

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Untersuchungen zur Verbreitung und Funktion des
äußere-Membran-Proteins OmpW von *Salmonella* spp.**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Alexander Postel

Tierarzt aus Göttingen

Gießen, 2008

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM.....	3
2.1 Porine bei Gram-negativen Bakterien.....	3
2.2 Porine bei Salmonellen	4
2.3 Das putative Porin OmpW.....	12
2.3.1 Lokalisation und Organisation von <i>ompW</i> im Genom.....	12
2.3.2 Struktur und Aufbau des Proteins OmpW	16
2.3.3 OmpW-Homologa bei Salmonellen und anderen Bakterien	19
2.3.4 Regulation der Expression von OmpW	21
2.3.5 Lokalisation von OmpW in der Bakterienzelle	25
2.3.6 Milieuabhängige Expression und mögliche Funktionen von OmpW und seinen Strukturhomologa	26
2.3.6.1 Eigenschaften als Pore oder Bestandteil eines Transportsystems	26
2.3.6.2 Bedeutung von OmpW für die Stabilisierung der äußeren Membran.....	30
2.3.6.3 OmpW-vermittelte Virulenzeigenschaften	31
2.3.7 Immunogene Eigenschaften von OmpW	33
3 MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1 Bakterienstämme und Zelllinien.....	34
3.2 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen	40
3.3 Plasmide	40
3.4 Impfstoffe.....	45
3.5 Tiere	46

3.6	Bakteriologische Methoden	46
3.6.1	Anzucht von Bakterien	46
3.6.2	Keimzahlbestimmung	48
3.6.3	Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation mit DNS	48
3.6.4	Phänotypische Charakterisierung von <i>Salmonella enterica</i> -Stämmen	48
3.7	Molekulargenetische Methoden	51
3.7.1	Präparation von DNS	51
3.7.2	Aufreinigung von DNS	52
3.7.3	Bestimmung von DNS-Konzentrationen	53
3.7.4	Restriktion von DNS	53
3.7.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
3.7.6	Agarosegelelektrophorese	60
3.7.7	Pulsfeld-Gelelektrophorese	60
3.7.8	DNS-DNS-Hybridisierung	61
3.7.9	Klonierung	63
3.7.9.1	Klonierung der Gene <i>stm1733</i> und <i>ompW</i> in den pET-24b(+)-Vektor	63
3.7.9.2	Klonierung des <i>katN</i> -Gens in den pET-24b(+)-Vektor	63
3.7.9.3	Klonierung von <i>ompW</i> in pBR322 zur Komplementierung von SL1344Δ <i>ompW</i>	64
3.7.10	Transformation mit DNS	65
3.7.11	Generation einer <i>ompW</i> -Deletionsmutante von <i>S. Tm.</i> SL1344	66
3.7.12	Sequenzierung	68
3.8	Proteinanalytische und -präparative Methoden	68
3.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	68
3.8.2	SDS-PAGE	68
3.8.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Ni ²⁺ -NTA-Matrix	69
3.8.4	Entsalzung von Proteinfractionen	69
3.9	Serologische Methoden	70
3.9.1	Serotypisierung	70
3.9.2	Antikörper und Seren	70
3.9.3	Serumabsorption	72
3.9.4	Immuno-Blot	72
3.9.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	73
3.9.6	Fluorescence-Assisted Cell Sorting (FACS)	73
3.10	Impfungen und Serumgewinnung	74

3.11	Datenhaltung und Auswertung.....	75
3.11.1	Bilddokumentation	75
3.11.2	Auswertung von DNS- und Aminosäure-Sequenzdaten	75
3.11.3	Statistische Auswertung	75
4	ERGEBNISSE.....	76
4.1	Rekombinante Herstellung von OmpW-, STM1733- und KatN-Histidin- markierten Fusionsproteinen zur Herstellung polyklonaler Hyperimmunseren.....	76
4.2	Vorkommen von OmpW bei Salmonellen und anderen Bakterien.....	84
4.2.1	Vorkommen von OmpW bei Salmonellen.....	84
4.2.2	Vorkommen von OmpW bei anderen Bakterien	90
4.3	Untersuchungen zur biologischen Funktion von OmpW bei Salmonellen	93
4.3.1	Verifizierung OmpW-exprimierender und -defizienter Salmonellen-Stämme	93
4.3.1.1	Charakterisierung der natürlichen <i>ompW</i> -Deletionsmutante SARC9.....	93
4.3.1.2	Charakterisierung der gentechnisch erzeugten <i>ompW</i> -Knockout- Mutante SL1344 Δ <i>ompW</i>	97
4.3.2	Untersuchungen zur physiologischen Funktion von OmpW	108
4.3.2.1	Biochemische Stoffwechselleistungen	108
4.3.2.2	Fitness unter verschiedenen <i>in vitro</i> -Wachstumsbedingungen.....	110
4.3.2.3	Widerstandsfähigkeit gegen Chemotherapeutika und Detergentien.....	119
4.3.2.4	Invasionsfähigkeit und intrazelluläres Überleben von Salmonellen	124
5	DISKUSSION.....	126
6	ZUSAMMENFASSUNG	149
7	SUMMARY.....	151
8	LITERATURVERZEICHNIS	153
9	ANHANG	175
10	DANKSAGUNG	182