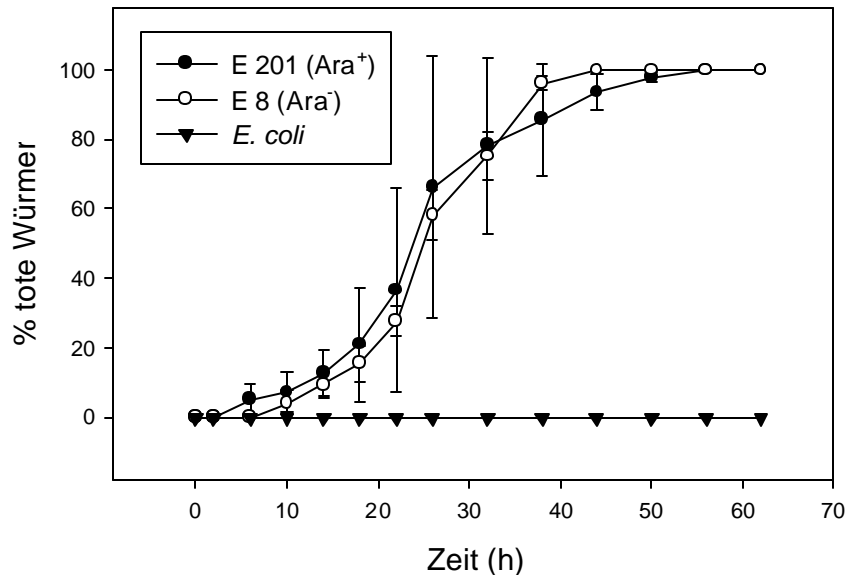
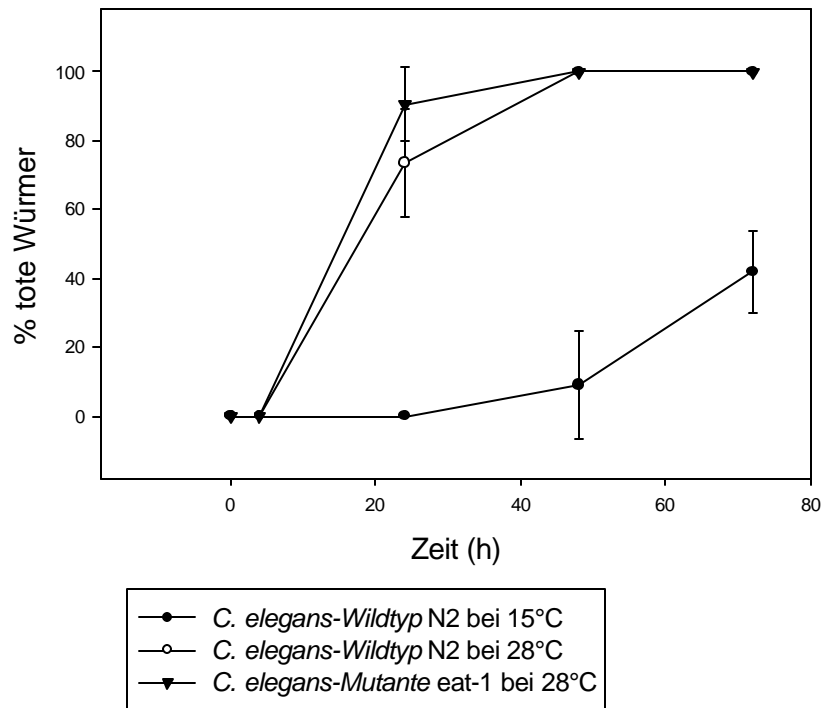


Abb. 3: Absterbekinetik von *C. elegans* unter Standard-“slow killing“-Bedingungen bei RT (Raumtemperatur) auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (Ara⁻) und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (Ara⁺), mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unterschiedlichen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl der toten Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem entsprechenden Bakterienstamm.

Die Untersuchung der beiden Stämme *B. pseudomallei* E 8 und *B. thailandensis* E 201 im “slow killing“-Assay zeigte in beiden Fällen ein Wurmsterben innerhalb von 2 Tagen, so dass das Kriterium des “slow killings“ erfüllt wurde (LT_{50%} von E 8 = 24 h; LT_{50%} von E 201 = 26 h). *E. coli* OP50 als Negativkontrolle tötete *C. elegans* nicht. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ara⁻ (virulenten) *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem Ara⁺ (avirulenten) *B. thailandensis*-Stamm E 201 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3).

4.1.2.2 Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik von *C. elegans* unter "slow killing"-Bedingungen auf den beiden Stämmen *B. pseudomallei* E 8 (Abb. 4A) und *B. thailandensis* E 201 (Abb. 4B) untersucht werden. Um sicherzustellen, dass nicht eine temperaturbedingte Frequenzänderung der Nahrungsaufnahme von *C. elegans* für eventuelle Unterschiede in den Absterbekinetiken verantwortlich ist, lief bei diesem Versuch neben dem *C. elegans*-Wildtyp-Stamm N2 auch die, in ihrer pharyngealen Pumpleistung herabgesetzte *C. elegans*-Mutante *eat-1* mit.

A

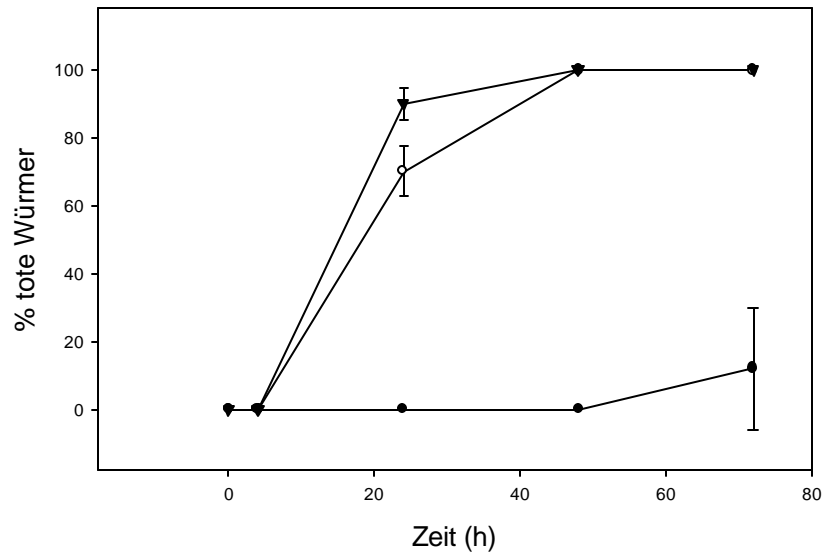
B

Abb. 4: Vergleich der *C. elegans* (Wildtyp N2 sowie *eat-1*-Mutante)-*B. pseudomallei*/*B. thailandensis*-Absterbekinetik unter “slow killing“-Bedingungen in Abhängigkeit von der Temperatur (15 °C bzw. 28 °C). Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (A) bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (B).

Es zeigte sich, dass beide Stämme den *C. elegans*-Wildtyp-Stamm N2 bei einer Versuchstemperatur von 28 °C wesentlich schneller töteten ($LT_{50\%} = 23$ h), als bei einer Temperatur von 15 °C (Abb. 4). Durch den Einsatz der *C. elegans*-Mutante *eat-1* sollte ausgeschlossen werden, dass eine herabgesetzte Pumpleistung des Pharynx für das verzögerte Wurmsterben bei 15 °C verantwortlich ist. Die Tatsache, dass die *C. elegans*-Mutante bei 28 °C mindestens genauso schnell getötet wurde, wie der *C. elegans*-Wildtyp, schließt dieses jedoch als Ursache aus.

4.1.2.3 Vergleich vitaler Bakterien mit hitzeinaktivierten Bakterien

Mit Hilfe des folgenden Versuches sollte geklärt werden, ob für das Wurmsterben unter "slow killing"-Bedingungen lebende Bakterien notwendig sind. Der *B. pseudomallei*-Stamm E 8 sowie der *B. thailandensis*-Stamm E 201 wurden zunächst auf NG ("slow killing")-Platten angezüchtet. Das Koloniematerial wurde anschließend in LB-Medium resuspendiert, bei 80 °C für 30 min hitzeinaktiviert und jeweils in einer Konzentration von $3,2 \times 10^8$ Bakterien auf NG-Platten gegeben. *C. elegans* wurde als adulter Wurm eingesetzt und bei einer Versuchstemperatur von 20 °C gehalten. Der Kontrollversuch erfolgte mit lebenden Bakterien unter Standard-"slow killing"-Bedingungen. Es stellte sich heraus, dass *C. elegans* auf den hitzeinaktivierten Bakterien innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 10 Tagen nicht getötet wurde und sich hochgradig vermehrte. Die Ergebnisse beziehen sich auf drei unabhängige Versuche mit jeweils etwa 40 Würmern pro Ansatz.

4.1.2.4 Vergleich adulter Würmer mit L4-Larven

TAN et al. (1999, 2000) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass die Absterbekinetiken des "slow"- und "fast killings" durch das eingesetzte Entwicklungsstadium von *C. elegans* beeinflusst werden. Während beim "slow killing" die adulten Würmer die sensitiveren waren, schienen dies beim "fast killing" die L4-Larven zu sein. Mit Hilfe des folgenden Versuches sollte geklärt werden, inwieweit sich auch beim *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und beim *B. thailandensis*-Stamm E 201 das Entwicklungsstadium von *C. elegans* auf den Ablauf des Wurmsterbens unter "slow killing"-Bedingungen auswirkt (Abb. 5).

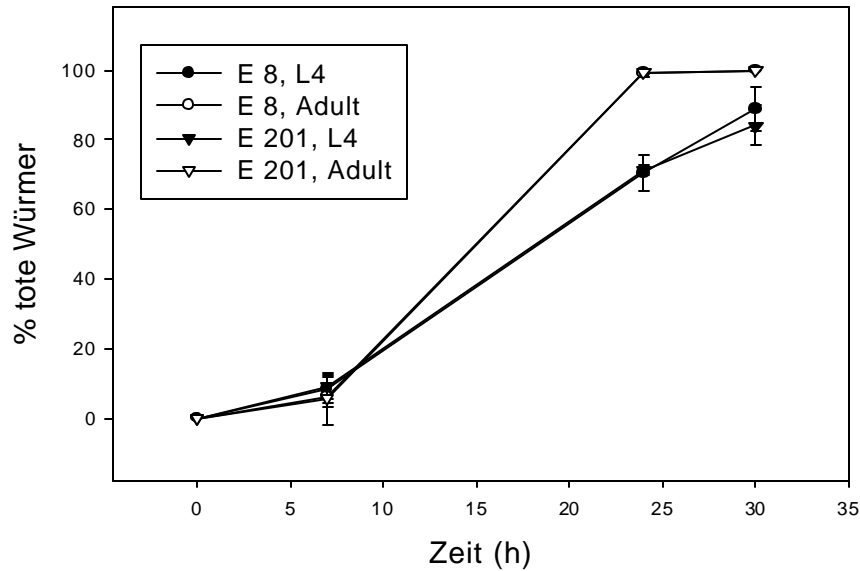
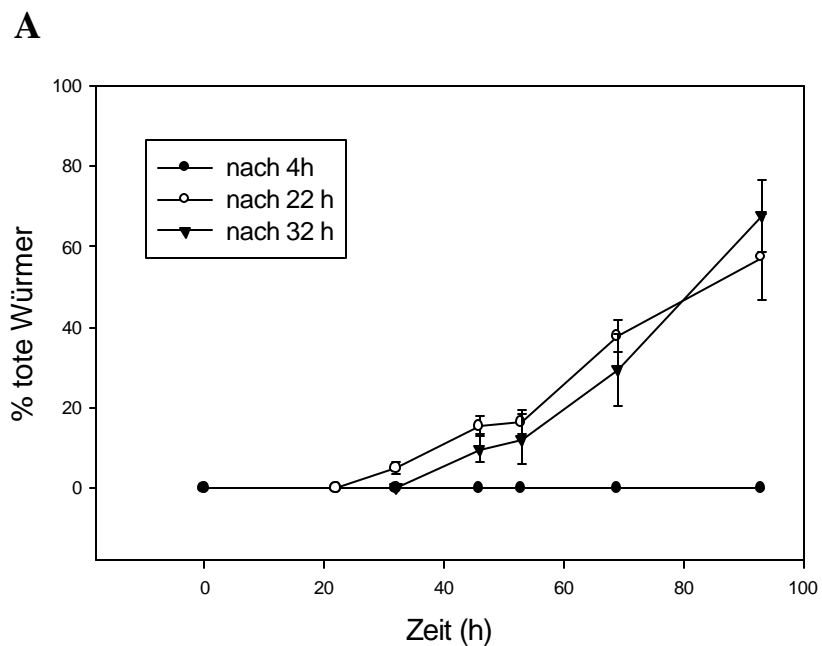


Abb. 5: Absterbekinetik von *C. elegans* unter “slow killing“-Bedingungen bei RT, in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern bzw. L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Der Vergleich von adulten Würmern und L4-Larven unter “slow killing“-Bedingungen (Abb. 5) zeigte eine erhöhte Sensitivität der adulten Würmer, welche sich in einem beschleunigtem Wurmsterben äußerte ($LT_{50\%} = 18$ h). Die L4-Larven wurden durch beide Stämme verzögert getötet und sind somit resistenter ($LT_{50\%} = 20$ h).

4.1.2.5 Ermittlung der minimalen Expositionszeit

Vorherige Versuche haben gezeigt, dass die Anzahl toter Würmer mit zunehmender Expositionszeit von *C. elegans* auf *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* steigt. Die folgenden Versuche sollten klären, ob unter "slow killing"-Bedingungen eine Art "Infektionsdosis" existiert, das heißt, ob es eine Zeitspanne gibt, die überschritten werden muss, bevor die Infektion bei *C. elegans* greift. Aus diesem Grund wurden die Würmer unterschiedlich lange auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (Abb. 6A) und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (Abb. 6B) belassen, bevor sie mit Hilfe eines Wurmhakens einzeln auf, mit *E. coli* OP50 bewachsene NG-Platten überführt und in regelmäßigen Abständen auf ein Sterben hin kontrolliert wurden.



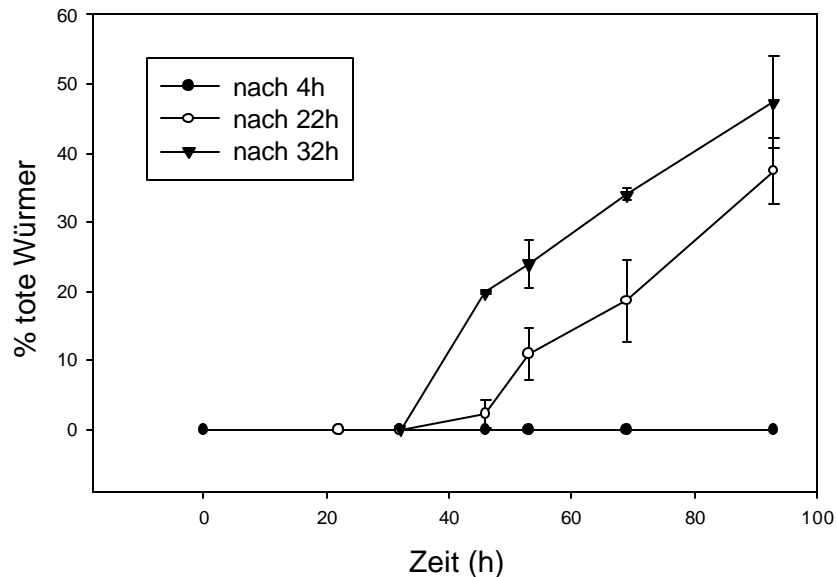
B

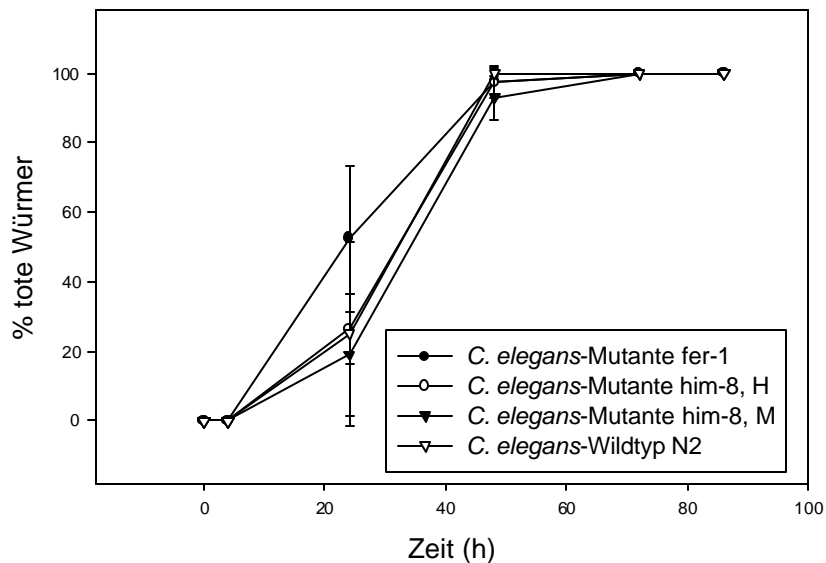
Abb. 6: *C. elegans* im Transferexperiment unter “slow killing“-Bedingungen und bei einer Temperatur von 20 °C. Nach 4 h, 22 h bzw. 32 h wurden die Würmer einzeln mit Hilfe eines Wurmhakens von *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* heruntergenommen, auf, mit *E. coli* OP50 bewachsene NG-Platten überführt und in regelmäßigen Abständen auf ein Sterben hin kontrolliert. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 20 adulten Wurmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (A) und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (B).

Das Transferexperiment zeigte, dass während der Bakterienexposition unter “slow killing“-Bedingungen in der Tat eine bestimmte “Infektionsdosis“ notwendig ist, um *C. elegans* zu töten. Eine relativ kurze Expositionszeit von 4 h konnten die Würmer unbeschadet überstehen. Die Nematoden jedoch, die 22 h oder 32 h bakterienexponiert waren, starben nach ihrem Transfer auf *E. coli* OP50 bewachsene NG-Platten, was darauf schließen lässt, dass die Infektion nicht mehr überwunden werden konnte (Abb. 6A u. B).

4.1.2.6 Einfluss des “egg-laying-defects“ auf das “slow killing“

Wie bereits beschrieben (TAN et al., 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; TAN et al., 2000), tritt unter “slow killing“-Bedingungen bei den graviden Hermaphroditen häufig ein sogenannter “Eiablagedefekt“ auf, der gekennzeichnet ist durch das Schlüpfen der Embryonen im Mutterleib (s. Abb. 8). Die so heranwachsenden Larven fressen den adulten Wurm von innen her auf, bis sie schließlich nach dessen Zersetzung freigesetzt werden. Da dieser “Eiablagedefekt“ nur beim “slow killing“ beobachtet werden kann, sollte mit den folgenden Versuchen sein Einfluss auf das Wurmsterben ermittelt werden (Abb. 7A u. B). Da der *C. elegans*-Wildtyp N2 nur zu 0,2% aus männlichen Würmern besteht, wurde für die Kontrollversuche die *C. elegans*-Mutante *him-8*, deren Anteil an männlichen Würmern 37% beträgt, und die *C. elegans*-Mutante *fer-1*, die bei 25 °C steril ist, eingesetzt.

A



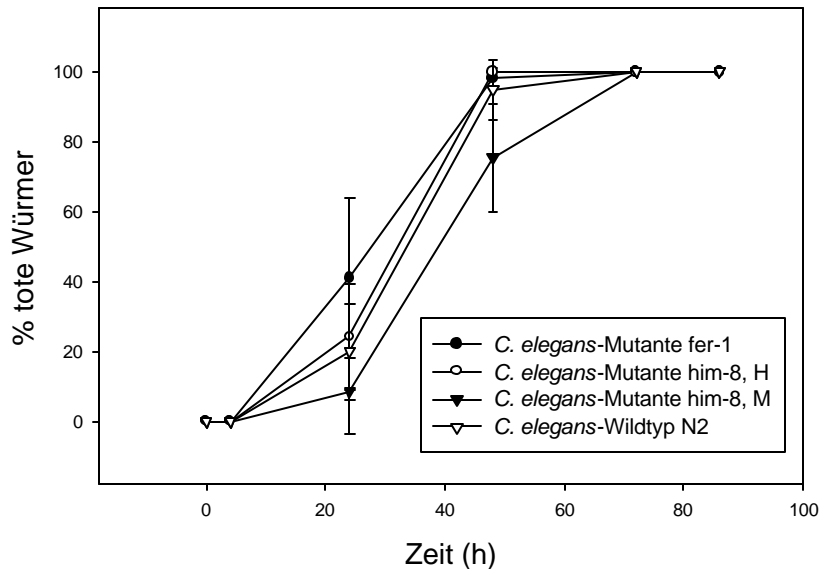
B

Abb. 7: Absterbekinetik des *C. elegans*-Wildtyps N2 sowie der Mutanten *him-8* und *fer-1* unter “slow killing“-Bedingungen bei einer Temperatur von 20 °C bzw. 25 °C (*fer-1*-Mutante). Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (A) bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (B).

Der Versuch zeigte, dass beide Stämme unter “slow killing“-Bedingungen nicht nur die graviden Hermaphroditen des *C. elegans*-Wildtyps N2 und die *him-8*-Hermaphroditen töteten, sondern ebenfalls die männlichen Würmer der *him-8*-Mutante, sowie die sterilen Hermaphroditen der *fer-1*-Mutante (Abb. 7A u. B). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Absterbekinetiken der einzelnen *C. elegans*-Stämme konnte nicht festgestellt werden. Lediglich das Sterben der männlichen Würmer erfolgte etwas zeitverzögert.



Abb. 8: “Eiablagedefekt“ bei einem graviden Hermaphroditen des *C. elegans*-Wildtypstamms N2

4.1.3 Charakterisierung des “fast killings“

4.1.3.1 Absterbekinetik unter Standardbedingungen

Um nachzuweisen, ob es auch bei dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (Ara⁻) bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (Ara⁺) ein, dem “fast killing“ bei *P. aeruginosa* PA14 vergleichbares Wurmsterben gibt (TAN et al. 1999; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; TAN et al. 2000), wurde unter den bereits in der Literatur beschriebenen Bedingungen ein “fast killing“-Assay durchgeführt (Abb. 9).

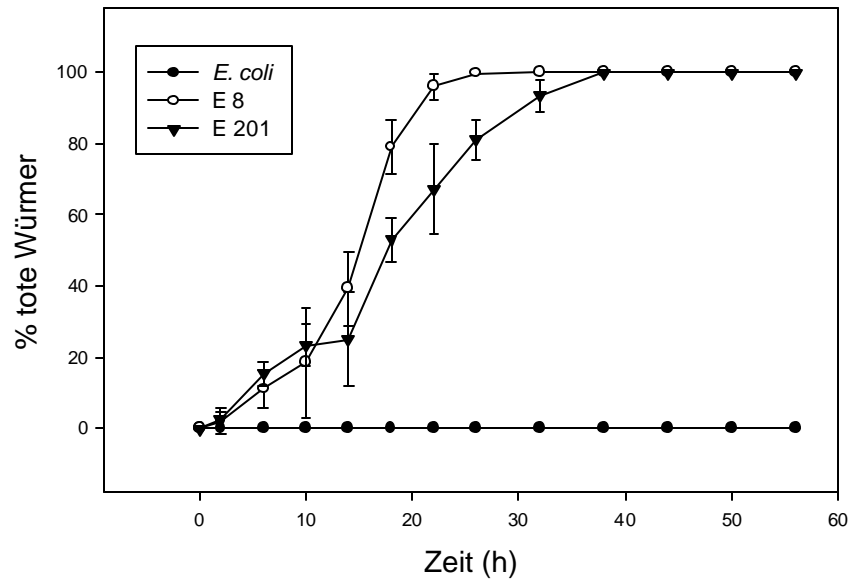


Abb. 9: Absterbekinetik von *C. elegans* unter Standard-“fast killing“-Bedingungen bei RT auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (Ara⁻) bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (Ara⁺), mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl der toten Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem entsprechenden Bakterienstamm.

Die Untersuchung der beiden Stämme im “fast killing“-Assay zeigte in beiden Fällen ein Wurmsterben innerhalb von 24-34 Stunden, so dass das Kriterium des “fast killings“ erfüllt wurde (LT_{50%} von E 8 = 15 h; LT_{50%} von E 201 = 19 h). *E. coli* OP50 als Negativkontrolle tötete *C. elegans* nicht. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ara⁻ (virulenten) *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem Ara⁺ (avirulenten) *B. thailandensis*-Stamm E 201 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

4.1.3.2 Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik

Das die Temperatur die Absterbekinetik unter “slow killing“-Bedingungen beeinflusst, wurde bereits unter 4.1.2.2 gezeigt. Mit dem folgenden Versuch sollte geprüft werden, inwieweit sich die Versuchstemperatur auch auf das Wurmsterben unter “fast killing“-Bedingungen auswirkt (Abb. 10).

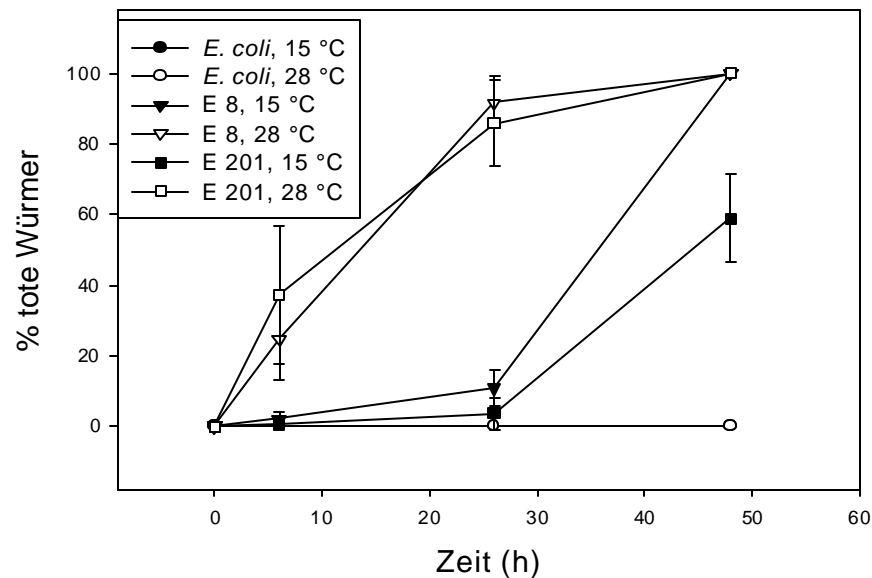


Abb. 10: Vergleich der *C. elegans*-*B. pseudomallei*/*B. thailandensis*-Absterbekinetik unter “fast killing“-Bedingungen in Abhängigkeit von der Temperatur (15 °C und 28 °C), mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl der toten Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Die beiden untersuchten Stämme töteten *C. elegans* unter “fast killing“-Bedingungen bei einer Versuchstemperatur von 28 °C wesentlich schneller ($LT_{50\%}$ von E 8 = 10 h; $LT_{50\%}$ von E 201 = 12 h), als bei einer Temperatur von nur 15 °C ($LT_{50\%}$ von E 8 = 40 h). In der Negativkontrolle mit *E. coli* OP50 starben die Würmer bei keiner der gewählten Temperaturen (Abb.10).

4.1.3.3 Vergleich vitaler Bakterien mit hitzeinaktivierten Bakterien

Unter 4.1.2.3 wurde bereits nachgewiesen, dass für das Wurmsterben unter “slow killing“-Bedingungen lebende Bakterien notwendig sind. Die Frage, ob auch für das “fast killing“ vitale Bakterien erforderlich sind, sollte mit Hilfe dieses Versuches geklärt werden. Der *B. pseudomallei*-Stamm E 8 sowie der *B. thailandensis*-Stamm E 201 wurden zunächst auf PGS (“fast killing“)-Platten angezogen. Das Koloniematerial wurde anschließend in LB-Medium resuspendiert, bei 80 °C für 30 min hitzeinaktiviert und jeweils in einer Konzentration von $3,2 \times 10^8$ Bakterien auf PGS-Platten gegeben. *C. elegans* wurde im Entwicklungsstadium der L4-Larve eingesetzt und bei einer Versuchstemperatur von 20 °C gehalten. Der Kontrollversuch erfolgte mit lebenden Bakterien unter Standard-“fast killing“-Bedingungen. Es stellte sich heraus, dass *C. elegans* auf den hitzeinaktivierten Bakterien innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 10 Tagen auch im “fast killing“-Assay nicht getötet wurde und sich hochgradig vermehrte. Die Ergebnisse beziehen sich auf drei unabhängige Versuche mit jeweils etwa 40 Würmern pro Ansatz.

4.1.3.4 Vergleich adulter Würmer mit L4-Larven

Ein Vergleich von adulten Würmern und L4-Larven unter “slow killing“-Bedingungen (4.1.2.4) ergab eine erhöhte Sensitivität der adulten Würmer. Um nachzuweisen, welches Entwicklungsstadium unter “fast killing“-Bedingungen empfindlicher ist, wurde *C. elegans* vergleichend als L4-Larve und adulter Wurm auf, mit *B. pseudomallei* E 8 bzw. *B. thailandensis* E 201 bewachsenen PGS (“fast killing“)-Platten eingesetzt (Abb. 11).

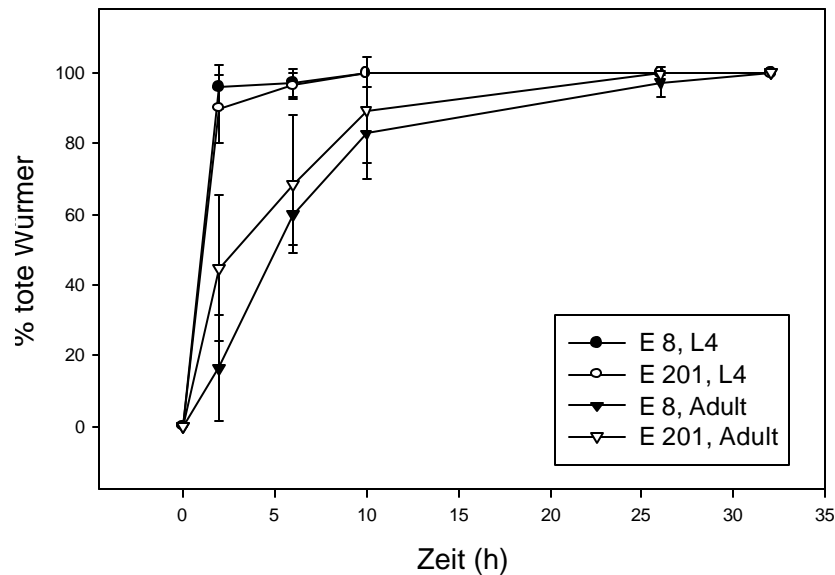


Abb. 11: Absterbekinetik von *C. elegans* unter “fast killing“-Bedingungen bei RT in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern bzw. L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (10^5 Bakterien/Versuchsplatte).

Der Vergleich von adulten Würmern und L4-Larven unter “fast killing“-Bedingungen zeigte eine erhöhte Sensitivität der L4-Larven, welche sich in einem beschleunigten Wurmsterben äußerte ($LT_{50\%} < 1$ h). Die adulten Würmer wurden durch beide Stämme verzögert getötet und sind somit resistenter ($LT_{50\%}$ von E 8 = 5 h; $LT_{50\%}$ von E 201 = 3 h). Wie aus der Abbildung 11 hervorgeht, erfolgte hier die Absterbekinetik der L4-Larven mit einer $LT_{50\%}$ von < 1 h deutlich schneller, als in der Standard-“fast killing“-Kinetik der Abbildung 9 ($LT_{50\%} \sim 17$ h). Als Ursache ist die im Versuch unter 4.1.3.4 ausnahmsweise gewählte höhere Konzentration von 10^5 Bakterien/Platte, im Vergleich zu der in Versuch 4.1.3.1 gewählten Standardkonzentration von 1300 Bakterien/Platte zu nennen (s. auch 4.1.3.5.).

4.1.3.5 Auswirkung unterschiedlicher Bakterienkonzentrationen auf die Absterbekinetik

Vorversuche haben gezeigt, dass die Absterbekinetik unter “fast killing“-Bedingungen von der Temperatur (4.1.3.2) und vom Entwicklungsstadium der eingesetzten Würmer (4.1.3.4) beeinflusst wird. Mit dem folgenden Versuch sollte gezeigt werden, welche Auswirkungen die Bakterienkonzentration auf das Wurmsterben hat (Abb. 12).

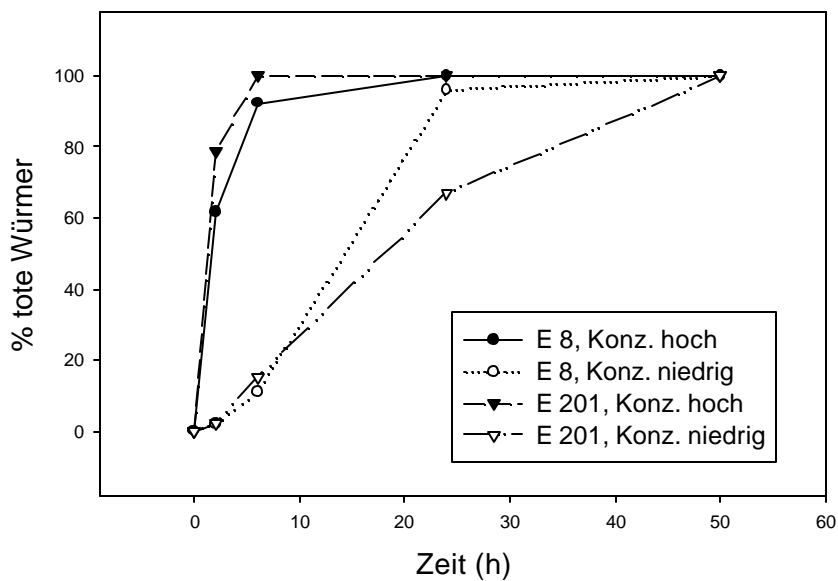


Abb. 12: Absterbekinetik von *C. elegans* unter “fast killing“-Bedingungen in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration, bei einer Temperatur von 20 °C. Die gewählte Keimzahl betrug entweder 1300 Bakterien/Versuchsansatz (niedrige Konzentration) oder 10^5 Bakterien/Versuchsansatz (hohe Konzentration). Es handelt sich um Einzelwerte mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Wurde *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* in einer hohen Konzentration von 10^5 Bakterien/Versuchsplatte eingesetzt, starb *C. elegans* weitaus schneller ($LT_{50\%} \sim 1$ h), als bei einer niedrigeren Konzentration von 1300 Bakterien/Versuchsplatte ($LT_{50\%} \sim 15$ h).

4.1.3.6 Nitrocellulose-Assay auf PGS-Agar

Der nachfolgende Versuch sollte klären, ob für ein Wurmsterben unter “fast killing“-Bedingungen ein direkter Kontakt zwischen *C. elegans* und *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* erforderlich ist (Abb. 13). Aus diesem Grund wurde ein Nitrocellulose-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm zwischen den Würmern und den Bakterien platziert. Die Würmer wurden nach 24 h vom Filterpapier heruntergespült und auf ein eventuell stattgefundenes Sterben hin kontrolliert.

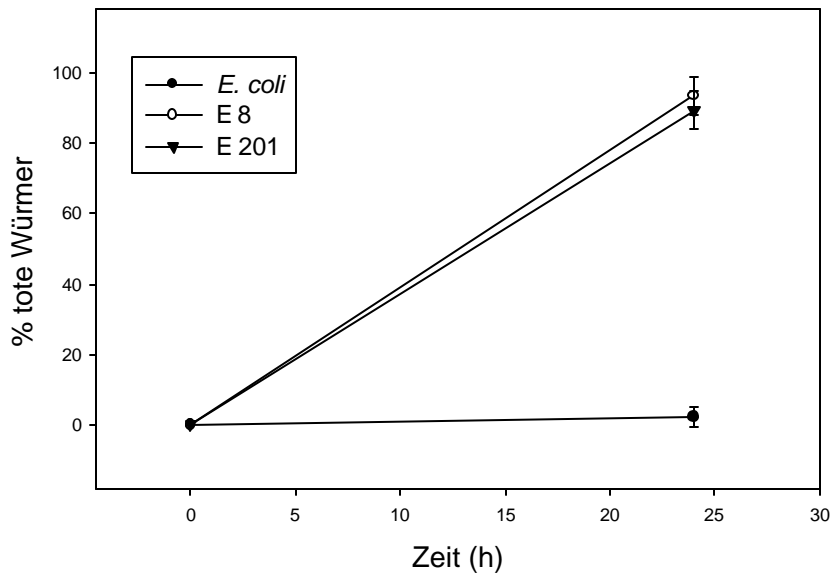


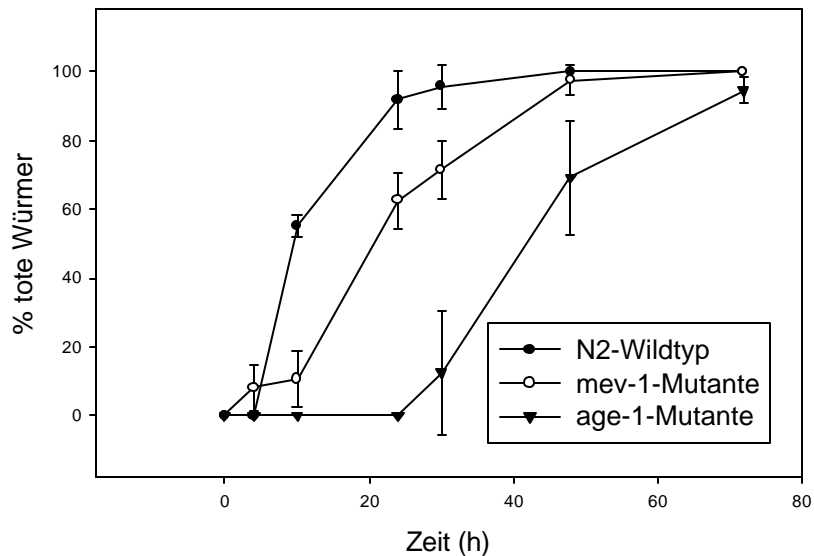
Abb. 13: *C. elegans* im Nitrocellulose-Assay unter “fast killing“-Bedingungen bei RT, mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. *C. elegans* wurde auf Nitrocellulose-Filtern (Porengröße 0,45 µm), die auf den bakterienbewachsenen PGS (“fast killing“-)Platten lagen, gehalten. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Mit dem Nitrocellulose-Assay konnte gezeigt werden, dass ein direkter Kontakt zwischen *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* und *C. elegans* nicht erforderlich ist, um die Würmer unter "fast killing"-Bedingungen zu töten (Abb. 13). *E. coli* OP50 als Negativkontrolle tötete *C. elegans* nicht.

4.1.3.7 Einfluss von oxidativem Stress beim "fast killing"

TAN et al. (1999, 2000) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) beschrieben das "fast killing" als einen Vorgang, der bei *C. elegans* zu erhöhtem oxidativen Stress führt. Mit dem folgenden Versuch sollte nachgewiesen werden, ob oxidativer Stress unter "fast killing"-Bedingungen auch bei *B. pseudomallei* (Abb. 14A) bzw. *B. thailandensis* (Abb. 14B) eine Rolle spielt, und wie er sich auf die *C. elegans*-Absterbekinetik auswirkt. Aus diesem Grund wurden neben dem *C. elegans*-Wildtyp N2 auch noch zwei Wurmmutanten eingesetzt: die, gegenüber oxidativem Stress empfindlichere Mutante *mev-1*, sowie die, gegenüber oxidativem Stress resistenter Mutante *age-1*.

A



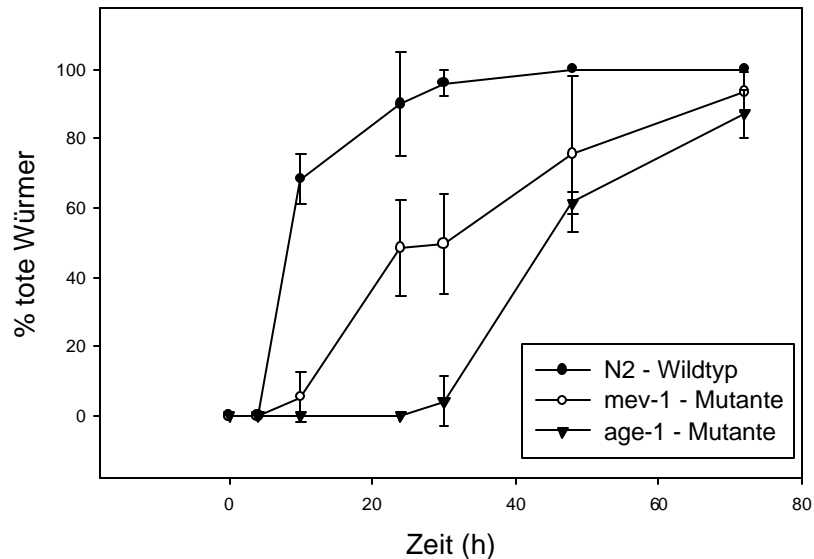
B

Abb. 14: Absterbekinetik des *C. elegans*-Wildtyps N2 sowie der Mutanten *mev-1* und *age-1* unter “fast killing“-Bedingungen bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (**A**) bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (**B**).

Die mit der Stress-resistenteren *C. elegans*-Mutante *age-1* erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass bei *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* unter “fast killing“-Bedingungen oxidativer Stress eine Rolle spielt (Abb. 14A u.B), da diese Mutante langsamer getötet wurde ($LT_{50\%}$ von E 8 = 41 h; $LT_{50\%}$ von E 201 = 43 h), als der *C. elegans*-Wildtyp N2 ($LT_{50\%}$ von E 8 = 9 h; $LT_{50\%}$ von E 201 = 8 h). Die Stress-empfindlichere *mev-1*-Mutante zeigte keine höhere Sensitivität. Sie starb mit einer $LT_{50\%}$ von 22 h bei E 8 bzw. 29 h bei E 201 langsamer als der *C. elegans*-Wildtyp, und unterstützt somit die These des oxidativen Stresses nicht.

4.1.4 Einfluss der Kulturbedingungen auf die *C. elegans*-*B. pseudomallei*-Interaktionen

Da bei Verwendung der bisher untersuchten Nährmedien keine Differenzierung zwischen dem virulenten *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem avirulenten *B. thailandensis*-Stamm E 201 möglich war, wurden auf der Suche nach einer Unterscheidungsmöglichkeit weitere Medien hinsichtlich ihres Einflusses auf die *C. elegans*-Absterbekinetik getestet. Auf Acanthamöbenagar, NG ("slow killing")-Agar ohne Pepton und Brain Heart Infusion-Agar wurde *C. elegans* mit einer Kinetik ähnlich der des "slow killings" auf NG-Agar getötet. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ara⁻ *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem Ara⁺ *B. thailandensis*-Stamm E 201 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Auf die Absterbekinetik auf Brain Heart Infusion-Agar soll unter 4.1.4.2 näher eingegangen werden, da DARBY et al. (1999) bei *P. aeruginosa* PAO1 unter diesen Kulturbedingungen ein besonders schnelles Wurmsterben (letale Paralyse) beobachten konnten (s. 2.4.2.3).

4.1.4.1 *C. elegans* auf Brain Heart Infusion-Agar

Da DARBY et al. (1999) mit dem *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 auf Brain Heart Infusion-Agar eine besondere, von der auf NG ("slow killing")- und PGS ("fast killing")-Agar abweichende *C. elegans*-Absterbekinetik feststellen konnten (Phänomen der "letalen Paralyse, s. 2.4.2.3), sollten in dem folgenden Versuch die *C. elegans*-*B. pseudomallei*/*B. thailandensis*-Interaktionen auf diesem Nährmedium näher untersucht werden (Abb. 15).

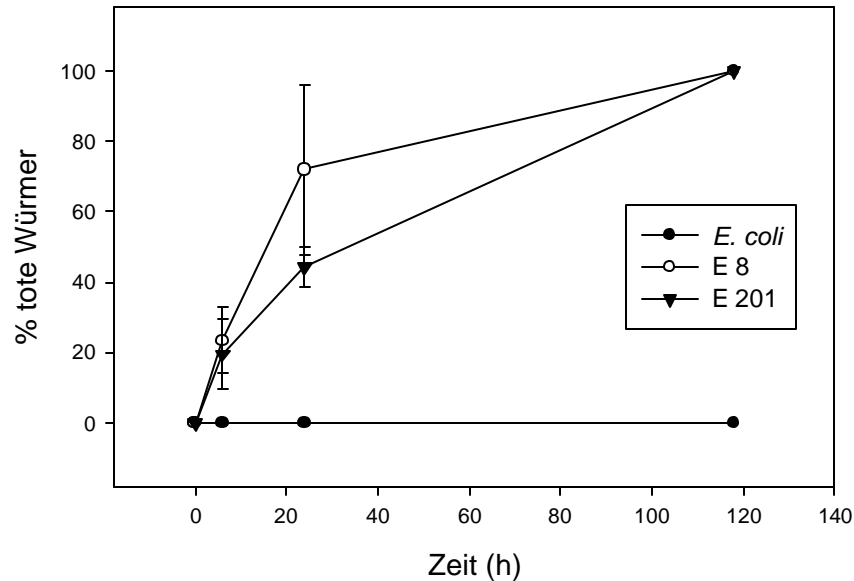
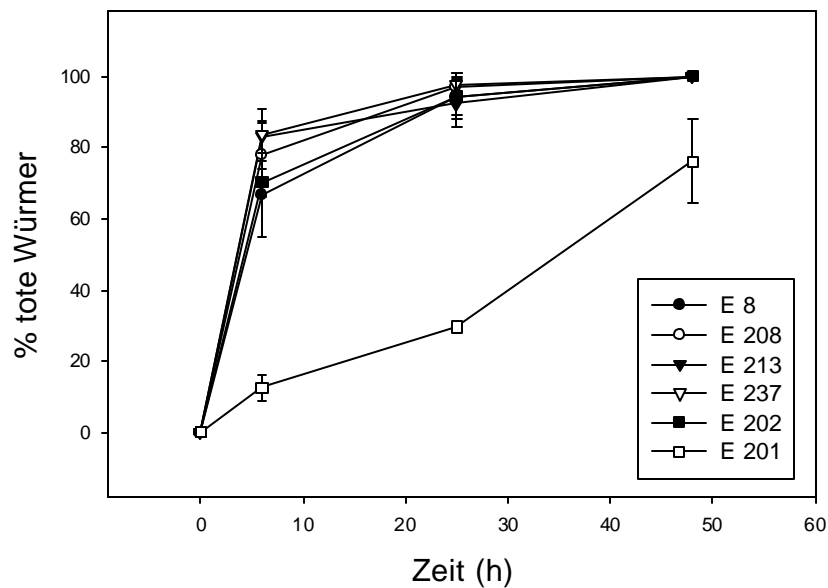


Abb. 15: Absterbekinetik von *C. elegans* auf Brain Heart Infusion (BHI)-Agar bei einer Temperatur von 20 °C, mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Die beiden untersuchten Stämme E 8 und E 201 töteten *C. elegans* auf Brain Heart Infusion-Agar mit einer Kinetik, ähnlich der des “slow killings“ auf NG-Agar. Auf *E. coli* OP50 als Negativkontrolle starb *C. elegans* nicht (Abb. 15).

4.1.4.2 *C. elegans* auf GS-Agar

Bei allen bisher verwendeten Nährmedien konnte hinsichtlich der *C. elegans*-Absterbkinetik kein signifikanter Unterschied zwischen dem virulenten, Ara⁻ *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem avirulenten, Ara⁺ *B. thailandensis*-Stamm E 201 festgestellt werden. Vorversuche zeigten jedoch einen deutlichen Unterschied dieser beiden Stämme nach Wachstum auf GS ("fast killing")-Agar, einer Variante des PGS ("fast killing")-Agars, bei dem jedoch der Peptonanteil weggelassen wurde. Inwieweit diese Beobachtung auch auf andere Ara⁻ *B. pseudomallei*-Stämme (Abb. 16A) und Ara⁺ *B. thailandensis*-Stämme (Abb. 16B) übertragbar ist, sollten die nachfolgenden Versuche klären.

A

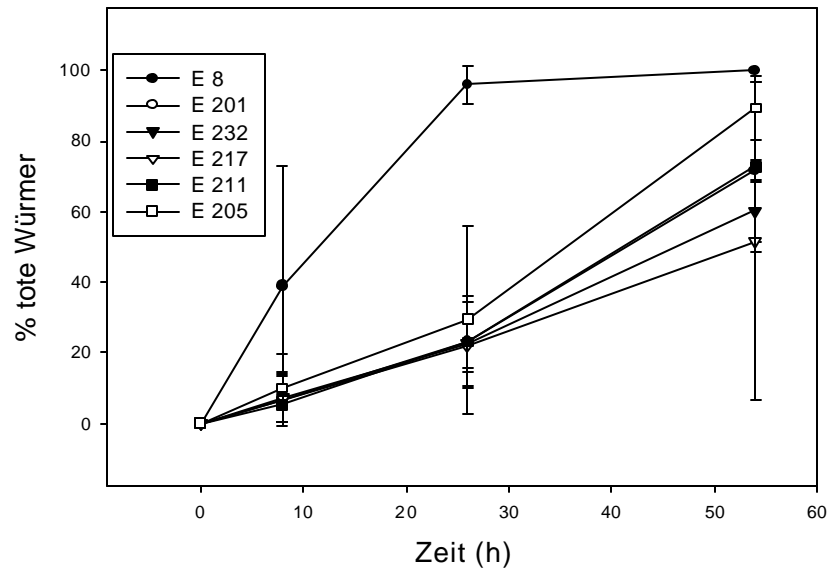
B

Abb. 16: Absterbekinetik von *C. elegans* auf GS-Agar bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf jeweils 5 Ara⁻ *B. pseudomallei*-Stämmen und 1 Ara⁺ *B. thailandensis*-Stamm (A) bzw. 5 Ara⁺ *B. thailandensis*-Stämmen und 1 Ara⁻ *B. pseudomallei*-Stamm (B).

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Ara⁻ *B. pseudomallei*-Stämme *C. elegans* wesentlich schneller, mit einer Kinetik ähnlich der unter “fast killing“-Bedingungen, töteten (LT_{50%} ~ 5 h), als die untersuchten Ara⁺ *B. thailandensis*-Stämme (LT_{50%} ~ 40 h). Die mit GS-Agar gefundenen experimentellen Bedingungen scheinen somit eine Möglichkeit zur sicheren Unterscheidung von virulenten und avirulenten Stämmen zu sein (Abb. 16A u. B).

Da die Absterbekinetik auf GS-Agar der unter "fast killing"-Bedingungen ähnelt, sollte in diesem Versuch durch Einsatz der Stress-resistenteren *C. elegans*-Mutante *age-1* geklärt werden, inwiefern oxidativer Stress auch unter diesen Kulturbedingungen eine Rolle spielt (Abb. 17).

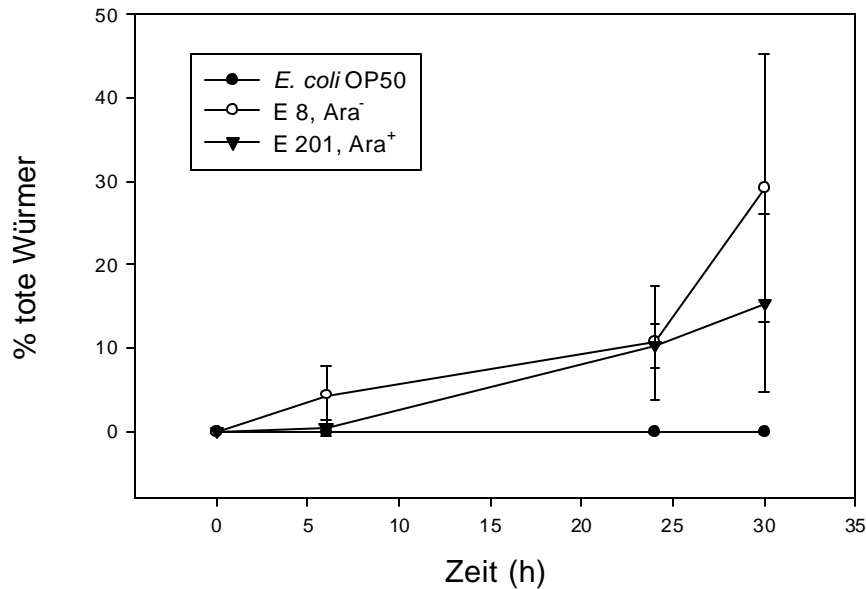


Abb. 17: Absterbekinetik der *C. elegans*-Mutante *age-1* auf GS-Agar bei einer Temperatur von 20 °C, mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Aus der Abbildung 17 geht hervor, dass auch auf GS-Agar die stress-resistentere *C. elegans*-Mutante *age-1* bei Experimenten mit *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* sehr viel langsamer stirbt, als der *C. elegans*-Wildtyp (s. 4.1.4.2), so dass auch unter diesen Kulturbedingungen am Wurmsterben ein Mechanismus beteiligt zu sein scheint, der bei *C. elegans* zu oxidativem Stress führt.

4.1.4.3 Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar

Unter 4.1.4.2 wurde gezeigt, dass das Wurmsterben auf GS-Agar mit einer, dem “fast killing“ auf PGS-Agar sehr ähnlichen Kinetik erfolgt, die bei *C. elegans* zu oxidativem Stress führt, und dass unter diesen Kulturbedingungen eine Differenzierung zwischen virulenten (Ara^-) *B. pseudomallei*-Stämmen und avirulenten (Ara^+) *B. thailandensis*-Stämmen möglich ist. Des Weiteren wurde unter 4.1.3.6 mit Hilfe des Nitrocellulose-Assays bewiesen, dass am “fast killing“ von den Bakterien abgegebene Substanzen (wahrscheinlich sog. “Exotoxine“) beteiligt sind, die *C. elegans* auch ohne direkten Bakterienkontakt töten. Mit den nachfolgenden Versuchen sollte zum einen gezeigt werden, dass auch auf GS-Agar das Wurmsterben durch diffundierbare Substanzen vermittelt wird, zum anderen sollte überprüft werden, ob auch im Nitrocellulose-Versuch die Möglichkeit der Unterscheidung von *B. pseudomallei*- und *B. thailandensis*-Stämmen (Abb. 18) sowie die höhere Resistenz der *C. elegans*-Mutante *age-1* (Abb. 19) bestehen bleibt.

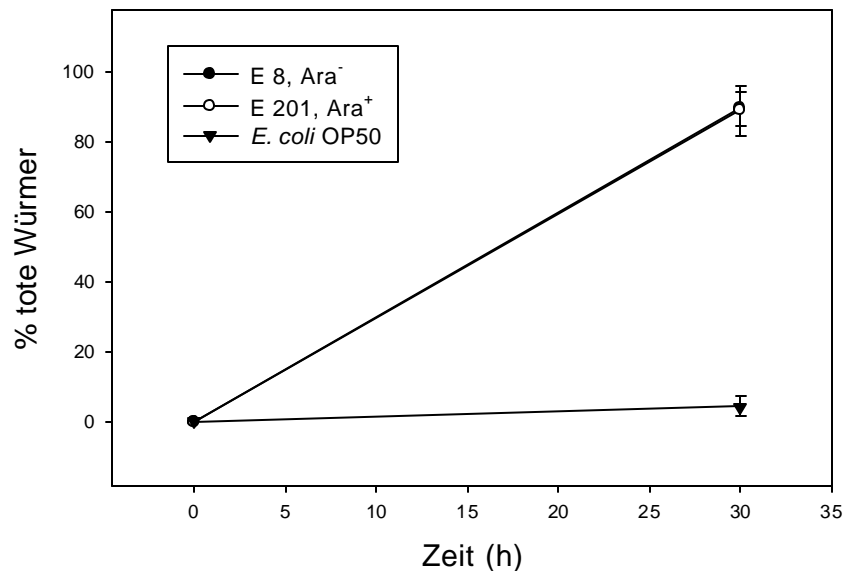


Abb. 18: *C. elegans* im Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar bei einer Temperatur von 20 °C, mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. *C. elegans* wurde auf Nitrocellulose-Filtern (Porengröße 0,45 µm), die auf den bakterienbewachsenen GS-Platten lagen, gehalten. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

Es zeigte sich, dass ein direkter Kontakt zwischen *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* und *C. elegans* auch auf GS-Agar nicht erforderlich ist, um die Würmer zu töten. *C. elegans* starb auf beiden Stämmen mit der gleichen Kinetik ($LT_{50\%} \sim 17$ h), so dass eine Unterscheidung in virulent und avirulent unter diesen Bedingungen nicht mehr möglich ist (Abb. 18). *E. coli* OP50 als Negativkontrolle tötete *C. elegans* nicht.

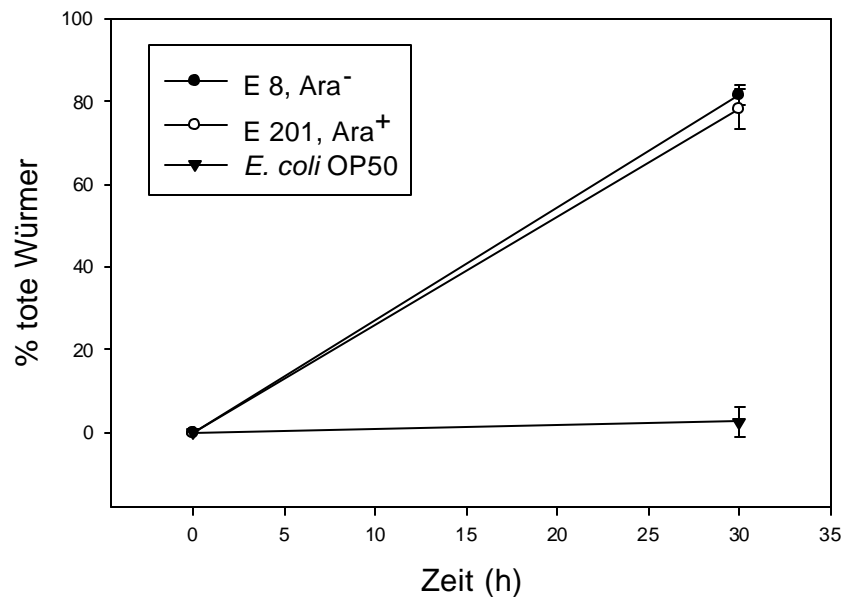


Abb. 19: Die *C. elegans*-Mutante *age-1* im Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar bei einer Temperatur von 20 °C, mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Die *C. elegans*-Mutante wurde auf Nitrocellulose-Filtern (Porengröße 0,45 µm), die auf den bakterienbewachsenen GS-Platten lagen, gehalten. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201.

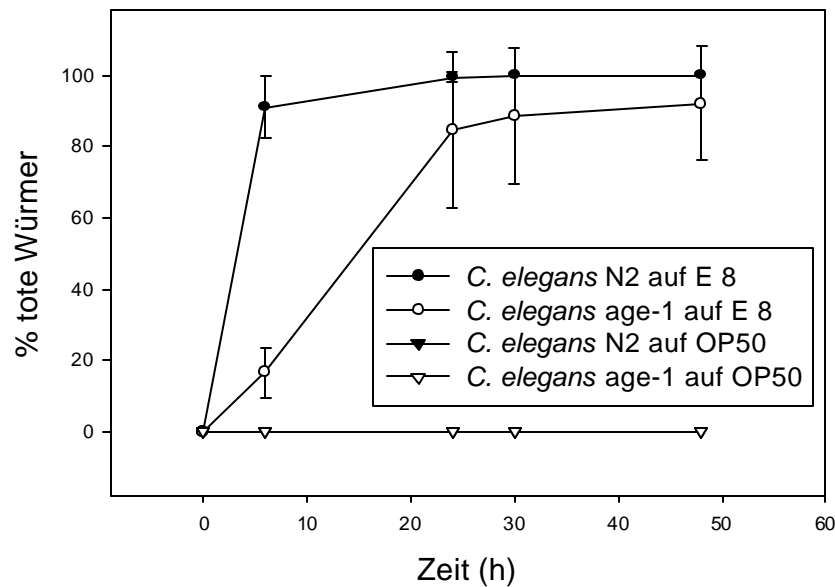
Abbildung 19 zeigte, dass auch ein direkter Kontakt zwischen *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* und der *C. elegans*-Mutante *age-1* nicht erforderlich ist, um die Würmer zu töten. Die Mutante starb jedoch auf beiden Stämmen mit etwa der gleichen Kinetik ($LT_{50\%} \sim 20$ h), wie der *C. elegans*-Wildtyp (s. Abb. 18), so dass die höhere Resistenz der Wurmmutante gegenüber oxi-

dativem Stress unter diesen Bedingungen nicht mehr deutlich wird. *E. coli* OP50 als Negativkontrolle tötete *C. elegans* nicht.

4.1.4.4 Modifizierter Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar

Unter 4.1.4.3 wurde gezeigt, dass im Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar eine Unterscheidung des virulenten *B. pseudomallei*-Stammes E 8 vom avirulenten *B. thailandensis*-Stamm E 201 nicht mehr möglich war. Ebenso kam die höhere Resistenz der *C. elegans*-Mutante *age-1* gegenüber oxidativem Stress unter diesen Bedingungen nicht mehr zum Ausdruck. Um auszuschließen, dass die unter 4.1.4.3 gewählten experimentellen Bedingungen *C. elegans* weniger schädigen als ein direkter Bakterienkontakt, wurde der Nitrocellulose-Assay in abgewandelter Form durchgeführt (Abb. 20 A u. B). Hierzu wurden die zu untersuchenden Bakterien über Nacht auf Nitrocellulose-Filtern, die auf GS-Platten lagen, angezogen. Anschließend wurden die Filter entfernt und die entsprechenden Wurmstadien auf die verbleibenden sterilen Agarplatten gesetzt.

A



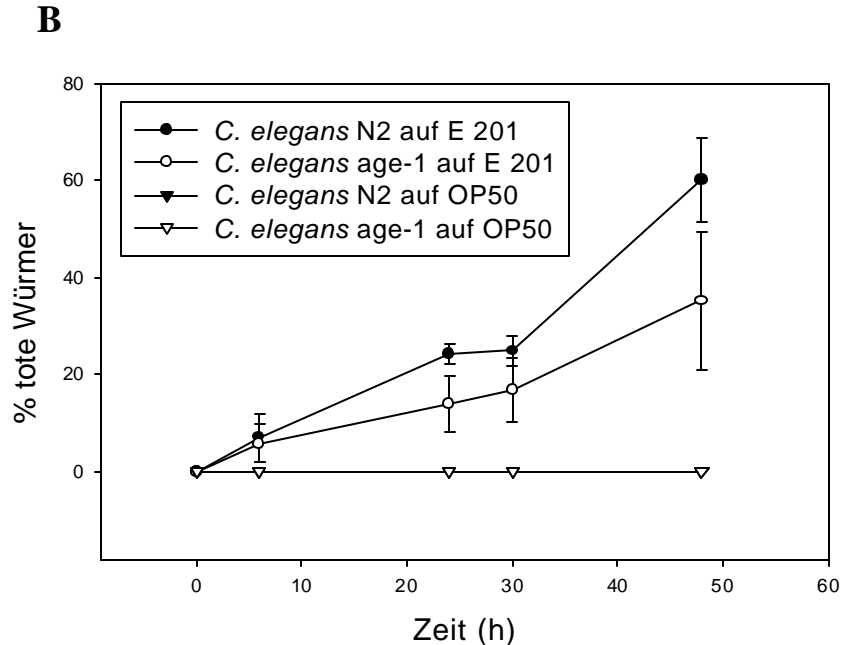


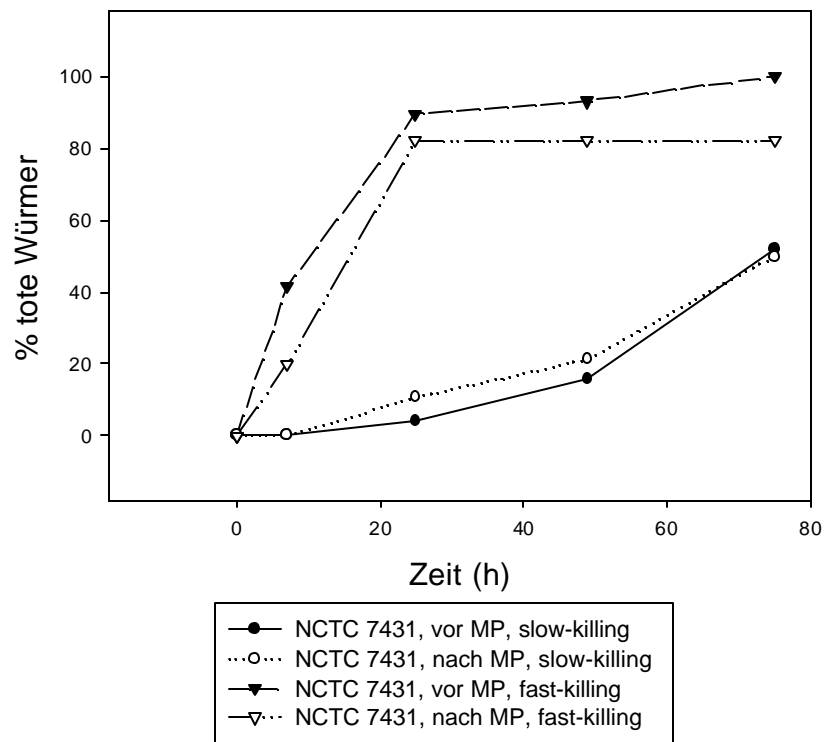
Abb. 20: Der *C. elegans*-Wildtyp N2 sowie die Mutante *age-1* im modifizierten Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar bei einer Temperatur von 20 °C, mit *E. coli* OP50 als Negativkontrolle. Die Bakterien wurden über Nacht auf Nitrocellulose-Filtern (Porengröße 0,45 µm), die auf GS-Platten lagen, angezogen, und nach Entfernen der Filter wurden die Würmer auf die Versuchsplatten gesetzt. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 (**A**) bzw. dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 (**B**).

Es stellte sich heraus, dass bei dieser modifizierten Durchführung des Nitrocellulose-Assays der Virulenzunterschied zwischen dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 ($LT_{50\%} = 0,2$ h; Abb. 20 **A**) und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 ($LT_{50\%} \sim 43$ h; Abb. 20 **B**) ebenso deutlich war, wie in dem Versuchsansatz mit direktem Bakterienkontakt (s. 4.1.4.2). Ebenso konnte die höhere Stressresistenz der *C. elegans*-Mutante *age-1* gegenüber dem Wildtyp N2 bestätigt werden. Die Absterbekinetik der Mutante auf *B. pseudomallei* E 8 war mit einer $LT_{50\%}$ von 11 h im Vergleich zur Absterbekinetik des Wildtyps ($LT_{50\%} = 0,2$ h) wesentlich verzögert, wohingegen dieser Unterschied bei *B. thailandensis* nur als Tendenz sichtbar war. *E. coli* OP50 als Negativkontrollen tötete *C. elegans* nicht.

4.1.5 Vergleich des *B. pseudomallei*-Stammes NCTC 7431 vor und nach Mauspassage

In vorhergehenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der *B. pseudomallei*-Stamm NCTC 7431 (Ara^r) nach Mauspassage eine höhere Virulenz in der Maus aufweist, als unpassagiert (HOPPE et al., 1999). Um zu testen, ob diese Beobachtung auch im *C. elegans*-Modell gemacht werden kann, wurde der *B. pseudomallei*-Stamm NCTC 7431 in den folgenden Versuchen unter "slow killing"-Bedingungen, "fast killing"-Bedingungen (Abb. 21A) und auf GS-Agar (Abb. 21B) sowohl vor, als auch nach Mauspassage eingesetzt.

A



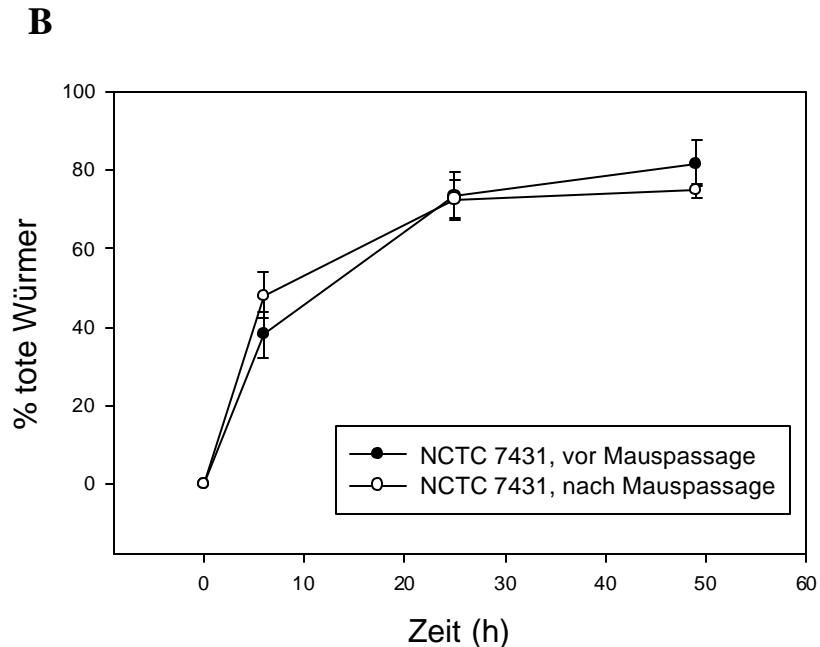


Abb. 21: Absterbekinetik von *C. elegans* unter “slow killing“-Bedingungen (**A**), “fast killing“-Bedingungen (**A**) und auf GS-Agar (**B**) bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um Einzelwerte (**A**) bzw. um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen (**B**), mit durchschnittlich 40 Würmern (je nach Versuch Adulte oder L4-Larven) pro Ansatz. Dargestellt ist (in **A** als Mittelwert mit Standardabweichung), die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. pseudomallei*-Stamm NCTC 7431 vor bzw. nach Mauspassage.

Aus den Abbildungen geht hervor, dass *B. pseudomallei* NCTC 7431 sowohl vor als auch nach Mauspassage *C. elegans* mit annähernd der gleichen Kinetik tötete, so dass eine durch die Mauspassage stattgefundenen Virulenzsteigerung im *C. elegans*-Modell nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 21A u. B). Unter “slow killing“-Bedingungen lag die $LT_{50\%}$ in etwa bei 75 h (Abb. 21A), unter “fast killing“-Bedingungen bei 8 h (Abb. 21A) und auf GS-Agar bei 6 h (Abb. 21B). Ein nennenswerter Unterschied zwischen dem *B. pseudomallei*-Stamm NCTC 7431 und den bisher untersuchten Stämmen E 8 und E 201 hinsichtlich ihrer Absterbekinetiken bestand nicht.

4.2 Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-*Burkholderia cepacia*-Pathogenitätsmodells: Vergleich des *B. cepacia*-Wildtypstammes H111 mit der Autoinducer-negativen Mutante H111 m64

4.2.1 Charakterisierung des “slow killings“

4.2.1.1 Absterbekinetik unter Standardbedingungen

Um nachzuweisen, ob es auch bei dem *B. cepacia*-Stamm H111 ein, dem “slow killing“ bei *B. pseudomallei* E 8 und *B. thailandensis* E 201 vergleichbares Wurmsterben gibt, wurde auch dieser Bakterienstamm unter “slow killing“-Bedingungen getestet (Abb. 22). Zudem sollte untersucht werden, ob das *C. elegans*-Modell zur Detektion von Virulenzunterschieden in der Lage ist. Aus diesem Grund wurde neben dem *B. cepacia*-Stamm H111 (Wildtyp) die *B. cepacia*-Mutante H111 m64, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Eberl, Technische Universität München, getestet. Bei der Mutante handelt es sich um eine Quorum sensing-negative Mutante, die keine Autoinducer (N-acylhomoserin Lactone) und somit vermutlich auch weniger Virulenzfaktoren produziert.

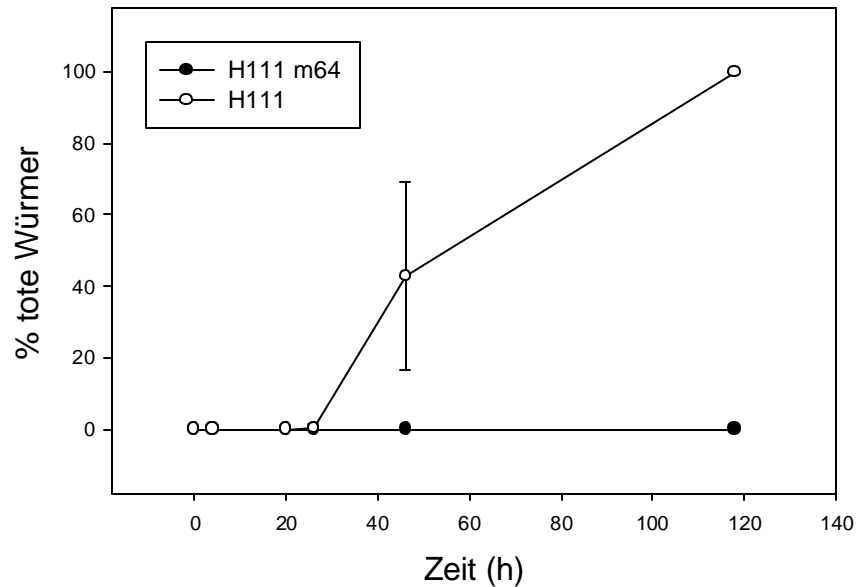
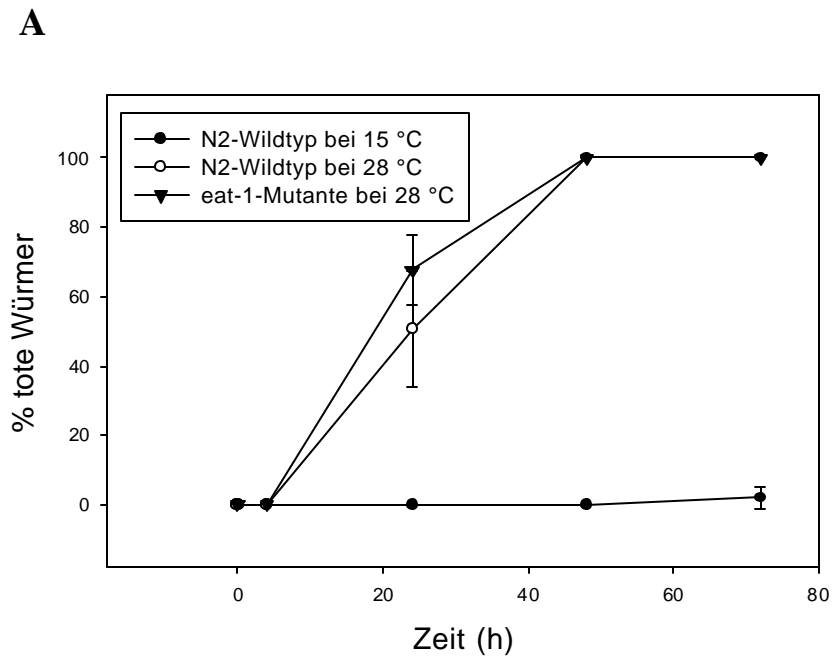


Abb. 22: Absterbekinetik von *C. elegans* auf den beiden *B. cepacia*-Stämmen H111 und H111 m64 unter Standard-“slow killing“-Bedingungen, bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unterschiedlichen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl der toten Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem entsprechenden Bakterienstamm.

Während der *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 *C. elegans* unter “slow killing“-Bedingungen tötete ($LT_{50\%} = 48$ h), fand auf der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 kein Wurmsterben statt (Abb. 22). Hier konnte eine hochgradige Vermehrung sowie eine Verstoffwechselung der Bakterien durch *C. elegans* beobachtet werden. Das “slow killing“ auf *B. cepacia* H111 war im Vergleich zu *B. pseudomallei* E 8 und *B. thailandensis* E 201 (s. 4.1.2), die *C. elegans* mit einer $LT_{50\%}$ von 25 h töteten, zeitverzögert.

4.2.1.2 Einfluss der Temperatur auf die Absterbekinetik

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss der Temperatur, sowie der Einfluss der pharyngealen Pumpaktivität von *C. elegans* auf die Absterbekinetik unter “slow killing“-Bedingungen untersucht werden. Aus diesem Grund wurde neben dem *C. elegans*-Wildtyp-Stamm N2 auch die, in ihrer pharyngealen Pumpleistung herabgesetzte *C. elegans*-Mutante *eat-1* mit dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 (Abb. 23A) und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (Abb. 23B) infiziert.



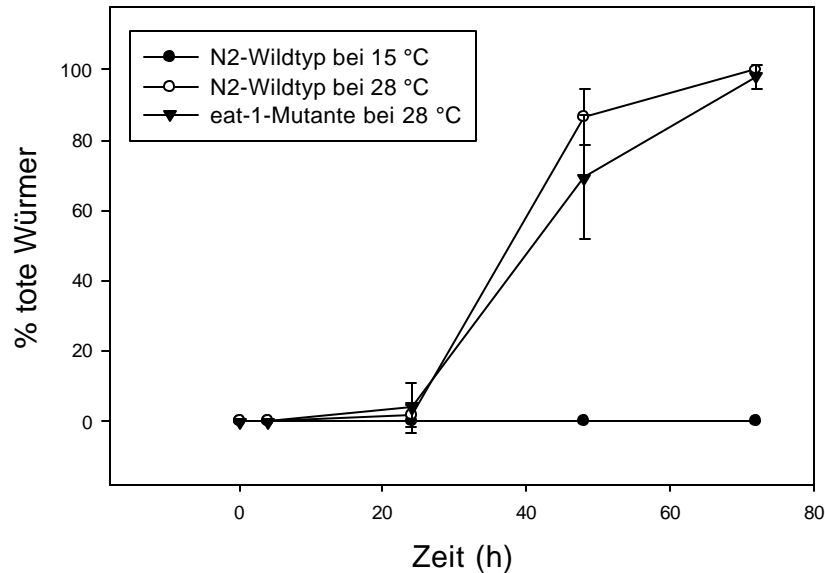
B

Abb. 23: Vergleich der *C. elegans* (Wildtyp N2 sowie *eat-1*-Mutante)-*B. cepacia*-Absterbekinetik unter “slow killing“-Bedingungen in Abhängigkeit von der Temperatur (15 °C bzw. 28 °C). Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 (A) bzw. der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (B).

Es zeigte sich, dass *B. cepacia* H111 den *C. elegans*-Wildtyp-Stamm N2 bei einer Versuchstemperatur von 28 °C wesentlich schneller tötete ($LT_{50\%} = 24$ h), als bei einer Temperatur von 15 °C (Abb. 23A). Auch die *B. cepacia*-Mutante H111 m64, die *C. elegans* im “slow killing“-Assay bei einer Versuchstemperatur von 15 °C und 20 °C (s. 4.2.6.1) nicht tötete, erreichte bei einer Versuchstemperatur von 28 °C eine $LT_{50\%}$ von 42 h (Abb. 23B). Die Mutante besitzt unter “slow killing“-Bedingungen also durchaus noch eine Restpathogenität. Durch den Einsatz der *C. elegans*-Mutante *eat-1* sollte ausgeschlossen werden, dass eine herabgesetzte Pumpleistung des Pharynx für das verzögerte Wurmsterben bei 15 °C verantwortlich ist. Die Tatsache, dass bei beiden Bakterienstämmen die *C. elegans*-Mutante bei 28 °C mindestens genauso schnell getötet wurde, wie der *C. elegans*-Wildtyp, schließt dieses jedoch als Ursache aus.

4.2.1.3 Ermittlung der minimalen Expositionszeit

Vorherige Versuche haben gezeigt, dass bei *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* unter “slow killing“-Bedingungen eine Art “Infektionsdosis“ existiert (s. 4.1.2.5), das heißt, es gibt eine Zeitspanne, die überschritten werden muss, bevor die Infektion bei *C. elegans* greift. Mit den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob es eine solche “Infektionsdosis“ auch bei *B. cepacia* gibt (Abb. 24). Aus diesem Grund wurden die Würmer unterschiedlich lange auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 belassen, bevor sie mit Hilfe eines Wurmhakens einzeln auf, mit *E. coli* OP50 bewachsene NG-Platten überführt und in regelmäßigen Abständen auf ein Sterben hin kontrolliert wurden.

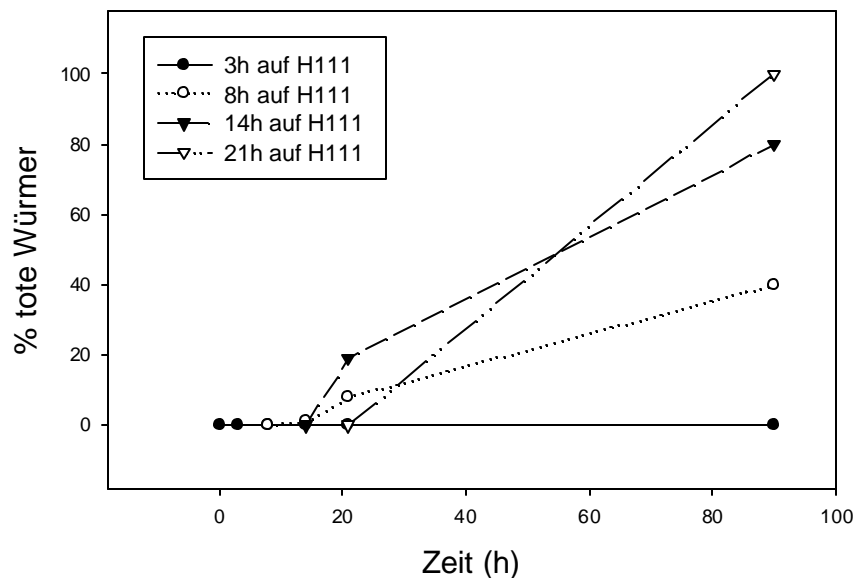


Abb. 24: *C. elegans* im Transferexperiment unter “slow killing“-Bedingungen, bei einer Temperatur von 20 °C. Nach 4 h, 22 h bzw. 32 h wurden die Würmer einzeln, mit Hilfe eines Wurmhakens, von *B. pseudomallei* heruntergenommen, auf, mit *E. coli* OP50 bewachsene NG-Platten überführt und in regelmäßigen Abständen auf ein Sterben hin kontrolliert. Es handelt sich um Einzelwerte, mit durchschnittlich 20 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Infektionszeit mit dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111.

Das Transferexperiment zeigte, dass während der Bakterienexposition unter “slow killing“-Bedingungen auch bei *B. cepacia* H111 eine bestimmte “Infektionsdosis“ notwendig ist, um *C. elegans* zu töten (Abb. 24). Eine relativ kurze Expositionszeit von 3 h konnten die Würmer unbeschadet überstehen. Die Nematoden jedoch, die 8 h, 14 h oder 21 h bakterienexponiert waren, starben nach ihrem Transfer auf *E. coli* OP50 bewachsene NG-Platten, was darauf schließen lässt, dass die Infektion nicht mehr überwunden werden konnte.

4.2.1.4 Mikroskopische Darstellung der fluoreszenzmarkierten *B. cepacia*-Stämme H111 (pUT-rfp) und H111 m64 (pBBR-5-gfp) im Verdauungstrakt von *C. elegans*

Mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten *B. cepacia*-Stämme H111 (pUT-rfp) [Abb. 25A] und H111 m64 (pBBR-5-gfp) [Abb. 25B] sollte der Verdauungstrakt von *C. elegans* auf eine mögliche Akkumulation der Bakterien hin untersucht werden. Bereits TAN et al. (1999a) hatten nachgewiesen, dass es unter “slow killing“-Bedingungen zu einer Ansammlung von *P. aeruginosa* PA14 im Darmkanal von *C. elegans* kommt. Als Negativkontrolle wurde der apathogene fluoreszenzmarkierte *E. coli*-Stamm P. Sunny 1 eingesetzt (Abb. 26).

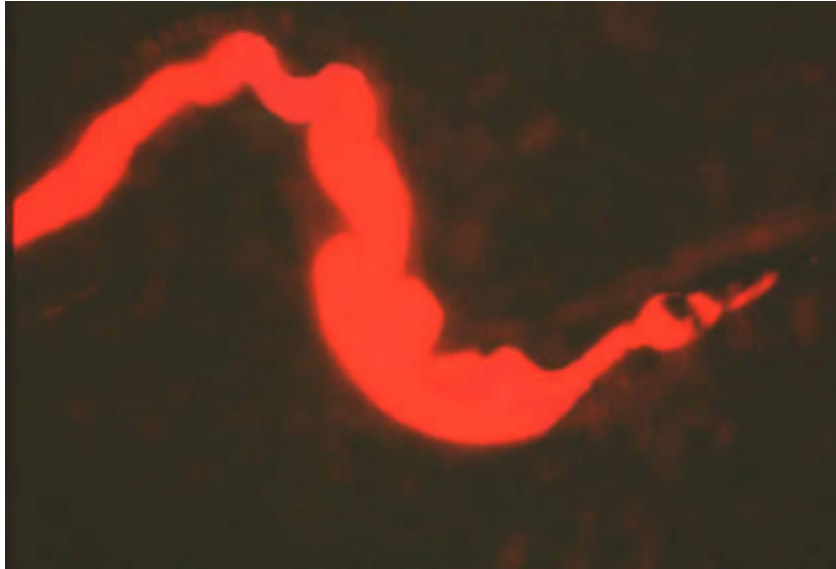
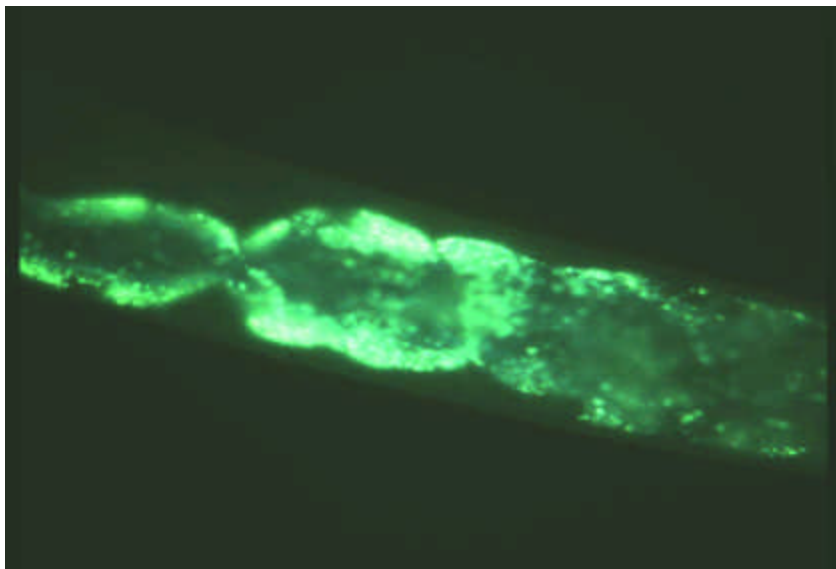
A**B**

Abb. 25: Mikroskopische Darstellung des fluoreszenzmarkierten *B. cepacia*-Wildtyp-Stammes H111 (pUT-rfp) [A] bzw. der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (pBBR-5-gfp) [B] im Verdauungstrakt eines adulten *C. elegans*-Wurms unter "slow killing"-Bedingungen. Der Nematode wurde jeweils 24 h bei einer Temperatur von 20 °C auf, mit dem entsprechenden Bakterienstamm bewachsenen NG ("slow killing")-Platten gehalten.

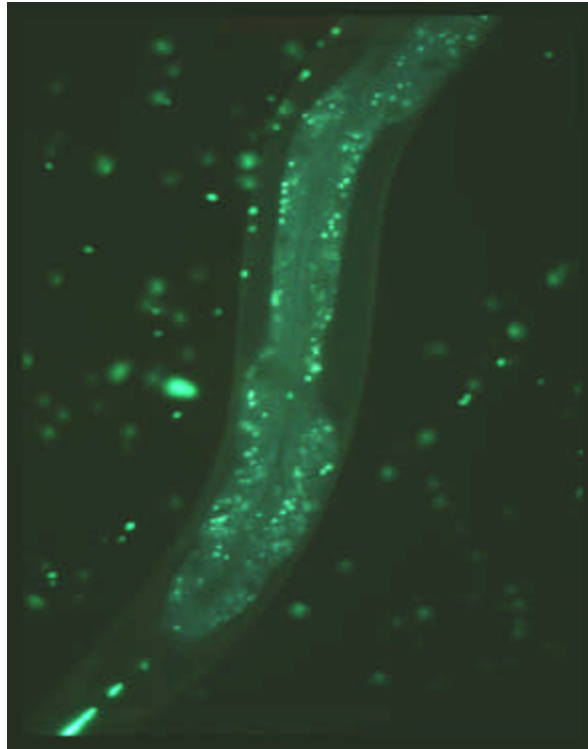


Abb. 26: Mikroskopische Darstellung des fluoreszenzmarkierten *E. coli*-Stammes P. Sunny 1 im Verdauungstrakt eines adulten *C. elegans*-Wurms unter “slow killing“-Bedingungen. Der Nematode wurde 24 h bei einer Temperatur von 20 °C auf einer, mit *E. coli* P. Sunny 1 bewachsenen NG (“slow killing“)-Platte gehalten.

Es zeigte sich, dass im Verdauungstrakt von *C. elegans* nach 24-stündiger *B. cepacia*-Wildtyp H111 (pUT-rfp)-Exposition eine hochgradige Akkumulation der Bakterien stattgefunden hatte (Abb. 25A), da das gesamte Darmlumen mit rfp-markierten Bakterien angefüllt war. Bei der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (pBBR-5-gfp) waren im Wurmdarm zwar mehrere gfp-markierte Bakterien sichtbar, eine Akkumulation im eigentlichen Sinne hatte jedoch nicht stattgefunden (Abb. 25B). Auch bei der Kontrolle mit dem apathogenen fluoreszenzmarkierten *E. coli*-Stamm P. Sunny 1 kam es zu keiner Bakterienakkumulation im Verdauungstrakt von *C. elegans* (Abb. 26).

4.2.1.5 Analyse der Keimzahlen im Verdauungstrakt von *C. elegans* mittels CFU-Bestimmung

Nachdem gezeigt wurde, dass bei *B. cepacia* H111 unter “slow killing“-Bedingungen eine Bakterienakkumulation im Verdauungstrakt von *C. elegans* stattfindet (s. 4.2.1.4), sollte nachfolgend untersucht werden, ob es auch zu einer Bakterienreplikation im Wurmdarm kommt. Aus diesem Grund wurden die Keimzahlen im Verdauungstrakt von *C. elegans* nach 24-stündiger Exposition auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 sowie nach weiteren 24 h auf *E. coli* OP50 bestimmt (Tab. 3).

Tabelle 3: Keimzahlen im Verdauungstrakt von *C. elegans* I

		CFU's/Wurmdarm nach 24 h	CFU's/Wurmdarm nach 48 h
H111	1.	10^5	alle Würmer bereits tot
	2.	$1,5 \times 10^5$	34
	3.	$0,5 \times 10^4$	0
H111 m64	1.	25	0
	2.	500	0
	3.	1	0

Die Tabelle zeigt die Keimzahlen im Verdauungstrakt von *C. elegans* nach 24-stündiger Exposition auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64, sowie nach weiteren 24 h auf *E. coli* OP50. Die Würmer wurden bei einer Temperatur von 20 °C auf, mit den entsprechenden Bakterienstämmen bewachsenen NG (“slow killing“)-Platten gehalten. Es handelt sich um die Werte von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 10 L4-Larven pro Ansatz.

Aus Tabelle 3 geht hervor, dass nach einer 24-stündigen Exposition auf *B. cepacia* H111 im Verdauungstrakt von *C. elegans* etwa $0,5 \times 10^4$ bis 1×10^5 koloniebildende Einheiten gefunden wurden, während es nach einer 24-stündigen Exposition auf der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 maximal 5×10^2 waren. Bei den Würmern, die nach der 24-stündigen *B. cepacia*-Exposition noch weitere 24 h auf einer, mit *E. coli* OP50 bewachsenen NG ("slow killing")-Platte verbracht haben, konnten anschließend so gut wie keine lebenden Bakterien mehr im Verdauungstrakt festgestellt werden. Um sicherzugehen, dass die Expositionszeit auf *B. cepacia* bzw. die anschließende Verweildauer auf *E. coli* OP50 die Ergebnisse nicht wesentlich beeinflusst, wurden nachfolgend unterschiedliche Zeitintervalle gewählt, deren Ergebnisse Tabelle 4 zu entnehmen sind.

Tabelle 4: Keimzahlen im Verdauungstrakt von *C. elegans* (CFU's / Wurmdarm) II

nachfolgende Exposition auf <i>E. coli</i> H111- Exposition	0 h	6 h	17 h	22 h	24 h
3 h	1 x 10 ⁴	-	-	103	-
8 h	0,9 x 10 ⁴	-	0	-	-
14 h	0,7 x 10 ⁴	0	-	-	-
21 h	5 x 10 ⁴	-	-	-	alle Würmer tot

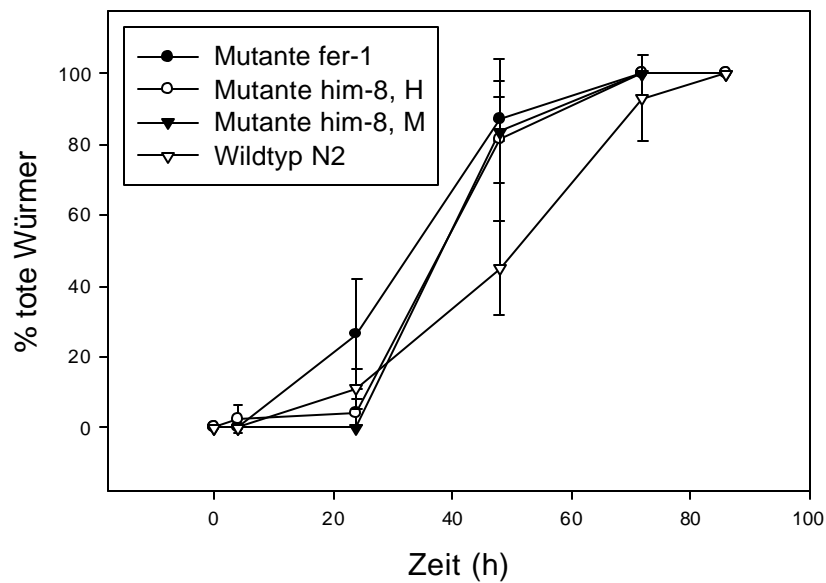
Die Tabelle zeigt die Keimzahlen (CFU's/Wurmdarm) im Verdauungstrakt von *C. elegans* nach 3-, 8-, 14- und 21-stündiger Exposition auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111, sowie nach weiteren Zeitintervallen auf *E. coli* OP50. Die Würmer wurden bei einer Temperatur von 20 °C auf, mit *B. cepacia* H111 bewachsenen NG ("slow killing")-Platten gehalten. Es handelt sich um Einzelwerte mit jeweils 10 L4-Larven pro Ansatz.

- = zu diesen Zeitpunkten erfolgten keine Keimzahlbestimmungen

Es zeigte sich, dass die Expositionszeit auf *B. cepacia* bzw. die Verweildauer auf *E. coli* OP50 keinen Einfluss auf die Keimzahlen im Verdauungstrakt von *C. elegans* hatte, da die in Tabelle 3 aufgeführten Ergebnisse durch Tabelle 4 weitgehend bestätigt wurden.

4.2.1.6 Einfluss des “egg-laying-defects“ auf das “slow killing“

Der Einfluss des, unter “slow killing“-Bedingungen bei *C. elegans* häufig auftretenden “Eiablagedefekts“ auf das Wurmsterben bei *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* wurde bereits unter 4.1.2.6 beschrieben. Mit den folgenden Versuchen sollte sein Einfluss auf das Wurmsterben bei *B. cepacia* untersucht werden (Abb. 27A u. B).

A

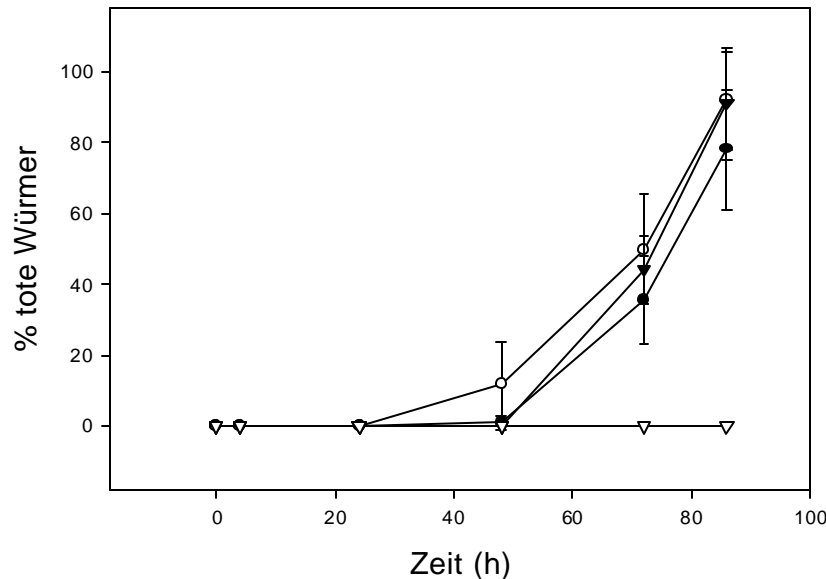
B

Abb. 27: Absterbekinetik des *C. elegans*-Wildtyps N2 sowie der Mutanten *him-8* und *fer-1* unter “slow killing“-Bedingungen bei einer Temperatur von 20 °C bzw. 25 °C (*fer-1*-Mutante). Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 (A) und auf der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (B).

Der Versuch zeigte, dass der *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 unter “slow killing“-Bedingungen nicht nur die graviden Hermaphroditen des *C. elegans*-Wildtyps N2 und die *him-8*-Hermaphroditen töteten, sondern ebenfalls die männlichen Würmer der *him-8*-Mutante, sowie die sterilen Hermaphroditen der *fer-1*-Mutante (Abb. 27A). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Absterbekinetiken der einzelnen *C. elegans*-Stämme konnte nicht festgestellt werden. Die *B. cepacia*-Mutante H111 m64 tötete die beiden *C. elegans*-Mutanten *him-8* und *fer-1*, nicht jedoch den *C. elegans*-Wildtyp N2 (Abb. 27B). Die Tatsache, dass der *C. elegans*-Wildtyp von *B. cepacia* H111 m64 nicht getötet wird, bestätigt das Ergebnis von 4.2.1.1. Das Sterben der *fer-1*-Mutante kann durch die hier gewählte höhere Versuchstemperatur von 25 °C erklärt werden, was konform geht mit dem Ergebnis von 4.2.1.2. Warum die *him-8*-Mutante im Gegensatz zum *C. elegans*-Wildtyp jedoch getötet wird, bleibt zu untersuchen.

4.2.2 Charakterisierung des “fast killings“

4.2.2.1 Absterbekinetik unter Standardbedingungen

Um nachzuweisen, ob es auch bei dem *B. cepacia*-Stamm H111 ein, dem “fast killing“ bei *B. pseudomallei* E 8 und *B. thailandensis* E 201 vergleichbares Wurmsterben gibt, wurde auch dieser Bakterienstamm im “fast killing“-Assay getestet. Außerdem sollte untersucht werden, ob es im *C. elegans*-Modell unter “fast killing“-Bedingungen einen signifikanten Unterschied zwischen dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 gibt (Abb. 28).

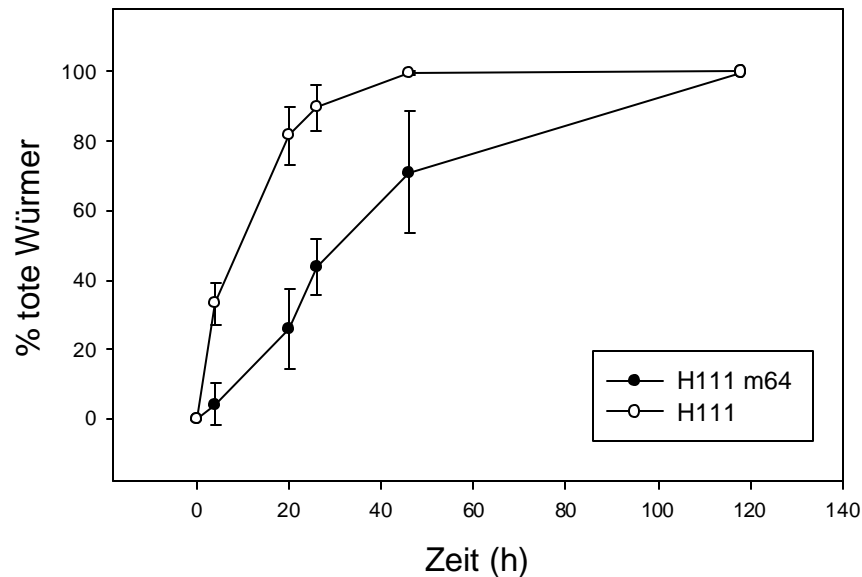


Abb. 28: Absterbekinetik von *C. elegans* auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 unter Standard-“fast killing“-Bedingungen, bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl der toten Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem entsprechenden Bakterienstamm.

Die Untersuchung des *B. cepacia*-Wildtyp-Stammes H111 im "fast killing"-Assay zeigte ein, im Vergleich zu *B. pseudomallei*/*B. thailandensis* etwas verzögertes Wurmsterben innerhalb von ca. 40 h ($LT_{50\%} = 7$ h). Die *B. cepacia*-Mutante tötete *C. elegans* erst innerhalb von 120 h ($LT_{50\%} = 33$ h), so dass von einem "fast killing" nicht mehr gesprochen werden kann (Abb. 28).

4.2.2.2 Nitrocellulose-Assay

Der nachfolgende Versuch sollte klären, ob für ein Wurmsterben unter "fast killing"-Bedingungen auch bei *B. cepacia* ein direkter Kontakt zwischen *C. elegans* und den Bakterien erforderlich ist (Abb. 29). Aus diesem Grund wurde ein Nitrocellulose-Filter mit einer Porengröße von 0,45 μm zwischen den Würmern und den Bakterien platziert. Die Würmer wurden nach 32 h vom Filterpapier heruntergespült und auf ein eventuell stattgefundenes Sterben hin kontrolliert.

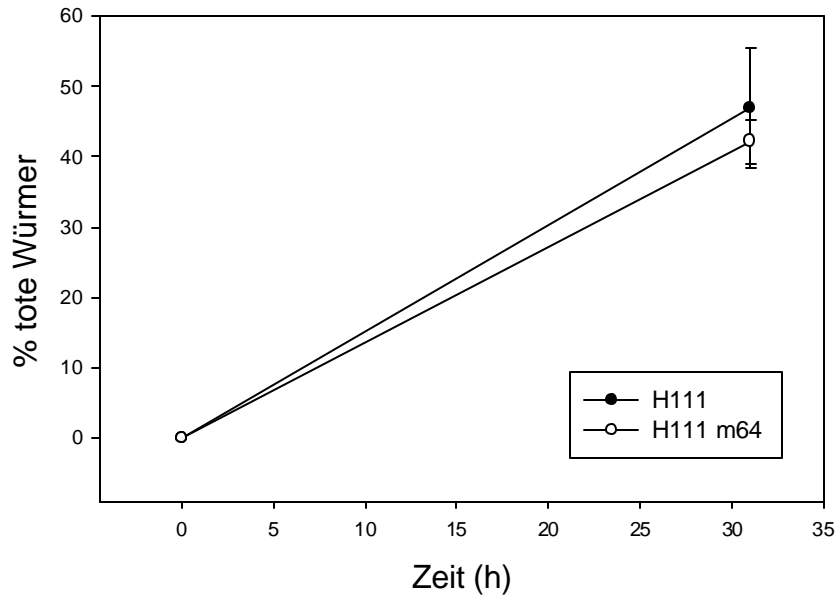
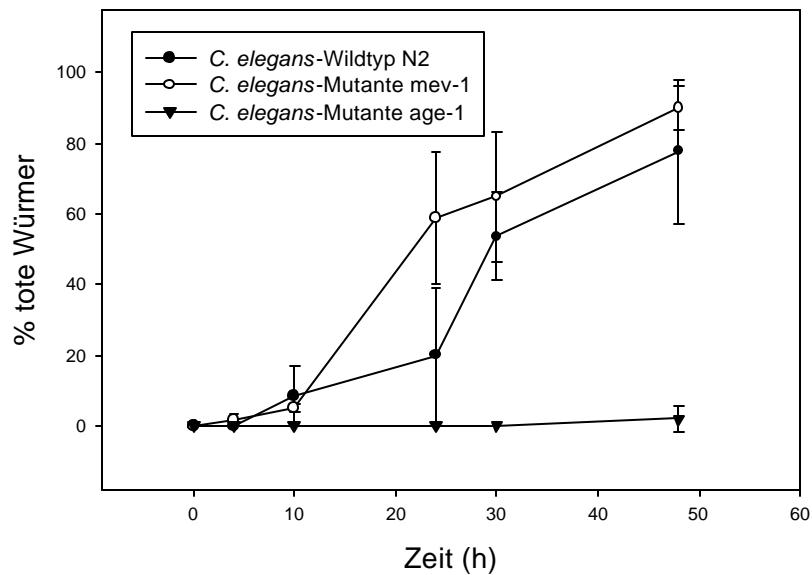


Abb. 29: *C. elegans* im Nitrocellulose-Assay unter “fast killing“-Bedingungen, bei einer Temperatur von 20 °C. *C. elegans* wurde auf Nitrocellulose-Filtern (Porengröße 0,45 µm), die auf den bakterienbewachsenen PGS (“fast killing“)-Platten lagen, gehalten. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64.

Mit dem Nitrocellulose-Assay konnte gezeigt werden, dass ein direkter Kontakt zwischen *B. cepacia* und *C. elegans* nicht erforderlich ist, um die Würmer unter “fast killing“-Bedingungen zu töten (Abb. 29). *C. elegans* starb auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 mit einer langsameren Kinetik, als im “fast killing“-Assay ohne Nitrocellulose-Filter ($LT_{50\%} > 32$ h). Die *B. cepacia*-Mutante hingegen wurde mit ähnlicher Kinetik getötet wie unter normalen “fast killing“-Bedingungen ($LT_{50\%} > 32$ h), so dass ein Virulenzunterschied zwischen den beiden Stämmen unter diesen Versuchsbedingungen nicht mehr erkennbar ist.

4.2.2.3 Einfluss von oxidativem Stress beim “fast killing“

Mit den folgenden Versuchen sollte nachgewiesen werden, ob oxidativer Stress unter “fast killing“-Bedingungen auch bei *B. cepacia* eine Rolle spielt, und wie er sich auf die *C. elegans*-Absterbekinetik auswirkt (Abb. 30A u. B). Aus diesem Grund wurden neben dem *C. elegans*-Wildtyp N2 auch noch zwei Wurmmutanten eingesetzt: die, gegenüber oxidativem Stress empfindlichere Mutante *mev-1*, und die, gegenüber oxidativem Stress resistenterere Mutante *age-1*.

A

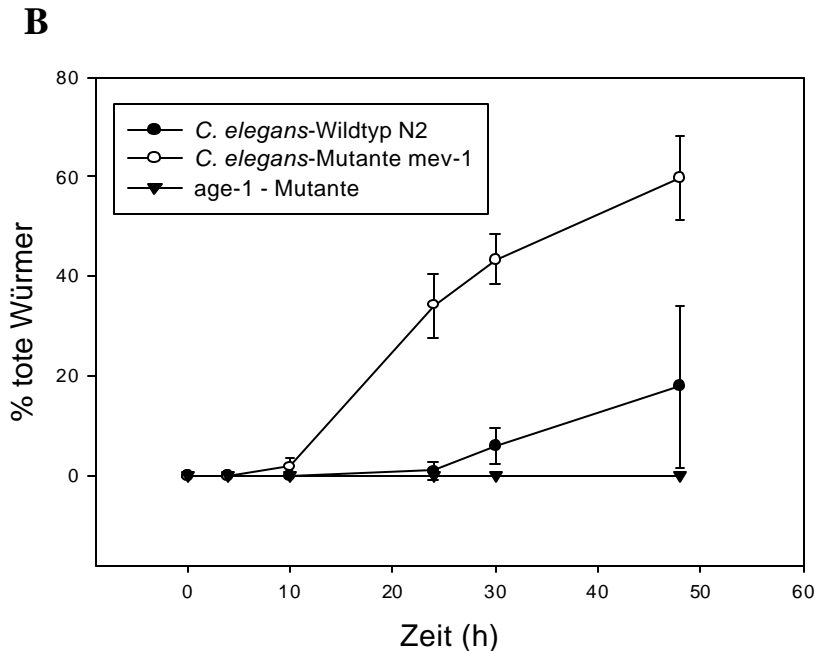


Abb. 30: Absterbekinetik des *C. elegans*-Wildtyps N2 sowie der Mutanten *mev-1* und *age-1* unter “fast killing“-Bedingungen, bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 (A) und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (B).

Es zeigte sich, dass bei *B. cepacia* unter “fast killing“-Bedingungen oxidativer Stress eine Rolle spielt. Der *B. cepacia*-Wildtyp H111 tötete die Stress-resistentere *C. elegans*-Mutante *age-1* fast gar nicht, den *C. elegans*-Wildtyp N2 mit einer $LT_{50\%}$ von 27 h und die Stress-sensitivere *C. elegans*-Mutante *mev-1* mit einer $LT_{50\%}$ von 22 h (Abb. 30A). Auf der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 starb die *age-1*-Mutante nicht, der *C. elegans*-Wildtyp wurde nur geringgradig getötet und die *mev-1*-Mutante mit einer $LT_{50\%}$ von 24 h (Abb. 30B). Somit korrelieren die Ergebnisse bei *B. cepacia* mit den von TAN et al. (1999, 2000) und MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) mit *P. aeruginosa* PA14 gemachten Ergebnissen, während im Gegensatz dazu bei *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* der *C. elegans*-Wildtyp schneller getötet wurde, als die Stress-sensitive Mutante *mev-1* (s. Abb. 14A u. B).

4.2.3 Einfluss der Kulturbedingungen auf die *C. elegans*-*B. cepacia*-Interaktionen

Da sich aufgrund der oben bereits beschriebenen Versuche herausgestellt hat, dass sich die Auswahl der Kulturbedingungen bedeutend auf die *C. elegans*-Bakterien-Interaktionen auswirkt, sollten die beiden *B. cepacia*-Stämme auch noch auf GS-Agar und auf Brain Heart Infusion (BHI)-Agar getestet werden.

Auf GS-Agar starb *C. elegans* mit einer Kinetik ähnlich der des "slow killings". Ein signifikanter Unterschied zwischen dem *B. cepacia*-Wildtyp H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Untersuchung auf BHI-Agar sollte zeigen, ob bei *B. cepacia* ein, dem von DARBY et al. (1999) beschriebenen Phänomen der "letalen Paralyse" vergleichbares Wurmsterben stattfindet (Abb. 31).

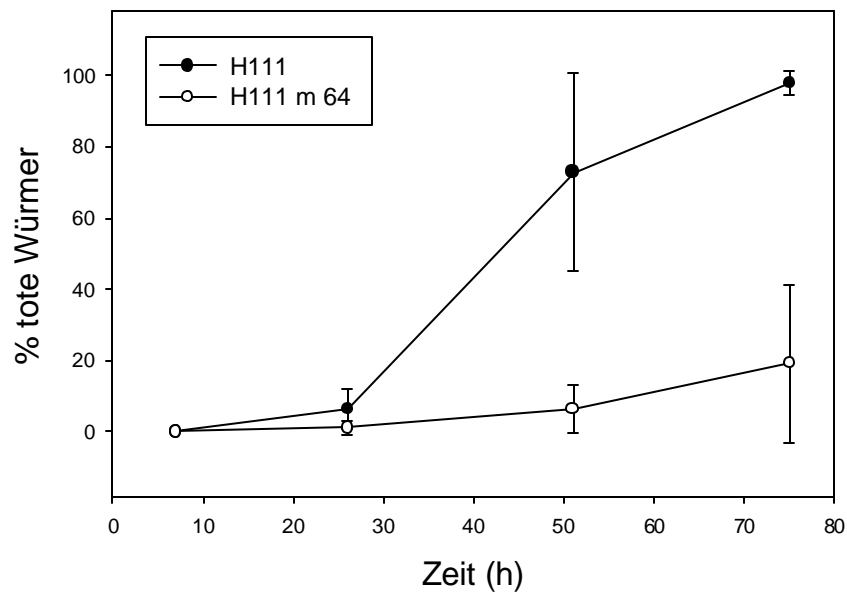


Abb. 31: Absterbekinetik von *C. elegans* auf Brain Heart Infusion (BHI)-Agar bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Versuchen, mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist, als Mittelwert mit Standardabweichung, die Anzahl toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 und der *B. cepacia*-Mutante H111 m64.

Der *B. cepacia*-Wildtyp-Stamm H111 tötete *C. elegans* auf Brain Heart Infusion-Agar mit einer Kinetik, ähnlich der des “slow killings“ auf NG-Agar ($LT_{50\%} = 43$ h). Auf der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 fand im Gegensatz zum “slow killing“-Assay zumindest ein geringgradiges Wurmsterben statt (Abb. 31).

4.3 *Burkholderia vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans* im “slow“- und “fast killing“-Assay sowie auf GS-Agar

Zusätzlich zu den beiden *B. cepacia*-Stämmen H111 und H111 m64 sollten zu Vergleichszwecken noch zwei weitere Stämme aus dem *Cepacia*-Komplex, nämlich *B. vietnamiensis* und *B. multivorans* sowie *B. gladioli* hinsichtlich ihrer Pathogenität gegenüber *C. elegans* unter “slow killing“-Bedingungen (Tab. 5), “fast killing“-Bedingungen (Tab. 6) und auf GS-Agar (Tab. 7) untersucht werden.

Tabelle 5: Prozentualer Anteil toter *C. elegans*-Würmer unter “slow killing“-Bedingungen, nach unterschiedlich langen Expositionszeiten auf den Bakterienstämmen *B. vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans*.

	4 h	10 h	24 h	48 h	120 h
<i>B. vietnamiensis</i> 5223	0%	0%	0%	0%	0% Vermehrung +++
<i>B. gladioli</i> 46897	0%	0%	0%	0%	0% Vermehrung +
<i>B. multivorans</i> 208	0%	0%	0%	0%	0% Vermehrung +++

Tabelle 5 zeigt das Verhalten der Stämme *B. vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans* unter “slow killing“-Bedingungen, bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um Einzelwerte mit durchschnittlich 40 adulten Würmern pro Ansatz. Dargestellt ist der prozentuale Anteil toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem jeweiligen Bakterienstamm.

Tabelle 6: Prozentualer Anteil toter *C. elegans*-Würmer unter “fast killing“-Bedingungen, nach unterschiedlich langen Expositionszeiten auf den Bakterienstämmen *B. vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans*.

	4 h	10 h	24 h	48 h	120 h
<i>B. vietnamiensis</i> 5223	0%	0%	0%	4,3%	Vermehrung +++
<i>B. gladioli</i> 46897	0%	0%	0%	0,8%	Vermehrung +
<i>B. multivorans</i> 208	0%	0%	0%	4,9%	Vermehrung +++

Tabelle 6 zeigt das Verhalten der Stämme *B. vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans* unter “fast killing“-Bedingungen bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um Einzelwerte mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist der prozentuale Anteil toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem jeweiligen Bakterienstamm.

Tabelle 7: Prozentualer Anteil toter *C. elegans*-Würmer auf GS-Agar, nach unterschiedlich langen Expositionszeiten auf den Bakterienstämmen *B. vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans*.

	4 h	10 h	24 h	48 h	120 h
<i>B. vietnamiensis</i> 5223	0%	0%	0%	0%	0% Vermehrung +
<i>B. gladioli</i> 46897	0%	0%	0%	0%	0% Vermehrung +
<i>B. multivorans</i> 208	0%	0%	0%	0%	0% Vermehrung +++

Tabelle 7 zeigt das Verhalten der Stämme *B. vietnamiensis*, *B. gladioli* und *B. multivorans* auf GS-Agar bei einer Temperatur von 20 °C. Es handelt sich um Einzelwerte mit durchschnittlich 40 L4-Larven pro Ansatz. Dargestellt ist der prozentuale Anteil toter Würmer in Abhängigkeit von der Expositionszeit auf dem jeweiligen Bakterienstamm.

Weder *B. vietnamiensis*, noch *B. gladioli* oder *B. multivorans* töteten *C. elegans* unter “slow killing“-Bedingungen (Tab. 5), “fast killing“-Bedingungen (Tab. 6) oder auf GS-Agar (Tab. 7). Auf allen untersuchten Stämmen fand zumindest eine geringgradige Vermehrung der Würmer statt. Auf *B. gladioli* erfolgte in allen drei Assays die geringste Populationszunahme, und die Würmer waren anscheinend nicht in der Lage, die Bakterien zu verstoffwechseln. Auf *B. multivorans* vermehrte sich *C. elegans* unter Verstoffwechslung der Bakterien in allen Assays hochgradig. Bei *B. vietnamiensis* fand unter “slow“- und “fast killing“-Bedingungen eine hochgradige Populationszunahme mit Verstoffwechslung der Bakterien statt, auf GS-Agar vermehrten sich die Würmer nur geringgradig und fraßen die Bakterien nicht.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der *B. pseudomallei*-, *B. thailandensis*- und *B. cepacia*-*C. elegans*-Interaktionen unter "slow killing"-Bedingungen

Wächst *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* bzw. *B. cepacia* auf dem nährstoffärmeren NG ("Nematode Growth")-Agar, so kommt es zum sogenannten "slow killing"-Effekt, was bedeutet, dass *C. elegans* innerhalb von 2 Tagen getötet wird. Mit zunehmender Expositionsdauer lässt die Motilität und die pharyngeale Pumpleistung der Würmer nach, bis sie schließlich unbeweglich werden und sterben. Innerhalb von 24-48 h erfolgt die Zersetzung der toten Würmer, die letztlich nur noch als leere Hülle erkennbar sind. Mit Ausnahme der ungeschlüpften Embryonen ist jedes *C. elegans*-Entwicklungsstadium empfänglich.

Während die Absterbekinetik bei *B. cepacia* im Vergleich zu *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* stark verzögert abläuft (Abb. 22, S. 85), ist zwischen den anderen beiden Spezies kein Unterschied erkennbar (Abb. 3, S. 55). An dieser "slow killing"-Absterbekinetik ist laut TAN et al. (1999) zumindest bei *P. aeruginosa* PA14 ein infektiions-ähnlicher Prozess beteiligt. Verhungern aufgrund sistierender Nahrungsaufnahme kann als Todesursache ausgeschlossen werden, da *C. elegans* keinen der untersuchten Bakterienstämme als Futterquelle meidet. Die Würmer sind demnach nicht in der Lage, die pathogene Wirkung der ihnen angebotenen Nahrung zu erkennen. Da im *C. elegans*-*P. aeruginosa*-Modell von TAN et al. (1999a) unter "slow killing"-Bedingungen für eine Infektion lebende Bakterien erforderlich sind, sollte zunächst geklärt werden, ob *C. elegans* auch durch hitzeinaktivierte Bakterien getötet wird. Sowohl *B. pseudomallei* als auch *B. thailandensis* töteten die Würmer in hitzeinaktiviertem Zustand nicht mehr, was für die Notwendigkeit lebender Bakterien beim "slow killing" spricht. Dieses Ergebnis bestätigt somit die von TAN et al. (1999a) bereits mit *P. aeruginosa* gemachten Beobachtungen.

Um herauszufinden, welche Auswirkungen die vom Wurm aufgenommenen Bakterien auf dessen Verdauungstrakt haben, wurde der rfp-markierte *B. cepacia*-Stamm H111 (pUT-rfp) *C. elegans* als Nahrungsquelle angeboten. Nach 24-stündiger Bakterienexposition wurden die Würmer

fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Es zeigte sich innerhalb des gesamten erweiterten Darmlumens eine intensive rote Fluoreszenz, die auf eine stattgefundene Akkumulation der rfp-markierten Bakterien im Verdauungstrakt des Wurmes schließen lässt (Abb. 25, S. 90). Im Vergleich dazu zeigte ein gfp-markierter *E. coli*-Kontrollstamm (*E. coli* P. Sunny 1) nur eine geringe Fluoreszenz einzelner Bakterien (Abb. 26, S. 91). Hiermit konnte bewiesen werden, dass unter Verwendung der natürlichen Nahrungsquelle bei *C. elegans* keine Bakterienakkumulation im Darmtrakt stattfindet. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Wurmsterben unter "slow killing"-Bedingungen mit einer Akkumulation der pathogenen Bakterien im Verdauungstrakt von *C. elegans* assoziiert ist, was TAN et al. (1999a) bereits für *P. aeruginosa* nachgewiesen hatten. LABROUSSE et al. (2000) machten während ihrer Untersuchungen die Beobachtung, dass der im Pharynx lokalisierte "Grinder", der normalerweise zur Zerkleinerung der aufgenommenen Bakterien dient, durch *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Typhimurium* geschädigt wird. Während der ersten 24 h einer Salmonelleneexposition passierten nur wenige Bakterien den "Grinder", während es im Anschluss daran zu einer hochgradigen Akkumulation im Verdauungstrakt kam. Die dadurch bedingte Erweiterung des Darmlumens war verbunden mit einer merklichen Abnahme an Intestinalzellen. Gleichzeitig wurden die Zellen innerhalb des Pharynx zerstört und durch pathogene Bakterien ersetzt, deren weitere Ausbreitung jedoch durch die, den gesamten Pharynx umgebende Basalmembran verhindert wurde. Bei Kontrollversuchen mit *E. coli* OP50 behielten die Intestinalzellen ihre ursprüngliche Morphologie bei, und der Pharynx blieb intakt. In welchem Ausmaß es auch bei *B. cepacia* H111 (pUT-rfp) unter "slow killing"-Bedingungen zu einer Schädigung der Intestinalzellen kommt, müsste in nachfolgenden Versuchen mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen geklärt werden.

Inwieweit es auch zu einer Proliferation der Bakterien im Verdauungstrakt von *C. elegans* kommt, sollte mit Hilfe einer Keimzahlbestimmung herausgefunden werden. Die Untersuchungen zeigten, dass sich nach einer 24-stündigen *B. cepacia* H111-Exposition durchschnittlich 10^4 - 10^5 koloniebildende Einheiten im Wurmdarm befanden, während nach 24-stündiger *B. cepacia* H111-Exposition und anschließenden weiteren 24 h auf *E. coli* OP50 kaum noch lebende Bakterien nachgewiesen werden konnten (durchschnittlich 11 koloniebildende Einheiten pro Wurmdarm). Dennoch starben diese Würmer ebenso, wie die ausschließlich mit *B. cepacia* kolonisierten Würmer. Auch eine kürzere Bakterienexposition bzw. eine kürzere nachfolgende Verweildauer der Würmer auf *E. coli* OP50 brachte keine Veränderung der Ergebnisse, so dass der Zeitfaktor in diesem Versuch keine Rolle zu spielen scheint. Eine Proliferation der Bakterien unter

“slow killing“-Bedingungen konnte somit, im Gegensatz zu den Untersuchungen von ABALLAY et al. (2000), die eine Proliferation des *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Typhimurium*-Stammes SL1344-GFP im Darmtrakt von *C. elegans* beobachten konnten, nicht nachgewiesen werden. Ob die, im Darmtrakt akkumulierten Bakterien eventuell durch die nachfolgend aufgenommenen *E. coli* OP50-Bakterien verdrängt worden sind, müsste in nachfolgenden Versuchen geklärt werden. Des weiteren sollte gezeigt werden, ob bei *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* und *B. cepacia* eine Art “Infektionsdosis“ existiert, das heißt, ob es eine Zeitspanne gibt, die überschritten werden muss, bevor die Infektion bei *C. elegans* greift. Die Tatsache, dass die Würmer eine kurze Bakterienexposition von 3-4 h unbeschadet überstanden, während sie bei länger dauernder Exposition starben, zeigt, dass die Aufnahme einer bestimmten “Infektionsdosis“ für ein effektives Wurmsterben notwendig ist (Abb. 6, SS. 60/61; Abb. 24, S. 88).

Es gibt verschiedene Faktoren, die das “slow killing“ beeinflussen, wobei zum einen die Umgebungstemperatur eine bedeutende Rolle spielt. Je höher die Temperatur ist, wobei die Würmer Temperaturen über 30 °C nicht mehr tolerieren, desto schneller wird *C. elegans* getötet. Mit dem Einsatz der, in ihrer pharyngealen Pumpleistung herabgesetzten *C. elegans*-Mutante *eat-1* sollte ausgeschlossen werden, dass das verminderte Wurmsterben bei niedrigeren Temperaturen an einer infolge dessen gesenkten pharyngealen Pumpleistung liegt. Wäre dies der Grund gewesen, hätte die Mutante bei 28 °C langsamer getötet werden müssen, als der *C. elegans*-Wildtyp. Dies war jedoch nicht der Fall, so dass eine herabgesetzte pharyngeale Pumpleistung als Ursache ausgeschlossen werden kann (Abb. 4, SS. 56/57; Abb. 23, SS. 86/87). TAN et al. (1999a) machten ähnliche Beobachtungen mit *P. aeruginosa* PA14 und sahen dies als Beweis dafür, dass die Bakterien im Verdauungstrakt von *C. elegans* bei höheren Temperaturen stärker replizieren als bei niedrigeren Temperaturen, und die Würmer somit auch schneller sterben. Allerdings könnten hierfür auch andere Gründe in Betracht gezogen werden. Es wäre beispielsweise denkbar, dass bestimmte Virulenzfaktoren der Bakterien erst bei höheren Temperaturen exprimiert werden.

Des weiteren wird das “slow killing“ durch das Entwicklungsstadium der eingesetzten Würmer beeinflusst, wobei die adulten Würmer empfindlicher sind, das heißt schneller sterben, als die L4-Larven (Abb. 5, S. 59). Aus welchem Grund die adulten Würmer sensitiver sind, ist nicht genau geklärt, es könnte jedoch daran liegen, dass die weniger weit entwickelten Larvenstadien langsamer und weniger fressen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre der sogenannten “Eiablagedefekt“, der unter “slow killing“-Bedingungen häufig bei den graviden Hermaphroditen beo-

bachtet werden kann. Dieser "Eiablagedefekt" tritt nur im "slow killing" auf und ist gekennzeichnet durch die Unfähigkeit der adulten Würmer, ihre Eier abzulegen. Diese reifen im Mutterleib heran, in dem es dann zum Schlüpfen der Embryonen kommt (Abb. 8, S. 64). Die geschlüpften Larven fressen den Mutterwurm von Innen her auf und werden schließlich, nach Aufbrechen der Wurmhülle, freigesetzt. Um herauszufinden, inwieweit das "slow killing" das Resultat dieses "Eiablagedefekts" ist, wurden männliche Würmer der *C. elegans*-Mutante *him-8* sowie sterile Hermaphroditen der *C. elegans*-Mutante *fer-1*, die beide keinen "Eiablagedefekt" entwickeln können, auf ein mögliches Sterben unter *B. pseudomallei*-, *B. thailandensis*- (Abb. 7; SS. 62/63) und *B. cepacia*-Einfluss (Abb. 27, SS. 95/96) untersucht. Es zeigte sich, dass auch diese Würmer getötet wurden, so dass das Schlüpfen der Larven innerhalb des Mutterleibes nicht die alleinige Todesursache des "slow killings" sein kann.

TAN et al. (1999) screeneten etwa 2.400 *P. aeruginosa* PA14-Mutanten im "slow killing"-Assay und identifizierten dabei LasR, LemA und GacA als für die Pathogenität im *C. elegans*-Modell wichtige Virulenzfaktoren. Diese Proteine bilden eine Kaskade miteinander interagierender Proteine, welche die Transskription und den Export von Virulenzfaktoren über den sogenannten Typ II-Sekretionsmechanismus regulieren. LasR bildet zusammen mit LasI eines der beiden "Quorum sensing"-Systeme in *P. aeruginosa*, welches für die Regulation vieler virulenzassoziiierter Gene verantwortlich ist. GacA und LemA gehören zu einem Zweikomponenten-Signalübertragungsweg, wobei GacA, abhängig von der Zelldichte, verschiedene Exoprodukte und Virulenzfaktoren reguliert (TAN et al., 1999b). Weiterhin konnten TAN et al. (1999b) nachweisen, dass *gacA*- und *lasR*-Mutanten ihre Fähigkeit zur Akkumulation im Verdauungstrakt von *C. elegans* verloren hatten, so dass angenommen werden kann, dass die Festsetzung und/oder Proliferation der Bakterien innerhalb des Wirtes durch die oben genannte Regulationskaskade beeinflusst wird.

5.2 Charakterisierung der *B. pseudomallei*-, *B. thailandensis*-und *B. cepacia*-*C. elegans*-Interaktionen unter "fast killing"-Bedingungen

Wächst *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* bzw. *B. cepacia* auf dem hochosmolaren PGS ("Pepton Glucose Sorbitol")-Agar, so kommt es zum sogenannten "fast killing"-Effekt, was bedeutet, dass *C. elegans* innerhalb weniger Stunden getötet wird. Schon nach etwa 4 h kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Wurmmotilität und zu einem Sistieren der pharyngealen Pumpaktivität. Vereinzelt können bei den Würmern spasmische Zuckungen beobachtet werden, einige Nematoden nehmen vor ihrem Tod eine aufgerollte Körperhaltung ein. Während bei *B. cepacia* die Absterbekinetik etwas verzögert abläuft (Abb. 28, S. 97), ist zwischen *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* kein Unterschied erkennbar (Abb. 9, S. 65).

MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) konnten anhand von Untersuchungen mit *P. aeruginosa* PA14 nachweisen, dass an dieser Absterbekinetik unter "fast killing"-Bedingungen niedermolekulare diffundierbare Toxine, insbesondere Phenazine, beteiligt sind. Die Osmolarität des Mediums scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) beobachteten einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Sorbitol-Konzentration im PGS-Agar und der Absterbekinetik von *C. elegans* und stellten die Hypothese auf, dass entweder die erhöhte Osmolarität die Expression bestimmter Toxine induziert, oder dass die erhöhte Osmolarität die Empfindlichkeit der Würmer für die Toxine steigert. Einen Infektionsprozess, wie er unter "slow killing"-Bedingungen auftritt, schlossen sie aufgrund der schnellen Absterbekinetik als Todesursache aus. Um zu klären, ob auch bei *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* Toxine für das "fast killing" verantwortlich sind, wurde mit Hilfe des Nitrocellulose-Assays die Notwendigkeit eines direkten Kontaktes zwischen Bakterien und Würmern untersucht. *C. elegans* wurde, analog zum "fast killing"-Assay ohne NC-Filter, auch ohne direkten Bakterienkontakt getötet, was für das Vorhandensein von Exotoxinen spricht (Abb. 13, S. 70). Gegen Ende meiner Arbeit wurden von O'QUINN et al. (2001) Untersuchungen publiziert, die sich mit dem Einfluss von *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* auf *C. elegans* befassen. Die von ihnen gemachten Beobachtungen in Bezug auf das Vorhandensein von Exotoxinen stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da O'QUINN et al. (2001) kein Exotoxin-vermitteltes Wurmsterben feststellen konnten. Es ist anzunehmen, dass methodische Unterschiede in der Durchführung der Experimente für die Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich sind, da O'QUINN et al. (2001) bei ihren Untersu-

chungen MYOB-Agar anstelle von PGS-Agar sowie Nylonfilter anstelle von Nitrocellulosefiltern verwendeten. Es ist denkbar, dass Abweichungen in der Methodik zu quantitativen und/oder qualitativen Unterschieden in der Verfügbarkeit der Toxine führen. Auch bei *B. cepacia* konnte mit Hilfe des Nitrocellulose-Assays ein Vorhandensein von Exotoxinen bewiesen werden (Abb. 29, S. 99).

Um zu überprüfen, ob für das "fast killing" lebende Bakterien erforderlich sind, wurden *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* im hitzeinaktivierten Zustand eingesetzt. Anders als im *P. aeruginosa*-*C. elegans*-Modell von TAN et al. (1999a), fand auf hitzeinaktiviertem *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* kein Wurmsterben mehr statt. Dieses Ergebnis macht eine Beteiligung hitzestabiler Moleküle, wie die am *P. aeruginosa*-"fast killing" beteiligten Phenazine, unwahrscheinlich. Vielmehr scheinen für das "fast killing" auf *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* hitzelabile Toxine verantwortlich zu sein. MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) vermuteten eine Beteiligung von Phenazinen, insbesondere von Pyocyanin, an der toxischen Wirkung von *P. aeruginosa* PA14 auf *C. elegans* unter "fast killing"-Bedingungen. In vitro-Studien hatten gezeigt, dass Pyocyanin unter aeroben Bedingungen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen, wie Superoxid und Hydrogenperoxid führt (SORENSEN u. JOSEPH, 1993). Um zu überprüfen, ob die toxische Wirkung des Pyocyanins in vivo ebenfalls auf die Erzeugung reaktiver Sauerstoffverbindungen zurückgeführt werden kann, testeten MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) *C. elegans*-Mutanten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress auf ihre Resistenz bzw. Sensibilität für das "fast killing". In Anlehnung daran sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob auch *B. pseudomallei*-, *B. thailandensis*- und *B. cepacia*-Exposition unter "fast killing"-Bedingungen bei *C. elegans* zu oxidativem Stress führt. Es zeigte sich, dass tatsächlich die stress-resistentere *C. elegans*-Mutante *age-1* (weist eine höhere Aktivität der beiden Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase auf) langsamer starb als der *C. elegans*-Wildtyp, so dass auch hier der toxische Effekt durch oxidativen Stress zustande zu kommen scheint. Die stress-sensitivere Mutante *mev-1* (besitzt eine erhöhte Sensitivität für den Superoxidbildner Methyl-Viologen) zeigte jedoch keine erhöhte Sensitivität und unterstützt somit die These des oxidativen Stresses nicht. Während bei *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* der *C. elegans*-Wildtyp N2 noch empfindlicher war und schneller getötet wurde als die *mev-1*-Mutante (Abb. 14, SS. 71/72), lag die Absterbekinetik bei *B. cepacia* zwischen der der beiden *C. elegans*-Mutanten und korrelierte so mit den *P. aeruginosa*-Ergebnissen von MAHAJAN-MIKLOS et al. (Abb. 30, SS. 100/101). Die Resistenz bzw. Empfindlichkeit der Würmer gegenüber oxidativem

Stress ist demnach korreliert mit ihrer Resistenz bzw. Empfindlichkeit für das “fast killing“. Laut MAHAJAN-MIKLOS et al. (1999) wäre ein möglicher Wirtsabwehrmechanismus, die von den aufgenommenen Bakterien sezernierten Toxine mittels einer P-Glykoprotein-Pumpe wieder aus der Zelle auszuschleusen, um somit die toxische Wirkung zu verringern (MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; FINLAY, 1999).

Versuche mit P-Glykoprotein-defizienten *C. elegans*-Mutanten zeigten, dass diese Mutanten in Bezug auf das “fast killing“ wesentlich sensitiver waren, als der *C. elegans*-Wildtyp (MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999). Diese Mutanten zeigten nach einer Infektion mit Pyocyanin-defizienten *P. aeruginosa* PA14-Mutanten keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem “fast killing“ mehr, blieben aber sensitiv gegenüber PA14-Stämmen, die normale Pyocyanin-Mengen produzierten, aber einen Mangel an anderen Virulenzfaktoren aufwiesen. Obwohl Phenazine wichtige Mediatoren beim “fast killing“ darstellen, sind zusätzlich noch andere Faktoren in diesen Prozess involviert.

Es gibt verschiedene Faktoren, die das “fast killing“ mit *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* beeinflussen. Ein wichtiger Einflussfaktor ist, wie auch beim “slow killing“ beschrieben, die Temperatur. Je höher die Umgebungstemperatur ist, bei der die Versuche ablaufen, desto schneller wird *C. elegans* getötet (Abb. 10, S. 66). Auch hier könnte geschlossen werden, dass bei höheren Temperaturen andere Virulenzfaktoren exprimiert werden. Eine weitere Theorie wäre, dass durch die schnellere Bakterienreplikation bei höheren Temperaturen mengenmäßig mehr Toxine produziert werden.

Des Weiteren wird die Absterbekinetik unter “fast killing“-Bedingungen durch das eingesetzte Entwicklungsstadium von *C. elegans* beeinflusst. Hier sind im Gegensatz zum “slow killing“ die L4-Larven sensitiver, als die adulten Würmer (Abb. 11, S. 68). Der genaue Grund hierfür ist nicht bekannt.

Auch die Bakterienmenge spielt beim “fast killing“ eine bedeutende Rolle: mit zunehmender Bakterienkonzentration steigt auch die Empfindlichkeit von *C. elegans*, das heißt, es kommt zu einem schnelleren Wurmsterben, als bei niedriger Bakterienkonzentration (Abb. 12, S. 69). Das liegt mit Sicherheit darin begründet, dass mehr Bakterien auch mehr Virulenzfaktoren produzieren können, und es somit zu einer schnelleren Schädigung der Würmer kommt. Im “slow killing“ konnte ein Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration und dem Wurmsterben nicht beobachtet werden, was, wenn man annimmt, dass es sich hierbei um einen Infektionsprozess

handelt und die Würmer pro Zeiteinheit nur eine bestimmte Menge an Bakterien aufnehmen können, durchaus nachvollziehbar ist.

O'QUINN et al. (2001) untersuchten *B. pseudomallei* Knock-out-Mutanten mit Defekten im Aminoglykosid- und Makrolid-Effluxtransport, in der Lipopolysaccharid O-Antigensynthese und im Typ II Protein-Sekretionsmechanismus, sowie eine Flagellinmutante. Keine dieser Mutanten zeigte jedoch ein signifikant verringertes Wurmsterben. Sie stellten jedoch in ihren Untersuchungen fest, dass UV-inaktivierter *B. pseudomallei* *C. elegans* nicht mehr tötete, wohingegen mit Gammastrahlen ($^{60}\text{Co} = 1,4 \times 10^6$ rad) behandelter *B. pseudomallei* seine wurmtötenden Eigenschaften behielt, obwohl bei dieser Dosis keine koloniebildenden Einheiten mehr nachweisbar waren. Die Würmer wiesen unter diesen Bedingungen eine geringere Obstipation auf, und die Absterbekinetik verlief 2-4fach langsamer, als bei einer Exposition mit lebenden Bakterien. Diese Ergebnisse veranlassten O'QUINN et al. (2001) zu der Annahme, dass der *C. elegans*-Absterbeprozess auf MYOB-Agar sowohl durch eine Intoxikation mit einem UV-sensitiven und Gammastrahlen-resistenten Toxin, als auch durch zusätzliche, von lebenden Bakterien abhängige Faktoren hervorgerufen wird. Die einfachste Interpretation wäre, dass lebende/proliferierende Bakterien größere Mengen des Toxins liefern können.

Die Tatsache, dass es unter den von ihnen gewählten experimentellen Bedingungen (MYOB-Agar) zum Sistieren der pharyngealen Pumpaktion und der Wurmmotilität kommt, sahen O'QUINN et al. (2001) als Konsequenz eines bakteriellen Virulenzfaktors an, der sich entweder auf die, diese Aktionen kontrollierenden Neuronen auswirkt, oder auf die Fähigkeit der Muskulatur, auf normale neuronale Stimuli zu reagieren. Dieses spricht für die Beteiligung eines Neurotoxins oder eines paralytisch wirkenden Agens an der *C. elegans*-Absterbekinetik. Frühe toxikologische Untersuchungen von *B. pseudomallei* legen das Vorhandensein einer neurotoxischen/paralytischen Aktivität nahe (NIGG et al., 1958). Über Fälle einer neurotoxischen Verlaufsform der Melioidose bei Mensch und Tier wurde berichtet (NARITA, 1982; WOODS et al., 1992; SMITH et al., 1997). O'QUINN et al. (2001) stellten weiterhin fest, dass sich Mutationen bei *C. elegans*, die die physiologische Ca^{2+} -Signalübertragung unterbrechen, auf die Überlebensrate der Würmer auswirkten. Der durch die Gene *egl-19* und *unc-36* kodierte *C. elegans* L-Typ Ca^{2+} -Kanal liefert das Ca^{2+} , welches für die Signalübertragungsprozesse erforderlich ist, die durch das Calcium- und Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) Gen *unc-43* vermittelt werden. Mutationen mit einem Funktionsverlust in den L-Typ Ca^{2+} -Kanal

Untereinheiten, die sowohl in der Körperwandmuskulatur (*unc-36*) als auch in den neuromuskulären Verbindungen (*egl-19*) exprimiert werden, führten zu einer Abnahme der *C. elegans*-Überlebensrate, da es infolge einer Hemmung der prae- und postsynaptischen Signalübertragung zur Paralyse der Würmer kam. Die verursachte Paralyse und der Tod von *C. elegans* scheinen das Resultat einer toxinvermittelten Unfähigkeit zu sein, dass Ca^{2+} -Membranpotential wiederherzustellen. Untersuchungen zeigten, dass *unc-36lf/egl-19lf*-Doppelmutanten gegenüber *B. pseudomallei* sensitiver sind, als Würmer mit nur einer Mutation, so dass anscheinend sowohl die Körperwandmuskulatur (*unc-36*), als auch die neuromuskulären Verbindungen (*egl-19*) Angriffspunkt der Bakterien sind. Gain-of-function-Mutationen im *egl-19* (*n2368sd*- und *egl-19* (*ad695sd*)-Gen führten zu einer Zunahme der *C. elegans*-Überlebensrate. UHLEN et al. (2000) fanden heraus, dass auch die Pathogenese von uropathogenen *E. coli*-Stämmen über einen Mechanismus erfolgt, der die wirtseigenen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle betrifft, so dass der Angriff von Prokaryonten auf eukaryontische "second messenger" Signalwege eine verbreitete Pathogenesestrategie zu sein scheint.

5.3 *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* und *B. cepacia* unter modifizierten Kulturbedingungen

Inwieweit die gewählten Kulturbedingungen die *C. elegans*-Absterbekinetik beeinflussen können, wurde oben bereits beschrieben. Neben dem "slow"- und "fast killing" konnten DARBY et al. (1999) in ihren Untersuchungen mit dem *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 eine weitere Möglichkeit des Wurmsterbens beobachten, die sogenannte "letale Paralyse". Diese Absterbekinetik tritt beim Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 auf Brain Heart Infusion-Agar auf und ist gekennzeichnet durch eine innerhalb von 4 h auftretende tödlich verlaufende neuromuskuläre Lähmung der Würmer. Laut DARBY et al. (1999) sind für diese Paralyse ein oder mehrere diffundierbare Faktoren verantwortlich, die unter der Kontrolle der "Quorum sensing"-Regulatoren LasR und RhIR stehen. Durch den Einsatz von *P. aeruginosa*-Mutanten konnten die sezernierten Proteine Exotoxin A, Exoenzym S, staphylolytische Protease, Elastase, alkalische Protease, hämolytische Phospholipase C und nicht-hämolytische Phospholipase C als verursachende Agenzien ausge-

geschlossen werden. DARBY et al.(1999) konnten mit Hilfe der *C. elegans*-Mutante *egl-9* nachweisen, dass das "fast killing" bei PA14 und die "letale Paralyse" bei PAO1 unterschiedliche Phänomene darstellen und somit auch unterschiedliche Toxine an den beiden Absterbekinetiken beteiligt sein müssen. In meiner Arbeit konnte nach Wachstum von *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* und *B. cepacia* auf Brain Heart Infusion-Agar keine "letale Paralyse" bei *C. elegans* beobachtet werden. Die Würmer starben unter diesen Bedingungen mit einer, der des "slow killings" vergleichbaren Kinetik.

In einer kürzlich publizierten Arbeit konnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen im *C. elegans*-Modell Ara^- (virulente) *B. pseudomallei*-Stämme von Ara^+ (avirulenten) *B. thailandensis*-Stämmen nicht unterschieden werden (O'QUINN et al., 2001). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Kultivierungsbedingungen weiter modifiziert, in der Hoffnung, ein Nährmedium zu finden, welches den Virulenzunterschied der beiden Bakterienstämme auch im Wurmmodell deutlich macht. Obwohl die meisten der untersuchten Medien ("slow killing"-Agar, "fast killing"-Agar, Brain Heart Infusion-Agar, Acanthamöbenagar und NG-Agar ohne Pepton) eine Unterscheidung nicht zuließen, konnte mit GS-Agar und modifizierten experimentellen Bedingungen schließlich eine Möglichkeit zur zuverlässigen Differenzierung von *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* geschaffen werden. Bei GS-Agar handelt es sich um den normalerweise für das "fast killing" verwendeten PGS-Agar, abzüglich des Peptonanteils. Auf diesem Medium starben die Ara^- *B. pseudomallei*-Stämme (wie z.B. E 8) mit einer $LT_{50\%}$ von etwa 5 h wesentlich schneller, als die Ara^+ *B. thailandensis*-Stämme (wie z.B. E 201) mit einer $LT_{50\%}$ von etwa 40 h (Abb. 16, SS. 75/76).

Da das Wurmsterben auf GS-Agar in etwa der Absterbekinetik unter "fast killing"-Bedingungen entsprach, sollte mit Hilfe der *C. elegans*-Mutante *age-1* geklärt werden, ob *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* auch auf GS-Agar, wie unter normalen "fast killing"-Bedingungen, bei *C. elegans* zu oxidativem Stress führt. Es zeigte sich, wie auch zuvor auf PGS-Agar, dass die stress-resistentere *age-1*-Mutante tatsächlich langsamer starb, als der *C. elegans*-Wildtyp (Abb. 17, S. 77; Abb. 16, SS. 75/76). Somit konnte bewiesen werden, dass auch auf GS-Agar der toxische Effekt durch oxidativen Stress zustande zu kommen scheint.

Des weiteren sollte die Frage geklärt werden, inwieweit in diesem modifizierten "fast killing"-Assay, ebenso wie unter normalen "fast killing"-Bedingungen, ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Würmern für ein effektives Sterben notwendig ist. Mit Hilfe des Nitrocellulose-

Assays konnte gezeigt werden, dass *C. elegans* auch ohne direkten Bakterienkontakt getötet wird, so dass auch auf GS-Agar sezernierte Exotoxine für das Wurmsterben verantwortlich zu sein scheinen. Der Virulenzunterschied zwischen *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* (Abb. 18, S. 78) sowie der Überlebensvorteil der stress-resistenteren *C. elegans*-Mutante *age-1* (Abb. 19, S. 79) gegenüber dem Wildtyp gingen dabei jedoch verloren, da alle Würmer mit annähernd derselben Kinetik getötet wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Tatsache, dass die Würmer, die mehr als 24 h auf der relativ trockenen Oberfläche des Nitrocellulose-Filters verbringen mussten, mit Sicherheit in ihrer Fitness stärker beeinträchtigt waren, als direkt auf dem Agar gehaltene Vergleichstiere. Aus diesem Grund wurde der Nitrocellulose-Assay zusätzlich in einer modifizierten Form durchgeführt. Hierbei wurden die Bakterien auf einem, auf GS-Agar liegenden Filter angezogen, der Filter nach 24 h entfernt und anschließend die Würmer auf den zurückbleibenden sterilen Agar gegeben. Bei dieser Art der Durchführung kam der Virulenzunterschied zwischen dem *B. pseudomallei*-Stamm E 8 und dem *B. thailandensis*-Stamm E 201 wieder deutlich zum Ausdruck (Abb. 20, SS. 80/81). Ebenso starb im modifizierten Nitrocellulose-Assay die stress-resistentere *C. elegans*-Mutante *age-1* bei *B. pseudomallei* signifikant, bei *B. thailandensis* geringgradig schneller als der *C. elegans*-Wildtyp (Abb. 20, SS. 80/81). Die Tatsache, dass die *age-1*-Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber dem von *B. pseudomallei* sezernierten Toxin aufweist bestätigt die Hypothese, dass das hitzelabile *B. pseudomallei*-Toxin über einen Mechanismus wirkt, der bei *C. elegans* zu oxidativem Stress führt. Das *age-1*-Gen kodiert für ein Homolog der Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI(3)K) katalytischen Untereinheiten der Säuger und ist an einem Insulin-ähnlichen Signalweg beteiligt, der die Reaktion auf oxidativen Stress, Lebensdauer und Eintritt in das Dauerstadium von *C. elegans* reguliert (MORRIS et al., 1996). Es bleibt zu untersuchen, ob die Beobachtung, dass der Virulenzunterschied zwischen *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* nur auf GS-Agar, nicht aber in einem der anderen Assays deutlich wird, lediglich ein quantitatives oder auch ein qualitatives Phänomen darstellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kultivierungsbedingungen einen großen Einfluß auf die von den hier untersuchten *Burkholderia spp.* produzierten Virulenzfaktoren zu haben scheinen. Insbesondere die Bedingungen auf GS-Agar könnten in Form eines Screenings auf

virulenzattenuierte Bakterienmutanten für die Identifizierung von *B. pseudomallei*-Virulenzfaktoren mit Relevanz im Säugetierwirt von Bedeutung sein.

5.4 Einfluss des “Quorum sensings“ der beiden *B. cepacia*-Stämme H111 und H111 m64 auf die *C. elegans*-Absterbekinetik

Bei der *B. cepacia*-Mutante H111 m64 handelt es sich um eine “Quorum sensing“-negative *cepR*-Mutante. Das Phänomen des “Quorum sensing“ ist ein Regulationsmechanismus vieler gramnegativer Bakterien, der, in Abhängigkeit von der Zelldichte, die Expression extrazellulärer Virulenzfaktoren reguliert. “Quorum sensing“ ist der Prozess der Produktion und des Reagierens auf hohe intrazelluläre Konzentrationen an N-acylhomoserin Lactonen (N-acyl-HSL), sogenannten “Autoinducern“, welche an spezifische, die Transkription ausgewählter Gene regulierende, Proteine binden. Dieser Prozess wurde erstmals bei dem Meeresorganismus *Vibrio fischeri* beschrieben, wo er für die Kontrolle der Biolumineszenz verantwortlich ist (NEALSON et al., 1970). *P. aeruginosa* besitzt die beiden “Quorum sensing“-Systeme *lasRI* und *rhlRI* (OCHSNER et al., 1994; BRINT et al., 1995; LATIFI et al., 1995), *B. cepacia* das “Quorum sensing“-System *cepIR* (LEWENZA et al., 1998). Die *B. cepacia cepR*-Mutante H111 m64 ist Autoinducer-negativ, was bedeutet, dass sie keine bzw. nur noch geringe Mengen an N-acylhomoserin Lactonen bildet und somit potentiell auch weniger Virulenzfaktoren produziert.

Das Verhalten des *B. cepacia*-Wildtypstamms H111 unter “slow“- und “fast killing“-Bedingungen ähnelt dem von *B. pseudomallei* bzw. *B. thailandensis* und wurde unter 5.1 und 5.2 bereits beschrieben. Die *B. cepacia*-Mutante H111 m64 zeigte im Gegensatz zum Wildtyp eine hochgradige Attenuierung im “slow killing“, die sich in einem Überleben und einer Populationszunahme der Würmer mit Verstoffwechslung der Bakterien bemerkbar machte (Abb. 22, S. 85). Durch Erhöhung der Versuchstemperatur konnte jedoch ein Wurmsterben erreicht werden, was beweist, dass die *B. cepacia*-Mutante H111 m64 auch unter “slow killing“-Bedingungen noch eine Restpathogenität besitzt (Abb. 23B, S. 87). Auch unter “fast killing“-Bedingungen ist die Mutante, wenn auch im Vergleich zum “slow killing“ wesentlich geringer, attenuiert (Abb. 28, S. 97). Die Tatsache, dass es sich beim “slow“- und “fast killing“ um zwei unterschiedliche Mechanismen handelt (TAN et al., 1999a), erklärt die unterschiedlich starke Attenuierung der

B. cepacia-Mutante in den beiden Assays. Die Versuche zeigen, dass das *cepR*-Gen der Mutante H111 m64 für die Virulenz von *B. cepacia* mitverantwortlich ist.

Fluoreszenzaufnahmen des Verdauungstraktes von mit der *gfp*-markierten *B. cepacia*-Mutante H111 m64 (pBBR-5-*gfp*) exponierten Würmern zeigten nur eine geringe Fluoreszenz einzelner Bakterien (Abb. 25B, S. 90), wohingegen nach Exposition mit dem *rfp*-markierten *B. cepacia*-Wildtyp H111 (pUT-*rfp*) das gesamte Darmlumen mit Bakterien angefüllt war (Abb. 25A, S. 90). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mutante ihre Fähigkeit zur Akkumulation verloren hat. Kontrollaufnahmen mit einem *gfp*-markierten *E. coli*-Stamm zeigten ebenfalls keine Anzeichen einer stattgefundenen Bakterienakkumulation, so dass sich die *B. cepacia*-Mutante unter "slow killing"-Bedingungen bei einer Umgebungstemperatur von 20 °C ähnlich verhält, wie die natürliche *C. elegans*-Nahrungsquelle. Keimzahlbestimmungen aus dem Verdauungstrakt von *C. elegans* bestätigten, dass sich nach 24-stündiger H111 m64-Exposition nur etwa 10^2 Bakterien im Wurmdarm befanden, während es bei einer 24-stündigen H111-Exposition 10^4 - 10^5 Bakterien waren. Demnach ist *C. elegans* in der Lage, die *B. cepacia*-Mutante zu verdauen und wieder auszuscheiden, wohingegen er den *B. cepacia*-Wildtyp nicht verarbeiten kann, so dass es infolge dessen zu einer Akkumulation dieser Bakterien kommt. Eine Bakterienreplikation im Darmtrakt von *C. elegans* konnte auch bei der Mutante H111 m64 nicht beobachtet werden.

Inwieweit die Attenuierung dieser Mutante auch in anderen Tiermodellen (z.B. Maus) nachweisbar ist, muss in nachfolgenden Versuchen überprüft werden.

Zu Vergleichszwecken sollten neben dem *B. cepacia*-Stamm H111 auch noch zwei andere Stämme des *Cepacia*-Komplex, nämlich *B. vietnamiensis* und *B. multivorans* sowie *B. gladioli* auf ihre Fähigkeit, *C. elegans* zu töten, untersucht werden. Alle drei Stämme wurden auf ihr Verhalten unter "slow killing"-Bedingungen, "fast killing"-Bedingungen und auf GS-Agar getestet (Tab. 5-7, SS. 104-106). Es trat jedoch in keinem der Assays ein Wurmsterben auf, so dass selbst innerhalb des *Cepacia*-Komplexes große Virulenzunterschiede im *C. elegans*-Modell zu herrschen scheinen. Allerdings konnten Abweichungen in der Populationszunahme von *C. elegans* beobachtet werden: während sich die Würmer auf *B. vietnamiensis* und *B. multivorans* in fast allen Assays stark vermehrten, kam es auf *B. gladioli* nur zu einer geringen Populationszunahme. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Unterteilung der Bakterien nicht nur nach der Absterbekinetik, sondern auch nach der Populationszunahme der Würmer im *C. elegans*-Modell möglich ist.

5.5 Eignung des *C. elegans*-Modells als Pathogenitätsmodell für *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis* und *Burkholderia cepacia*

Das in dieser Arbeit beschriebene Pathogenitätsmodell basiert auf den antagonistischen Interaktionen zwischen dem Nematoden *C. elegans* und den pathogenen Bakterienspezies *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* und *B. cepacia* und soll dazu dienen, Wechselwirkungen zwischen den bakteriellen Virulenzfaktoren und den Wirtsabwehrmechanismen zu analysieren. Möglicherweise sind die zum Teil hohen Standardabweichungen in den Versuchen durch kleine Temperaturschwankungen sowie geringe Entwicklungsunterschiede der Nematoden zu erklären.

Veröffentlichungen von TAN et al. (1999) mit *P. aeruginosa* PA14 zeigten bereits, dass viele der im *C. elegans*-Modell identifizierten Virulenzfaktoren auch bei der Infektion von Säugetieren eine Rolle zu spielen scheinen. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe des modifizierten "fast killing"-Assays experimentelle Bedingungen geschaffen werden, mit denen sich virulente *B. pseudomallei*-Stämme von avirulenten *B. thailandensis*-Stämmen unterscheiden lassen, und bei denen die beobachteten Virulenzunterschiede mit der Situation im Säugetierwirt korrelieren. Es gibt jedoch auch Pathogenitätsfaktoren, bei denen keine Korrelation zwischen Nematode und Säuger existiert, wie der Einsatz des *B. pseudomallei*-Stammes NCTC 7431 vor und nach Mauspassage zeigt. Während der passagierte Stamm im Mausmodell deutlich virulenter war als der nicht-passagierte, zeigte sich im *C. elegans*-Modell weder im "slow killing", noch im "fast killing" oder auf GS-Agar ein Unterschied.

In jedem Fall ist das *C. elegans*-Modell jedoch ein geeignetes System, um Bakterien auf ihre Virulenzfaktoren zu screenen und könnte in größerem Umfang auch zur Testung von Bakterienmutanten herangezogen werden.

6 Zusammenfassung / Summary

Im Jahr 1999 wurde von der Gruppe um FREDERICK M. AUSUBEL erstmalig ein Nematoden-Bakterien-Pathogenitätsmodell mit *Pseudomonas (P.) aeruginosa* vorgestellt. Dieses Modell ermöglicht potentiell eine vereinfachte Analyse der Interaktionen zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und Wirtsabwehrmechanismen.

Im Zuge der in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Untersuchungen ist es gelungen, ein *Caenorhabditis (C.) elegans*-Pathogenitätsmodell für *Burkholderia (B.) pseudomallei* und *B. thailandensis* sowie für *B. cepacia* zu etablieren. Die *C. elegans*-Absterbekinetiken entsprachen dabei vom Prinzip her denen des *P. aeruginosa*-*C. elegans*-Modells, dass heißt, es konnte bei allen drei Spezies ebenfalls ein "slow"- und ein "fast killing" beobachtet werden. Am Beispiel von *B. cepacia* konnte gezeigt werden, dass das "slow killing" mit einer Akkumulation, aber keiner nachweislichen Replikation der aufgenommenen Bakterien im Darmtrakt von *C. elegans* einhergeht. Durch den Vergleich des *B. cepacia*-Wildtypstammes mit einer "Quorum sensing"-negativen *cepR*-Mutante konnte nachgewiesen werden, daß "Quorum sensing" insbesondere für die bakterielle Akkumulation und das Versterben der Nematoden unter "slow killing"-Bedingungen wichtig ist. An der Absterbekinetik unter "fast killing"-Bedingungen scheinen dagegen bei den untersuchten *Burkholderia spp.*, anders als im *P. aeruginosa*-*C. elegans*-Modell, hitzelabile Exotoxine beteiligt zu sein. Durch den Einsatz von *C. elegans*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass es bei den Würmern im Rahmen des "fast killings" wahrscheinlich zu erhöhtem oxidativen Stress kommt. Weiterhin konnten durch einen modifizierten "fast killing"-Assay experimentelle Bedingungen definiert werden, mit denen sich virulente *B. pseudomallei*-Stämme von avirulenten *B. thailandensis*-Stämmen unterscheiden lassen, und bei denen die beobachteten Virulenzunterschiede mit der Situation im Säugetierwirt korrelieren. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Kulturbedingungen einen bedeutenden Einfluss auf die Produktion der Virulenzfaktoren der hier untersuchten *Burkholderia spp.* und damit auf ihre Pathogenität im *C. elegans*-Modell haben.

Development of a *Caenorhabditis elegans* model to analyze the virulence of *Burkholderia* species, pathogenic for humans and animals

(Doreen Ebrecht, 2002)

In 1999, FREDERICK M. AUSUBEL and co-workers developed an assay to examine the influence of bacteria on nematodes with regard to the pathogenesis of infections with *Pseudomonas (P.) aeruginosa*. This assay makes it possible to analyse the interactions between the virulence factors of bacteria and the defense mechanisms of the host.

In this work, a *Caenorhabditis (C.) elegans* pathogenesis assay for *Burkholderia (B.) pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. cepacia* was successfully established. The killing kinetics of *C. elegans* proved to be fairly similar to the killing kinetics described in the *P. aeruginosa-C. elegans* model, which means, that it was possible to differentiate a "slow"- from a "fast killing" in all of the three species. By using *B. cepacia* it was able to demonstrate that during the "slow killing" an accumulation, but no replication of the bacteria occurs in the intestinal tract of *C. elegans*. The comparison of the *B. cepacia* wildtype with a "Quorum sensing"-negative *cepR* mutant revealed that "Quorum sensing" is an important factor for the accumulation of bacteria and the death of the nematodes under "slow killing" conditions. In contrast to the *P. aeruginosa-C. elegans* assay, the killing under "fast killing" conditions involved the secretion of heat-labile exotoxins in all tested *Burkholderia spp.*. By using *C. elegans* mutants it became obvious that the "fast killing" most likely exerts its toxic effects by exposing *C. elegans* to oxidative stress.

Furthermore, experimental conditions to differentiate virulent *B. pseudomallei* strains from avirulent *B. thailandensis* strains with a modified "fast killing" assay were set up. The observed differences in virulence correlate with the situation in the mammalian host. In conclusion, the results show that the conditions of culturing the bacteria have an important influence on the production of virulence factors by all *Burkholderia spp.* examined and so on their pathogenicity in the *C. elegans* assay.

7 Literaturverzeichnis

ABALLAY, A., P. YORGEY u. F. M. AUSUBEL (2000)

Salmonella typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*

Curr. Biol. **10**: 1539 – 1542

ALBERT, P. S. u. D. L. RIDDLE (1983)

Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva

J. Comp. Neurol. **219**: 461 – 481

ASHDOWN, L. R. u. J. M. KOEHLER (1990)

Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*

J. Clin. Microbiol. **28**: 2331 - 2334

BEVIVINO, A., S. TABACCHIONI, L. CHIARINI, M. V. CARURI, M. DEL GALLO u. P. VISCA (1994)

Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*

Microbiology **140**: 1069 - 1077

BLESSING, J., J. WALKER, B. MAYBURY, A. S. YEAGER u. N. LEWISTON (1979)

Pseudomonas cepacia and *maltophilia* in the cystic fibrosis patient

Am. Rev. Respir. Dis. **119**: 262

BONACORSI, S., F. FITOUSSI, S. LHOPITAL u. E. BINGEN (1999)

Comparative in vitro activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampicin or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis

Antimicrob. Agents Chemother. **43**: 213 - 217

BRETT, P. J., D. DeSHAZER u. D. E. WOODS (1997)

Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains
Epidemiol. Infect. **118**: 137 - 148

BRETT, P. J., D. DeSHAZER u. D. E. WOODS (1998)

Burkholderia thailandensis sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species
Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 317 - 320

BRINT, J. M. u. D. E. OHMAN (1995)

Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-
RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive Lux-
R-LuxI family
J. Bacteriol. **177**: 7155 - 7163

BURKHARDT, F. (1992)

Mikroskopische Diagnostik
Thieme Verlag, Stuttgart, S. 94, S. 142 – 144

BURKHOLDER, W. (1949)

Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs
Phytopathology **40**: 115 – 117

BURNS, J. L., M. JONAS, E. Y. CHI, D. K. CLARK, A. BERGER u. A. GRIFFITH (1996)

Invasion of respiratory epithelial cells by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*
Infect. Immun. **64**: 4054 - 4059

BUTLER, S. L. u. C. J. DOHERTY et al. (1995)

Burkholderia cepacia and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard?
J. Clin. Microbiol. **33**: 1001 - 1004

CASSADA, R. C. u. R. L. RUSSEL (1975)

The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

Dev. Biol. **46**: 326 - 342

CERANTOLA, S., N. MARTY u. H. MONTROZIER (1996)

Structural studies of the acidic exopolysaccharide produced by a mucoid strain of *Burkholderia cepacia* isolated from cystic fibrosis

Carbohydr. Res. **285**: 59 - 67

CHAOWAGUL, W. u. N. J. WHITE (1989)

Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in north eastern Thailand

J. Infect. Dis. **159**: 890 – 899

CHAOWAGUL, W., Y. SUPUTTAMONGKOL, D. A. B. DANCE, A. RAJCHANUVONG, J. PATTARA-ARECHACHAI u. N. J. WHITE (1993)

Relapse in melioidosis: incidence and risk factors

J. Infect. Dis. **168**: 1181 – 1185

CHAOWAGUL, W. (2000)

Recent advances in the treatment of severe melioidosis

Acta Tropica **74**: 133 – 137

CHOY, J. L., M. MAYO, A. JANMAAT u. B. J. CURRIE (2000)

Animal melioidosis in Australia

Acta Tropica **74**: 153 – 158

COENYE, T., J. J. LIPUMA, D. HENRY, B. HOSTE, K. VANDEMEULEBROECKE, M. GILLIS, D. P. SPEERT u. P. VANDAMME

Burkholderia cepacia genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., in press

COENYE, T., E. MAHENTHIRALINGAM, D. HENRY, J. J. LIPUMA, S. LAEVENS, M. GILLIS, D. P. SPEERT u. P. VANDAMME
Burkholderia ambifaria sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex comprising biocontrol and cystic fibrosis-related isolates
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., in press

COLLIER, L., A. BALOWS u. M. SUSSMAN (1998)
Topley & Wilson's
Microbiology and microbial infections
Ninth edition
Volume 2
Systematic bacteriology
Arnold-Verlag, Hodder Headline Group, Großbritannien SS.: 1123 – 1126 u. SS.: 1126 - 1128

COLLIER, L., A. BALOWS u. M. SUSSMAN (1998)
Topley & Wilson's
Microbiology and microbial infections
Ninth edition
Volume 3
Bacterial infections
Arnold-Verlag, Hodder Headline Group, Großbritannien SS.: 1123 – 1126 u. SS.: 1126 - 1128

CURRIE, B. J., D. A. FISHER, D. M. HOWARD u. J. N. C. BURROW (2000)
Neurological melioidosis
Acta Tropica **74**: 145 – 151

DANCE, D. A. B., V. WUTHIEKANUN, P. NAIGOWIT u. N. J. WHITE (1989)
Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20 NE
J. Clin. Pathol. **42**: 645 – 648

DANCE, D.A.B. (1990)

Melioidosis

Clin. Microbiol. Rev. **4**: 52 – 60

DANCE, D. A. B. (1991)

Melioidosis: the tip of the iceberg?

Clin. Microbiol. Rev. **4**: 52 – 60

DARBY, C., C. L. COSMA, J. H. THOMAS u. C. MANOIL (1999)

Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*

Proc. Natl. Acad. Science USA **96**: 15202 – 15207

DeSHAZER, D., P. J. BRETT u. 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(5)**: 1081 – 1100

DHARAKUL, T., S. SONGSIVILAI, S. VIRIYACHITRA, V. LUANGWEDCHAKARN, B.

TASSANEETRITAP u. W. CHAOWAGUL (1996)

Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis

J. Clin. Microbiol. **34**: 609 – 614

DRISCOLL, M. u. J. KAPLAN (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Harbor Laboratory Press 645 – 677

EMMONS, S. W. u. P. W. STERNBERG (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Harbor Laboratory Press 295 – 334

FINLAY, B. B. (1999)

Bacterial disease in diverse hosts

Cell **96**: 315 – 318

GAUTHIER, Y. P., F. M. THIBAUT, J. C. PAUCOD u. D. R. VIDAL (2000)

Protease production by *Burkholderia pseudomallei* and virulence in mice

Acta Tropica **74**: 215 – 220

GESSNER, A. R. u. J. E. MORTENSEN (1990)

Pathogenetic factors of *Pseudomonas cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis

J. Med. Microbiol. **33**: 115 - 120

GILLIS, M., T. V. VAN, R. BARDIN, M. GOOR, P. HEBBER, A. WILLEMS, P. SEGERS, K. KERSTERS, T. HEULIN u. M. P. FERNANDEZ (1995)

Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam

Int. J. Syst. Bacteriol. **45**: 274 - 289

GOLDMANN, D. A. u. J. D. KLINGER (1986)

Pseudomonas cepacia: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology

J. Pediatr. **5**: 806 - 811

GOVAN, J. R. W., P. H. BROWN, J. MADDISON, C. J. DOHERTY, J. W. NELSON, M. DODD, A. P. GREENING u. A. K. WEBB (1993)

Evidence for the transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis

The Lancet **342**: 15 - 19

GOVAN, J. R. W. u. V. DERETIC (1996a)

Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*

Microbiol. Rev. **60**: 539 – 574

GOVAN, J. R. W., J. E. HUGHES u. P. VANDAMME (1996b)

Burkholderia cepacia: medical, taxonomic and ecological issues

J. Med. Microbiol. **45**: 395 - 407

GREENWALD, I. (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Harbor Laboratory 519 – 541

HÄUSSLER, S., M. NIMTZ, T. DOMKE, V. WRAY u. I. STEINMETZ (1998)

Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*

Infect. Immun. **66**: 1588 – 1593

HANCOCK, R. E. W. (1998)

Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria

Clin. Infect. Dis. **27**: 93 - 99

HECKLY, R. J. (1964)

Differentiation of exotoxin and other biologically active substances in *Pseudomonas pseudomallei* filtrates

J. Bacteriol. **88**: 1730 - 1736

HENRY, D. A., M. E. CAMPBELL, J. J. LIPUMA u. D. P. SPEERT (1997)

Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium

J. Clin. Microbiol. **35**: 614 – 619

HENRY, D., M. CAMPBELL, C. MCGIMPSEY, A. CLARKE, L. LOUDEN, J. L. BURNS, M. H. ROE, P. VANDAMME u. D. SPEERT (1999)

Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis

J. Clin. Microbiol. **37**: 1004 – 1007

HENRY, D. A., E. MAHENTHIRALINGAM, P. VANDAMME, T. COENYE u. D. P. SPEERT
(2001)

Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex
J. Clin. Microbiol. **39**: 1073 - 1078

HODGKIN, J. A., H. R. HORVITZ, u. S. BRENNER (1979)

Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*.
Genetics **91**: 67 - 94

HOPE, I. A. (1999)

C. elegans

A practical approach

Oxford University Press, New York SS.: 1 – 15 u. SS.: 51 - 67

HOPPE, I., B. BRENNEKE, M. RHODE, A. KREFT, S. HÄUSSLER, A. REGANZEROWSKI
u. I. STEINMETZ (1999)

Characterization of a murine model of melioidosis: comparison of different strains of mice
Infect. Immun. **67**: 2891 – 2900

HOWE, C., A. SAMPATH u. M. SPOTNITZ (1971)

The pseudomallei group: a review

J. Infect. Dis. **124**: 598 – 606

HUMPHREYS, H., D. PECKHAM, P. PATEL u. A. KNOX (1994)

Airborne dissemination of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* from adult patients with cystic
fibrosis

Thorax **49**: 1157 - 1159

ISLES, A., I. MACLUSKY, M. COREY, R. GOLD, C. PROBER, P. FLEMING u. H.
LEVISON (1984)

Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem
J. Pediatr. **104**: 206 – 210

- JAYASWAL, R. K., M. A. FERNANDEZ, L. VISINTIN u. R. S. UPADHYAY (1991)
Transposon Tn5-259 mutagenesis of *Pseudomonas cepacia* to isolate mutants deficient in anti-fungal activity
Can. J. Microbiol. **38**: 309 - 312
- JOHN, M., E. ECCLESTONE, E. HUNTER, P. COUROUX u. Z. HUSSAIN (1994)
Epidemiology of *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis
Pediatr. Pulmonol. **18**: 108 - 113
- JONES, A. L., T. J. BEVERIDGE u. D. E. WOODS (1996)
Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*
Infect. Immun. **64**: 782 – 790
- JONSSON, V. (1970)
Proposal for a new species *Pseudomonas kingii*
Int. J. Syst. Bacteriol. **20**: 924 – 930
- KLASS, M. R. u. D. HIRSH (1976)
Nonaging developmental variant of *Caenorhabditis elegans*.
Nature **260**: 523 – 525
- KRAMER, J. M. (1997)
C. elegans II.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 471 – 500
- KUEHN, M., K. LENT, J. HAAS, J. HAGENZIEKER, M. CERVIN u. A. L. SMITH (1992)
Fimbriation of *Pseudomonas cepacia*
Infect. Immun. **60**: 2002 - 2007
- KURZ, C. L. u. J. EWBANK (2000)
Caenorhabditis elegans for the study of host-pathogen interactions
Trends in Microbiology **8**: 142 – 144

LABROUSSE, A., S. CHAUVET, C. COUILLAULT, C. L. KURZ u. J. J. EWBANK (2000)

Caenorhabditis elegans is a model host for *Salmonella typhimurium*

Curr. Biol. **10**: 1543 – 1545

LARAYA-CUASAY, L. R., M. LIPSTEIN u. N. N. HUANG (1977)

Pseudomonas cepacia in the respiratory flora of patients with cystic fibrosis (CF)

Pediatr. Res. **11**: 502

LATIFI, A., M. K. WINSON, M. FOGLINO, B. W. BYCROFT, G. S. A. B. STEWART, A.

LAZDUNSKI u. P. WILLIAMS (1995)

Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Mol. Microbiol. **17**: 333 - 343

LEDSON, M. J., M. J. GALLAGHER, C. A. CORKILL u. M. J. WALSHAW (1998b)

Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*

Thorax **53**: 432 - 436

LEELARASAMEE, A. u. S. BOVORNKITTI (1989)

Melioidosis: review and update

Rev. Infect. Dis. **11**: 413 – 425

LEWENZA, S., B. CONWAY, E. P. GREENBERG u. P. A. SOKOL (1999)

Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI

J. Bacteriol. **181**: 748 - 756

LIPUMA, J. (1998)

Burkholderia cepacia. Management issues and new insights

Clin. Chest. Med. **19**: 473 – 486

LIPUMA, J. J., B. J. DULANEY, J. D. MCMENAMIN, P. W. WHITBY, T. L. STULL, T. COENYE u. P. VANDAMME (1999)

Development of rRNA-based PCR assays for the identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients

J. Clin. Microbiol. **37**: 3167 – 3170

LONON, M. K., D. E. WOODS u. D. C. STRAUSS (1988)

Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*

J. Clin. Microbiol. **26**: 976 - 984

MAHAJAN-MIKLOS, S., M.-W. TAN, L. G. RAHME u. F. M. AUSUBEL (1999)

Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidating using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model

Cell **96**: 47 – 56

MAHENTHIRALINGAM, E., J. BISCHOF, S. K. BYRNE, C. RADOMSKI, J. E. DAVIES, Y. AV-GAY u. P. VANDAMME (2000)

DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia cepacia* genomovars I and III

Clin. Microbiol. **38**: 3165 - 3173

MARTIN, D. W. u. C. D. MOHR (2000)

Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*

Infect. Immun. **68**: 24 - 29

McKENNY, D., K. E. BROWN u. D. G. ALLISON (1995)

Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication

J. Bacteriol. **177**: 6989 - 6992

McKEVITT, A. J. u. D. E. WOODS (1984)

Characterization of *Pseudomonas cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis
J. Clin. Microbiol. **19**: 291 - 293

McLOUGHLIN, T. J., J. P. QUINN, A. BETTERMAN u. R. BROOKLAND (1992)

Pseudomonas cepacia suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds
in controlling the disease
Appl. Environm. Microbiol. **58**: 1760 - 1763

MEYER, B. J. (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Harbor Laboratory Press 209 – 240

MEYER, J.-M., D. HOHNADDEL u. F. HALLE (1989)

Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore
J. Gen. Microbiol. **135**: 1479 - 1487

MOERMANN, D. G. u. A. FIRE (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 417 – 470

MORRIS, J. Z., H. A. TISSENBAUM u. G. RUVKUN (1996)

A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in
Caenorhabditis elegans
Nature **382**: 536 - 539

MORTENSEN, J. E., M. C. FISHER u. J. J. LIPUMA (1995)

Recovery of *Pseudomonas cepacia* and other *Pseudomonas* species from the environment
Infect. Con. Hosp. Epidemiol. **16**: 30 - 32

- NAKAZAWA, T., Y. YAMADA u. M. ISHIBASHI (1987)
Characterization of hemolysin in extracellular products of *Pseudomonas cepacia*
J. Clin. Microbiol. **25**: 195 - 198
- NARITA, M. (1982)
Pathological changes in goats experimentally inoculated with *Pseudomonas pseudomallei*
Natl. Inst. Anim. Health Q **22**: 170 - 179
- NEALSON, K. H., T. PLATT u. J. W. HASTINGS (1970)
Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system
J. Bacteriol. **104**: 313 - 322
- NELSON, J. W., S. L. BUTLER, D. KRIEG u. J. R. W. GOVAN (1994)
Virulence factors of *Burkholderia cepacia*
FEMS Immunol. Med. Microbiol. **8**: 89 - 98
- NIGG, C. R., J. HECKLY u. M. COLLING (1958)
Toxin production by *Malleomyces pseudomallei*
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **89**: 17 - 20
- NIMTZ, M., V. WRAY, T. DOMKE, B. BRENNEKE, S. HÄUSSLER u. I. STEINMETZ
(1997)
Structure of an exopolysaccharide of *Burkholderia pseudomallei*
Eur. J. Biochem. **250**: 608 - 616
- OCHSNER, U. A., A. K. KOCH, A. FIECHTER u. J. REISER (1994)
Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis
in *Pseudomonas aeruginosa*
J. Bacteriol. **176**: 2044 - 2054

O'QUINN, A. L., E. M. WIEGAND u. J. A. JEDDELOH (2001)

Burkholderia pseudomallei kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis

Cell. Microbiol. **3**: 381 - 393

PALLERONI, N. J. u. B. HOLMES (1981)

Pseudomonas cepacia sp. nov., nom. rev.

Int. J. Syst. Bacteriol. **31**: 479 – 481

PERRY, M. B., L. L. MacLEAN, T. SCHOLLAARDT, L. E. BRYAN u. M. HO (1995)

Structural characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Burkholderia pseudomallei*

Infect. Immun. **63**: 3348 – 3352

PIGOTT, M. J. A. u. L. HOCHHOLZER (1970)

Human melioidosis

Arch. Path. **90**: 101 – 111

PYLE, B. H., S. K. WATTERS u. G. A. McFETTERS (1994)

Physiological aspects of disinfection resistance in *Pseudomonas cepacia*

J. Appl. Bacteriol. **76**: 142 - 148

RAND, J. B. u. M. L. NONET (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 611 – 643

RICHARDS, R. M. E., V. E. S. HAMILTON u. M. R. THOMAS (1998)

In-vitro investigation of the antibacterial activity of agents which may be used for the oral treatment of lung infections in CF patients

J. Antimicrob. Chemother. **42**: 171 - 178

RIDDLE, D. L. u. P. S. ALBERT (1997)

C. elegans II.

Plainview, NY: Cold Spring Habor Laboratory Press

RIECKE, K., S. WAGNER, J. ELLER, H. LODE u. T. SCHABERG (1997)

Pulmonale Melioidose bei einem deutschen Südostasientouristen

Pneumologie **51**: 499 – 502

SAIMAN, L., G. CACALANO u. A. PRINCE (1990)

Pseudomonas cepacia adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*

Infect. Immun. **58**: 2578 - 2584

SCHEDL, T. (1997)

C. elegans II.

Cold Spring Habor Laboratory, 241 – 269

SCHÜRMAN, A. u. D. REINHARDT (1996)

Pulmonale Komplikationen bei Cystischer Fibrose

Sozialpädiatrie und Kinderärztliche Praxis **18**: 138 - 143

SEGONDS, C., T. HEULIN, N. MARTY u. G. CHABANON (1999)

Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates

J. Clin. Microbiol. **37**: 2201 – 2208

SHELLY, D. B., T. SPILKER, E. J. GRACELY, T. COENYE, P. VANDAMME u. J. J.

LIPUMA (2000)

Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture

J. Clin. Microbiol. **38**: 3112 - 3115

SMITH, C. J., J. C. ALLEN, M. N. EMBI, O. OTHMAN, N. RAZAK u. G. ISMAIL (1987)

Human melioidosis: an emerging medical problem

Micren J. **3**: 343 – 366

SMITH, D. L., L. B. GUMERY, E. G. SMITH, D. E. STABLEFORTH, M. E. KAUFMANN u.
T. L. PITT (1993)

Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission

J. Clin. Microbiol. **31**: 3017 - 3022

SMITH, M. D., V. WUTHIEKANUN, A. L. WALSH u. T. L. PITT (1993)

Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*

J. Clin. Pathol. **46**: 374 – 375

SMITH, M. D. u. V. WUTHIEKANUN et al. (1994)

Susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to some newer β -lactam antibiotics and antibiotic combinations using time-kill studies

J. Antimicrob. Chemother. **33**: 145 – 149

SMITH, M. D. u. V. WUTHIEKANUN et al. (1996)

In-vitro activity of carbapenem antibiotics against β -lactam susceptible and resistant strains of *Burkholderia pseudomallei*

J. Antimicrob. Chemother. **37**: 611 – 615

SMITH, M. D., B. J. ANGUS, V. WUTHIEKANUN u. N. J. WHITE (1997)

Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*

Infect. Immun. **65**: 4319 – 4321

SOKOL, P. A. (1986)

Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*

J. Clin. Microbiol. **23**: 560 - 562

SOKOL, P. A., C. J. LEWIS u. J. J. DENNIS (1992)

Isolation of a novel siderophore from *Pseudomonas cepacia*

J. Med. Microbiol. **36**: 184 - 189

SORENSEN, R. U. u. F. J. JOSEPH (1993)

Phenazine pigments in *Pseudomonas aeruginosa* infection. In *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen, M. Campa, M. Bendenelli u. H. Friedman, eds.

New York: Plenum Press: 43 - 57

STABLEFORTH, D. E. u. D. L. SMITH (1994)

Pseudomonas cepacia in cystic fibrosis

Thorax **49**: 629 – 630

STANIER, R. Y., N. J. PALLERONI u. M. DOUDOROFF (1966)

The aerobic pseudomonads: a taxonomic study

J. Gen. Microbiol. **43**: 159 – 271

STARR, M. P. u. W. H. BURKHOLDER (1941)

Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance

Phytopathology **32**: 598 - 604

STEINMETZ, I., M. ROHDE u. B. BRENNEKE (1995)

Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*

Infect. Immun. **63**: 3959 – 3965

STEINMETZ, I., A. REGANZEROWSKI, B. BRENNEKE, S. HÄUSSLER, A. SIMPSON u. 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

STEINMETZ, I., M. RHODE, V. WRAY, S. HÄUSSLER, A. REGANZEROWSKI u. B. BRENNEKE (2000)

Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei*

Acta Tropica **74**: 211 – 214

SUPUTTAMONGKOL, Y. u. A. J. HALL et al. (1994a)

The epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, northeast Thailand

Int. J. Epidemiol. **23**: 1082 – 1090

SUPUTTAMONGKOL, Y. u. A. RAJCHANUWONG et al. (1994b)

Ceftazidime vs. Amoxicillin/clavulanate in the treatment of severe melioidosis

Clin. Infect. Dis. **19**: 846 - 853

TAN, M.-W., S. MAHAJAN-MIKLOS u. F. M. AUSUBEL (1999a)

Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 715 – 720

TAN, M.-W., L. G. RAHME, J. A. STERNBERG, R. G. TOMPKINS u. F. M. AUSUBEL (1999b)

Pseudomonas aeruginosa killing *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 2408 – 2413

TAN, M.-W. u. F. M. AUSUBEL (2000)

Caenorhabditis elegans: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis

Curr. Opin. Microbiol. **3**: 29 – 34

TAYLOR, P. C. u. C. C. KALAMATIANOS (1994)

Pseudomonas cepacia in the sputum of cystic fibrosis patients

Pathology **26**: 315 – 317

UHLEN, P., A. LAESTADIUS, T. JAHNUKAINEN, T. SONDERBLOM, F. BACKHED, G. CELSI u. H. BRISMAR (2000)

Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells
Nature **405**: 694 - 697

VANDAMME, P., B. HOLMES, M. VANCANNEYT, T. COENYE, B. HOSTE, R. COOPMAN, H. REVETS, S. LAUWERS, M. GILLIS, K. KERSTERS u. J. R. W. GOVAN (1997)

Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. **47** : 1188 – 1200

VANDAMME, P., E. MAHENTHIRALINGAM, B. HOLMES, T. COENYE, B. HOSTE, P. de VOS, D. HENRY u. D. P. SPEERT (2000)

Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV)
J. Clin. Microbiol. **38**: 1042 - 1047

VAN PELT, C., C. M. VERDUIN, W. H. F. GOESSENS, M. C. VOS, B. TÜMMLER, C. SEGONDS, F. REUBSAET, H. VERBRUGH u. A. BELKUM (1999)

Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods
J. Clin. Microbiol. **37**: 2158 – 2164

VORACHIT, M., P. CHONGTRAKOOL, S. ARKOMSEAN u. S. BOONSONG (2000)

Antimicrobial resistance in *Burkholderia pseudomallei*
Acta Tropica **74**: 139 – 144

WALSH, A. L., M. D. SMITH, V. WUTHIEKANUN, Y. SUPUTTAMONGKOL, V. DESAKORN, W. CHAOWAGUL u. N. J. WHITE (1994)

Immunofluorescence microscopy for the rapid diagnosis of melioidosis
J. Clin. Pathol. **47**: 377 - 379

WEBER, D. R., L. E. DOUGLAS, W. G. BRUNDAGE u. T. C. STALLKAMP (1969)

Acute varieties of melioidosis occurring in US soldiers in Vietnam

Am. J. Med. **46**: 234 – 244

WHITBY, P. W., L. C. POPE, K. B. CARTER, J. J. LIPUMA u. T. L. STULL (2000)

Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*

J. Clin. Microbiol. **38**: 282 - 285

WHITE, N. J., W. CHAOWAGUL, V. WUTHIEKANUN, D. A. B. DANCE, Y.

WATTANAGOON u. N. PITAKWATCHARA (1989)

Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime

The Lancet (23. Sep. 1989) 697 – 700

WHITEFORD, M. L., J. D. WILKINSON, J. H. McCOLL, F. M. CONLON, J. R. MICHIE, T. J.

EVANS u. J. Y. PATON

Outcome of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak

Thorax **50**: 1194 - 1198

WOODS, M. L., B. J. CURRIE, D. M. HOWARD, A. TIERNEY, A. WATSON, N. M.

ANSTEY, J. PHILPOTT, V. ASCHE u. K. WHITNALL (1992)

Neurological melioidosis: seven cases from the northern territory of Australia

Clin. Infect. Dis. **15**: 163 - 169

WUTHIEKANUN, V. u. M. D. SMITH et al.(1995)

Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **89**: 41 – 43

YABUUCHI, E., Y. KOSAKO, H. OYAIZU, I. YANO, H. HOTTA, Y. HASHIMOTO, T. EZAKI u. 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

YABUUCHI, E. u. M. ARAKAWA (1993)

Burkholderia pseudomallei and melioidosis: be aware in temperate area

Microbiol. Immunol. **37**: 823 – 836

8 Anhang

8.1 Geräte

Blockthermostat BT 100, Fa. Kleinfeld Labortechnik

Brutschrank, Fa. Heraeus

Fotomikroskop, Axioskop MC80DX, Modell J2-21, Fa. Zeiss

Homogenisator, Ultra-Turrax T 8, Fa. Pharmacia LKB

Nematodenschrank (Chromatographieschrank) 2023, Mini Cold Lab, Fa. Pharmacia LKB

Phasenkontrastmikroskop, Fa. Zeiss

Photometer, Ultrospec III, Fa. Pharmacia LKB

Schüttelinkubator (Incubator Shaker Model G 25), New Brunswick Scientific Co. Inc. NJ, USA

Schüttelinkubator (für die Nematoden), KS 130 basic, Fa. IKA

Tischzentrifuge, Fa. Bachofer

Vortexer, Fa. Heidolph REAX 2000

Wasserbad, Fa. GFL

Zentrifuge, Varifuge S, Fa. Heraeus

Zentrifuge, Minifuge RF, Fa. Heraeus

Zentrifuge, Modell J2-21, Fa. Beckman

8.2 Gebrauchsmaterialien

Artikel	Firma	Best. Nr.
Falcon-Tubes, 15 ml	Becton-Dickinson	352095
Falcon-Tubes, 50 ml	Greiner Cellstar	227.261
Impfschlingen	Sarstedt	86.1562.050
Küvetten	Sarstedt	67.742
Membranfilter NC 45 (0,45 µm, Ø 47 mm)	Schleicher und Schuell	10401112
PS-Röhrchen, 4 ml	Greiner Cellstar	120160
Reagiergefäße, 1,5 ml	Sarstedt	72.690
Reagiergefäße, 1,5 ml (mit Schraubdeckel)	Sarstedt	72.692.005
Wurmplatten (Ø 5 cm)	Greiner Cellstar	30625

8.3 Medien und Zusätze

NGM (“Nematode Growth Medium“)-Agar

1,5g NaCl, 8,5g Agar (Bitec) und 1,25g Pepton werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und nach Zugabe von Nystatin (5 mg/100 ml) und den unten beschriebenen Zusätzen* sterilfiltriert.

NG (“Nematode Growth”)-Agar für den “slow-killing“-Assay

1,5 g NaCl, 8,5 g Agar (Bitec) und 1,75 g Pepton werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und nach Zugabe von Nystatin (5 mg/100 ml) und den unten beschriebenen Zusätzen* sterilfiltriert.

NG (“Nematode Growth“)-Agar ohne Pepton

1,5 g NaCl und 8,5 g Agar (Bitec) werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und nach Zugabe von Nystatin (5 mg/100 ml) und den unten beschriebenen Zusätzen* sterilfiltriert.

PGS (“Pepton Glucose Sorbitol”)-Agar für den “fast-killing”-Assay

5 g Bactopecton, 5 g NaCl und 8,5 g Bactoagar werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und nach Zugabe von 5 g Glucose, 13,67 g Sorbitol, Nystatin (5 mg/100 ml) und den unten beschriebenen Zusätzen* sterilfiltriert.

GS (“Glucose Sorbitol“)-Agar

5 g NaCl und 8,5 g Bactoagar werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und nach Zugabe von 5 g Glucose, 13,67 g Sorbitol, Nystatin (5 mg/100 ml) und den unten beschriebenen Zusätzen* sterilfiltriert.

Zusätze für die oben mit * bezeichneten Nährmedien

Jeweils 0,5 ml 1 M CaCl_2 , 0,5 ml Uracil (2 mg/ml), 0,25 ml Cholesterol in EtOH (10 mg/ml), 12,5 ml 1 M KPO_4 -Puffer (pH 6,0) und 0,5 ml 1 M MgSO_4 werden zu 500 ml Agaransatz dazugegeben.

BHI (“Brain Heart Infusion”)-Agar

12,5 g Kalbshirninfusion, 5 g Rinderherzinfusion, 10 g Proteose-Pepton, 2 g Glucose, 5 g Dinatriumhydrogenphosphat und 10 g Agar werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst, auf einen pH von 7,4 +/- 0,2 eingestellt und sterilfiltriert.

Acanthamöbenagar

Stammlösung I: 6 g NaCl, 7,1 g Na_2HPO_4 und 6,8 g KH_2PO_4 werden in 500 ml Aqua dest. gelöst

Stammlösung II 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ werden in 500 ml Aqua dest. gelöst

Stammlösung III 0,2 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (M = 147,03) oder 0,151 g CaCl_2 (M = 110,99) werden in 500 ml Aqua dest. gelöst

Je 10 ml der Stammlösungen I, II und III werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst, mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert.

LB-Medium

20 g LB-Broth-Base werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

8.4 Lösungen und Puffer

M9-Puffer

3 g KH_2PO_4

6 g Na_2HPO_4

5 g NaCl

1 ml 1 M MgSO_4

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren.

Puffer A

10 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4

8,2 g/l NaCl (15 mS); pH 7,4

Puffer A-Glycerin-Lösung (20%)

300 ml Glycerin in 700 ml Puffer A (s.o.) lösen und sterilfiltrieren.

Glycerinlösung (10% und 20%)

100 ml/ bzw. 200 ml Glycerin in 900 ml/ bzw. 800 ml Aqua dest. lösen und sterilfiltrieren.

Tergitol-BSA-Lösung

Puffer A (s.o.)

1% Tergitol

0,5% bovines Serumalbumin

mischen und sterilfiltrieren.

5 M NaOH-Lösung

200g NaOH in 1000 ml Aqua dest. lösen und sterilfiltrieren

8.5 Chemikalien

Substanz	Firma	Best.Nr.
Carbenicillin	Serva	15875
Cholesterol	ICN Biomedicals	101381
Gentamicin	Gibco	15750-037
D-Glucose-Monohydrat	Boehringer/ Mannheim	713023
Glycerin	Merck	40932500
Isopropanol	Merck	40932500
Kanamycin	Sigma	K-1377
LB-Broth-Base, Lennox	Difco	12780-052
LB-Agar, Lennox	Difco	0401-17-0
Magnesiumsulfat	Sigma	119397
Natriumchlorid	Merck	106.404.5000
Natriumhydroxid	Merck	1.06498.1000
Natriumhypochlorit, 10-13%	Aldrich/Sigma	42.504-4
Natriumhydroxid Pellets	Applichem	A 1551
Nystatin	Calbiochem	475914
Rinderalbumin	Boehringer/ Mannheim	100021
D-Sorbitol	Sigma	S0900
Streptomycin	Sigma	S-6501
Tetracyclin	Sigma	T-3383
Uracil	Fluka	94220

8.6 Tabellen- und Abbildungs-Verzeichnis

	<u>Seite</u>
<u>Abb.1:</u> adulter Hermaphrodit	53
<u>Abb. 2:</u> Größenvergleich zwischen adulten Hermaphroditen, L1-Larven und Wurmeiern	54
<u>Abb. 3:</u> “slow killing“-Absterbekinetik unter Standardbedingungen (<i>B. pseudomallei</i>)	55
<u>Abb. 4:</u> Einfluss der Temperatur auf die “slow killing“- Absterbekinetik (<i>B. pseudomallei</i>)	56-57
<u>Abb. 5:</u> Einfluss des <i>C. elegans</i> -Entwicklungsstadiums auf die “slow killing“- Absterbekinetik (<i>B. pseudomallei</i>)	59
<u>Abb. 6:</u> <i>C. elegans</i> N2 im Transferexperiment (<i>B. pseudomallei</i>)	60-61
<u>Abb. 7:</u> Einfluss des “egg-laying-defects“ auf die “slow killing“- Absterbekinetik (<i>B. pseudomallei</i>)	62-63
<u>Abb. 8:</u> “Eiablagedefekt“ bei einem adulten Hermaphroditen	64
<u>Abb. 9:</u> “fast killing“- Absterbekinetik unter Standardbedingungen (<i>B. pseudomallei</i>)	65
<u>Abb. 10:</u> Einfluss der Temperatur auf die “fast killing“- Absterbekinetik (<i>B. pseudomallei</i>)	66
<u>Abb. 11:</u> Einfluss des <i>C. elegans</i> -Entwicklungsstadiums auf die “fast killing“- Absterbekinetik (<i>B. pseudomallei</i>)	68
<u>Abb. 12:</u> Auswirkung der Bakterienkonzentration auf die “fast killing“- Absterbekinetik (<i>B. pseudomallei</i>)	69
<u>Abb. 13:</u> Nitrocellulose-Assay auf PGS-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	70
<u>Abb. 14:</u> Einfluss von oxidativem Stress beim “fast killing“ (<i>B. pseudomallei</i>)	71-72
<u>Abb. 15:</u> <i>C. elegans</i> N2 auf Brain Heart Infusion-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	74
<u>Abb. 16:</u> <i>C. elegans</i> N2 auf GS-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	75-76
<u>Abb. 17:</u> <i>C. elegans</i> -Mutante <i>age-1</i> auf GS-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	77
<u>Abb. 18:</u> <i>C. elegans</i> N2 im Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	78

<u>Abb. 19:</u> <i>C. elegans</i> -Mutante <i>age-1</i> im Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	79
<u>Abb. 20:</u> <i>C. elegans</i> N2 und <i>age-1</i> im modifizierten Nitrocellulose-Assay auf GS-Agar (<i>B. pseudomallei</i>)	80-81
<u>Abb. 21:</u> Vergleich des <i>B. pseudomallei</i> -Stammes NCTC 7431 vor und nach Mauspassage	82-83
<u>Abb. 22:</u> "slow killing"-Absterbekinetik unter Standardbedingungen (<i>B. cepacia</i>)	85
<u>Abb. 23:</u> Einfluss der Temperatur auf die "slow killing"- Absterbekinetik (<i>B. cepacia</i>)	86-87
<u>Abb. 24:</u> <i>C. elegans</i> im Transferexperiment (<i>B. cepacia</i>)	88
<u>Abb. 25:</u> Mikroskopische Darstellung der fluoreszenzmarkierten <i>B. cepacia</i> - Stämme H111 (pUT-rfp) und H111 m64 (pBBR-5-gfp)	90
<u>Abb. 26:</u> Mikroskopische Darstellung des fluoreszenzmarkierten <i>E. coli</i> -Stammes P. Sunny 1	91
<u>Abb. 27:</u> Einfluss des "egg-laying-defects" auf die "slow killing"-Absterbekinetik (<i>B. cepacia</i>)	95-96
<u>Abb. 28:</u> "fast killing"-Absterbekinetik unter Standardbedingungen (<i>B. cepacia</i>)	97
<u>Abb. 29:</u> Nitrocellulose-Assay auf PGS-Agar (<i>B. cepacia</i>)	99
<u>Abb. 30:</u> Einfluss von oxidativem Stress beim "fast killing" (<i>B. cepacia</i>)	100-101
<u>Abb. 31:</u> <i>C. elegans</i> auf Brain Heart Infusion-Agar (<i>B. cepacia</i>)	102
<u>Tab. 1:</u> verwendete Bakterienstämme	37-38
<u>Tab. 2:</u> Differenzierung der verschiedenen <i>C. elegans</i> -Entwicklungsstadien	44
<u>Tab. 3:</u> Keimzahlen im Verdauungstrakt von <i>C. elegans</i> (I)	92
<u>Tab. 4:</u> Keimzahlen im Verdauungstrakt von <i>C. elegans</i> (II)	94
<u>Tab. 5:</u> <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. gladioli</i> und <i>B. multivorans</i> unter "slow killing"- Bedingungen	104
<u>Tab. 6:</u> <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. gladioli</i> und <i>B. multivorans</i> unter "fast killing"- Bedingungen	105
<u>Tab. 7:</u> <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. gladioli</i> und <i>B. multivorans</i> auf GS-Agar	106

8.7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Aqua dest.	Aqua destillata
Ara	Arabinose
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> -Selektivagar
BHI-Agar	Brain Heart Infusion-Agar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C.</i>	<i>Caenorhabditis</i>
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
°C	Grad Celsius
CF	Cystische Fibrose
CFU	colony forming unit
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
cm	Zentimeter
Co	Cobalt
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Exopolysaccharid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
g	Gramm
gfp	green fluorescent protein
GS	glucose sorbitol

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hgr.	hochgradig
HIV	Humane Immunodeficiency Virus
HSL	Homoserin Lacton
IAA	indole acetic acid
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHA	indirekter Hämagglutinations-Test
K	Kalium
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kalium- Di-Hydrogenphosphat
KPO ₄	Kaliumphosphat
kg	Kilogramm
L	Larve
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LT _{50%}	lethal time 50% (Zeitpunkt, zu dem 50% aller Würmer tot sind)
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter

n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Di-Hydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NC	Nitrocellulose
NG	nematode growth
NGM	nematode growth medium
NHS	normal human serum
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD _{xxx}	Optische Dichte; der Wert (xxx) steht für die Wellenlänge, des zur Messung verwendeten Lichtes in nm
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGS	peptone glucose sorbitol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rfp	red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
spp.	Spezies
subsp.	Subspezies
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TU	Technische Universität
u.a.	und andere
UPM	Umdrehungen pro Minute

USA United States of America

UV-Licht ultraviolettes Licht

z.B. zum Beispiel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation **“Etablierung eines *Caenorhabditis elegans*-Modells zur Virulenzanalyse von human- und tierpathogenen Bakterienspezies der Gattung *Burkholderia*“** selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden keine Hilfen Dritter in Anspruch genommen.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für die Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

.....
Doreen Ebrecht

Hannover, den 10.05.2002

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei Dr. Ivo Steinmetz für die Überlassung des Themas und die stets gute Betreuung, die es mir ermöglichte, diese Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Gerald-Friedrich Gerlach für seine Anregungen und die Übernahme der Betreuung der Arbeit an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Weiterhin danke ich Prof. Bitter-Suermann dafür, dass ich diese Arbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover anfertigen durfte.

Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung und für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Ein besonderer Dank gilt dabei Beate Fehlhaber, die mich in die Welt der Würmer einführte, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, und die zusammen mit mir so manche Nacht am Mikroskop verbrachte.

Allen anderen Doktoranden und Mitarbeitern der Mikrobiologie sei ebenfalls für die gute Atmosphäre im Institut und die große Hilfsbereitschaft gedankt.

Der größte Dank gilt meinen Eltern für ihre großzügige finanzielle Unterstützung, mit der sie mir nicht nur mein Studium, sondern auch die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde, insbesondere Birgit Ackermann, Isabel Ziegler und Stefan Kulla, die mich nicht nur mit netten Abenden auf andere Gedanken brachten, sondern auch geduldig das Korrekturlesen meiner Arbeit übernahmen. Im Besonderen danke ich Andreas Gaßmann, der mit uneingeschränkter Geduld und Zuversicht die großen und kleinen Probleme mitbewältigt hat.

“Last but not least“ möchte ich denjenigen danken, die mir bei meinen Computerproblemen zur Seite standen, und ohne deren Hilfe ich längst verzweifelt wäre.