

ABTEILUNG MIKROBIOLOGIE
ZENTRALINSTITUT FÜR ERNÄHRUNGS- UND
LEBENSMITTELFORSCHUNG WEIHENSTEPHAN
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Funktionale Genomanalyse bei *Salmonella enterica*
Serovar Typhimurium: Einfluss neuartiger Gene
und Genominseln auf die intrazelluläre
Replikationsfähigkeit**

JOCHEN KLUMPP

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Cerny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 20.10.2005 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.12.2005
angenommen.

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran gilt mein Dank Dr. Thilo Fuchs für die Konzeption des Themas und fachkundige Anleitung und Hilfe. Vielen Dank für ständige Hilfsbereitschaft, anregende Diskussionen und wertvolle Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Siegfried Scherer, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Abteilung Mikrobiologie durchzuführen und mich mit seiner fachlichen Kompetenz und Erfahrung unterstützt hat.

Herzlichen Dank den Kollegen Geraldine Bresolin, Kristina Schauer und Patrick Schiwiek aus der Arbeitsgruppe „Pathogene“, die mir viel Unterstützung gegeben haben. Das Arbeiten in der Gruppe hat sehr viel Spaß gemacht und war äußerst professionell.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen an der Abteilung Mikrobiologie für das außerordentlich gute Arbeitsklima sowie für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft in allen fachlichen und nichtfachlichen Fragen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Maria und Bernd, ohne deren stetige moralische und finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie standen stets hinter meinen Plänen und Entscheidungen und haben sie mitgetragen.

Der Ehrenplatz gebührt meiner Frau Eva. Ihre Liebe und Zuversicht haben vieles einfacher gemacht. Es ist schön zu wissen, dass ein geliebter Mensch hinter einem steht. Auch haben mir die fachlichen Diskussionen und Ratschläge aus mancher Sackgasse geholfen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ZUSAMMENFASSUNG	X
SUMMARY	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	1
1.1.1 Taxonomie und Charakteristika	1
1.1.2 Salmonellose.....	3
1.1.3 Infektionszyklus	4
1.1.3.1 Adhäsion und Invasion	5
1.1.3.2 Intrazelluläre Proliferation.....	6
1.1.4 Genetische Charakteristika und Virulenzdeterminanten von <i>S. typhimurium</i>	8
1.1.4.1 Anordnung von Virulenzgenen in Pathogenitätsinseln	8
1.1.4.2 Nichtkoloniale Genominseln in <i>Salmonella</i>	12
1.1.4.3 Intrazellulärer Stoffwechsel von <i>Salmonella</i>	13
1.2 Genomweite Ansätze zur Identifikation von Virulenzgenen	14
1.2.1 Reportergenfusion und Transposonmutagenese.....	14
1.2.2 <i>In vivo</i> -Expressionstechnologie.....	15
1.2.3 Signaturmarkierte Mutagenese (<i>signature-tagged mutagenesis</i>)	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	19
2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen	21
2.2.1 Kultivierung der Bakterienstämme.....	21
2.2.2 Antibiotika	22
2.2.3 Gefrierkulturen und Stammsammlung	22
2.2.4 Wachstumsversuche	22
2.3 Amplifikation, Transformation und Modifikation von DNA	23
2.3.1 PCR.....	23
2.3.2 Transformation	24

2.3.2.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen	24
2.3.2.2	Elektroporation	24
2.3.3	Schneiden von DNA	25
2.3.4	Ligation.....	25
2.4	Gelelektrophorese	26
2.5	Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	27
2.5.1	Präparation chromosomaler DNA	27
2.5.2	Präparation von Plasmid-DNA	27
2.5.3	Dialyse	27
2.5.4	Phenol-Chloroform-Fällung	28
2.5.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.6	Insertionsmutagenese.....	28
2.6.1	Primer für die Insertionsmutagenese	29
2.6.2	Herstellung des rekombinanten Vektors.....	30
2.6.3	Transformation und Integration.....	30
2.7	Deletionsmutagenese	31
2.7.1	Primerwahl für die Deletionsmutagenese.....	32
2.7.2	Herstellung der PCR-Fragmente	33
2.7.3	Integration der Resistenzkassette ins Genom	33
2.7.4	Entfernung der Resistenzkassette	34
2.7.5	Überprüfung der Gendeletion.....	34
2.8	Genkomplementation	34
2.9	Zellkulturmethoden	36
2.9.1	Zelllinie und Kulturbedingungen	36
2.9.2	Zellpassage	36
2.9.3	Zellzählung	36
2.9.4	Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen	37
2.10	Zellkultur-Infektionsassay	37
2.10.1	Vorbereitung der Bakterienkultur.....	37
2.10.1.1	Flüssigkultur	37
2.10.1.2	Gefrierkultur	38
2.10.2	Vorbereitung der eukaryotischen Zellen	38
2.10.3	Infektion der Zellkultur	38
2.10.4	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	39

2.10.5	Fluoreszenzfärbung infizierter Zellen	39
2.11	Promotorstudien	40
2.12	Bioinformatische und statistische Methoden.....	42
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Validierung der Insertionsmutantenbank.....	44
3.1.1	<i>In silico</i> -Validierung.....	44
3.1.2	Nur fünf von 169 Mutanten zeigen eine Wachstumsdefizienz.....	49
3.1.3	159 Insertionsmutanten sind in der intrazellulären Überlebensfähigkeit attenuiert	50
3.1.4	Wenig Übereinstimmung zwischen Überlebensdaten und Mikroarraydaten ...	55
3.1.5	Vektor pIDM ist intrazellulär stabil.....	56
3.2	Nichtpolare Deletion von zehn Genen in <i>S. typhimurium</i>	57
3.2.1	Konstruktion der Deletionsmutanten.....	58
3.2.2	Bestätigung der Gendeletion	58
3.2.3	Alle Deletionsmutanten zeigen wildtypisches Wachstum im Vollmedium	60
3.2.4	Die Deletionsmutanten sind in ihrer intrazellulären Überlebensfähigkeit eingeschränkt	61
3.3	Funktionale Charakterisierung potenzieller neuer Virulenzfaktoren	63
3.3.1	Das <i>cob-cbi-pdu</i> -Gencluster ist maßgeblich an der intrazellulären Überlebensfähigkeit von <i>Salmonella</i> beteiligt	63
3.3.2	Drei neu konstruierte Insertionsmutanten in GEI1528/1562 sind attenuiert....	66
3.3.3	Zehn Mutanten haben eine mit 14028 <i>phoP</i> (593)::pIDM vergleichbare intrazelluläre Überlebensrate	67
3.3.4	Starker Adhäsionsdefekt in einer Mutante eines putativen ABC-Transportsystems	68
3.3.5	Die Transportermutante ist bei der Infektion extrazellulär lokalisiert	70
3.3.6	Der Promotor von STM1255 zeigt keine spezifische Induktion	71
3.4	In ausgewählten Mutanten konnte die Virulenz durch Komplementation wiederhergestellt werden.....	73
3.4.1	Erzeugung der Komplementationsklone	73
3.4.2	Vektor pBR322 ist ohne Selektionsdruck stabil.....	75
3.4.3	80%ige Wiederherstellung der Virulenz in STM1257	75
3.4.4	67%ige Wiederherstellung der Virulenz in 14028ΔSTM1555	76
3.5	Doppelmutanten zeigen einen additiven Effekt.....	76

3.5.1	Erzeugung von Doppelmutanten	77
3.5.2	Zellkulturergebnisse der Doppelmutanten.....	77
4	DISKUSSION	79
4.1	Vergleich der IDM mit anderen Methoden zur Identifikation virulenzrelevanter Gene in Bakterien	79
4.1.1	Reportergenfusion und Transposonmutagenese.....	79
4.1.2	IVET	80
4.1.3	Signaturmarkierte Mutagenese.....	83
4.1.4	Genexpressionsprofil (Mikroarraytechnik)	85
4.2	Genominseln in <i>Salmonella</i>	87
4.2.1	Gifsy-1 und -2 Prophagen	87
4.2.2	Genomische Insel GEI1239/1269 (Transporteroperon)	90
4.2.3	Genomische Insel GEI2016/2058 (<i>cob-cbi-pdu</i> -Gencluster).....	93
4.2.4	Genomische Inseln GEI0266/0307 (SPI-6) und GEI1664/1678	94
4.2.5	Genomische Insel GEI1528/1562.....	96
4.2.6	Genomische Inseln GEI1171/1184 und GEI1911/1925 (Flagellenoperon und Chemotaxisgene)	98
4.2.7	Doppelmutanten in vier genomischen Inseln	100
4.3	Zusammenfassende Betrachtung.....	101
4.4	Ausblick.....	105
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	107
6	ANHANG.....	124
6.1	Verwendete PCR-Primer	124
6.2	Verwendete Nährmedien und Pufferlösungen.....	127
6.3	Intrazelluläre Überlebensdaten für Insertionsmutanten.....	128

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Dendrogramm der phylogenetischen Beziehungen der <i>Salmonella</i> -Subspezies	2
Abbildung 2: <i>S. typhimurium</i> dringt in eine Epithelzelle ein	5
Abbildung 3: Invasionszyklus von <i>S. typhimurium</i>	6
Abbildung 4: Kolonien von <i>S. typhimurium</i> auf XLD-Agar	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Vektor pIDM4	30
Abbildung 6: Ablaufschema der Deletionsmutagenese	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung von Vektor pBR322	35
Abbildung 8: Schematische Darstellung von Vektor pDEW201	41
Abbildung 9: Funktionelle Gliederung der 169 Insertionsmutanten	45
Abbildung 10: Wachstum ausgewählter Mutanten im Vollmedium	50
Abbildung 11: Intrazelluläre Überlebensdaten Insertionsmutanten	54
Abbildung 12: Stabilität von pIDM1 <i>in cis</i> und <i>in trans</i> im Vergleich zu anderen Mutagenesemethoden	57
Abbildung 13: Agarosegel der Deletion von <i>phoP</i> und STM1257	59
Abbildung 14: Sequenzierungsergebnis von 14028 Δ <i>phoP</i>	60
Abbildung 15: Sequenzierungsergebnis von 14028 Δ STM1677	60
Abbildung 16: Wachstumscharakteristika der Deletionsmutanten im Vollmedium	61
Abbildung 17: Stoffwechselweg des Propandiols	64
Abbildung 18: Struktur der von <i>pocR</i> regulierten Operons	64
Abbildung 19: Intrazelluläres Überleben von 14028 <i>pocR</i> (385)::pIDM4	65
Abbildung 20: Proteindomänen im Operon STM1255-STM1259	69
Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien mit 14028 Δ STM1257	71
Abbildung 22: Promotorinduktion von STM1255 während der <i>in vitro</i> -Infektion	73
Abbildung 23: Bestätigung der Klonierung von pBR322::STM1257	74
Abbildung 24: Stabilität von Vektor pBR322 in Flüssigkultur	75
Abbildung 25: Anordnung der Phagengene auf dem Chromosom von <i>S. typhimurium</i>	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme.....	19
Tabelle 2: Verwendete Plasmide	21
Tabelle 3: Antibiotika-Stammlösungen.....	22
Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz	23
Tabelle 5: PCR-Zyklusabfolge.....	23
Tabelle 6: Auswahl an genomischen Inseln in <i>Salmonella</i> mit Vektorinsertionen.....	46
Tabelle 7: Gliederung der Insertionsmutanten nach genomischen Inseln.....	47
Tabelle 8: Intrazelluläre Überlebensdaten der untersuchten Insertionsmutanten.....	52
Tabelle 9: Mikroarraydaten zu den Insertionsmutanten.....	56
Tabelle 10: Überblick über deletierte Gene in <i>S. typhimurium</i> und deren putative Funktion..	58
Tabelle 11: Intrazelluläres Überleben der Deletionsmutanten	62
Tabelle 12: Intrazelluläres Überleben neu konstruierter Mutanten in GEI1528/1562	66
Tabelle 13: Insertionsmutanten mit Überlebensfähigkeit auf dem Niveau von 14028 <i>phoP</i> (593)::pIDM	67
Tabelle 14: Genannotation Operon STM1255-STM1259.....	68
Tabelle 15: Untersuchte Induktionsbedingungen Promotorstudien	72
Tabelle 16: Bestätigung der Genkomplementation- Fragmentlängen im Restriktionsverdau .	74
Tabelle 17: Übersicht über die erzeugten Doppelmutanten	77
Tabelle 18: Intrazelluläre Überlebensrate der Doppelmutanten.....	78
Tabelle 19: Statistische Auswertung der Zellkulturdaten der Doppelmutanten.....	78
Tabelle 20: Putative Funktion der Gene von GEI1528/1562	97
Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	124
Tabelle 22: Intrazelluläre Überlebensdaten für Insertionsmutanten.....	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Absorption, Ampere, Adenin
amp ^R	Resistenz gegen Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
C	Cytosin
CDS	<i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
cm ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle media</i> (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FAE	follikelassoziertes Epithel
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
IDM	Insertions-Duplikations-Mutagenese
IVET	<i>in vivo</i> -Expressionstechnologie
kan ^R	Resistenz gegen Kanamycin
kb	Kilobase
KbE	koloniebildende Einheit(en)
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
m	Milli-
M	Molar

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
mRNA	messenger(Boten)-RNA
N-	Amino-
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NO	<i>nitric oxide</i> (Stickoxid)
nt	Nukleotid/Nukleotide
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
p	Pico-
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
R	Resistenz
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichtstärke)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCV	<i>Salmonella containing vacuole</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
STM	<i>signature-tagged mutagenesis</i> (signaturmarkierte Mutagenese)
T	Thymin
TE	Tris-EDTA-Puffer
tet ^R	Resistenz gegen Tetracyclin
Tn	Transposon
TnM	Transposonmutagenese
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit)
ÜNK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
w/o	<i>without</i> (ohne)
w/v	<i>weight/volume</i> (Masse/Volumen)
wt	Wildtyp, wildtypisch
λ	Wellenlänge des Lichts
μ	Mikro-
Ω	Ohm

ZUSAMMENFASSUNG

Die fakultativ intrazellulären Bakterien der Art *Salmonella enterica* verursachen beim Menschen neben milden Darminfektionen auch schwere systemische Infektionen wie Typhus. Essenziell für die Pathogenität der Bakterien sind das Überleben und die Proliferation in den Makrophagenzellen des Wirts-Immunsystems. Eine Reihe von Virulenzfaktoren, unter anderem die Genprodukte der Pathogenitätsinsel SPI-2, befähigen das Bakterium, etwa durch Sekretion von Effektormolekülen, die intrazelluläre Wirtsabwehr zu überwinden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 223 Insertions-Duplikations-Mutanten von *S. enterica* Serovar Typhimurium validiert und funktional charakterisiert, um neue Gene zu identifizieren, die wichtig für das intrazelluläre Überleben des Pathogens sind. Durch sorgfältige *in silico*-Analyse und Evaluierung der Wachstumscharakteristika konnten 164 Insertionsmutanten ausgewählt werden, welche auf ihr intrazelluläres Proliferationsverhalten im Mausmakrophagen J-774A.1 untersucht wurden. 159 dieser Stämme wurden als attenuiert gefunden. Aufgrund ihrer Lage in zwölf salmonellenspezifischen Genominseln wurden 39 Vektorinsertionen für Detailstudien ausgewählt. Mittels Gendeletion, Erzeugung zielgerichteter Insertionsmutationen, Genkomplementation und Promotorinduktionsversuchen wurden einzelne Gene dieser Inseln näher charakterisiert.

Für die Gene des *cob-cbi-pdu*-Genclusters, welche für die Cobalaminsynthese und den cobalaminabhängigen Propandiolstoffwechsel kodieren sowie für zehn Gene der bislang wenig charakterisierten metabolischen Insel GEI1528/1562, konnte in dieser Arbeit erstmals eine Relevanz bei der intrazellulären Replikation von *Salmonella* nachgewiesen werden. Für ein bislang unbekanntes putatives ABC-Transportsystem aus der genomischen Insel GEI1239/1269 konnte durch Infektionsassays und fluoreszenzbasierte Lokalisationsstudien eine wichtige Rolle während des Adhäsions- und Invasionsprozesses von *S. typhimurium* gezeigt werden. Weiterhin als wichtig für das intrazelluläre Überleben von *S. typhimurium* stellten sich Gene der beiden lysogenen lambdoiden Prophagen Gifsy-1 und Gifsy-2, sowie ein putativer Transkriptionsregulator heraus.

Neukonstruierte Doppelmутanten in zwei unabhängigen Transkriptionseinheiten derselben genomischen Insel zeigen eine stärkere Attenuation als die jeweiligen Einzelmутanten. Dieser additive Effekt zeigt, dass die Inseln in ihrer Gesamtheit einen Virulenzfaktor darstellen könnten. Weiterhin lassen die durch das verwendete *in vitro* Zellkulturmodell erhobenen Daten den Schluss zu, dass 19 der hier erstmals identifizierten Gene, deren Mutation zu einer mindestens fünffachen Attenuation führte, auch für die *in vivo*-Infektion von *S. typhimurium* relevant sind.

SUMMARY

Facultative intracellular bacteria of the species *Salmonella enterica* are the cause of mild gastritis as well as severe systemic infections like typhoid fever in humans. The ability to survive and proliferate in macrophage cells of the host immune system is essential for bacterial pathogenesis. This ability is mediated by a variety of virulence factors, which are commonly encoded on pathogenicity islands like SPI-2, which mediates resistance to host immune response by secretion of effector molecules.

In this work, 223 insertion-duplication mutants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium were validated and functionally characterized, in order to identify new genes involved in intracellular survival of the pathogen. Accurate *in silico*-analysis and evaluation of growth characteristics identified 164 insertion mutants, which were examined for their intracellular proliferation behaviour in the murine macrophage cell line J-774A.1. 159 strains were found to be attenuated in cell culture assays. Out of these, 39 vector insertions were chosen for detailed analysis because of their accumulation within twelve *Salmonella*-specific genomic islands. Single genes of these islands have been characterized in detail by means of gene deletion, generation of target-specific insertions, gene complementation and promoter-induction experiments.

The genes of the *cob-cbi-pdu*-cluster, coding for cobalamin synthesis and propanediol degradation, as well as ten genes of a yet largely uncharacterized metabolic island GEI1528/1562, were shown to play an important role in *Salmonella* replication within macrophages.

The role of a previously unknown putative ABC-transport system encoded in GEI1239/1269 in the adhesion and/or invasion process of *S. typhimurium* could be shown using infection assays and fluorescence-based localisation studies.

The importance for intracellular survival of *Salmonella* was demonstrated for genes of two lysogenic prophages, Gifsy-1 and Gifsy-2, as well as for a putative transcription regulator.

Newly constructed double mutants in two independent transcription units of the same genomic island display greater attenuation than the corresponding single mutants. This additive effect shows that taken together, these islands could constitute a new virulence factor. Finally the data obtained by using the *in vitro* cell culture model leads to the conclusion that 19 of the newly identified genes, the mutagenesis of which led to an at least fivefold attenuation, are important for *in vivo* infection of *S. typhimurium*.

1 EINLEITUNG

Infektionskrankheiten stellen, trotz aller Fortschritte der modernen Medizin, auch in der heutigen Zeit noch eine Bedrohung der menschlichen Gesundheit dar und bedingen etwa 13 Millionen Todesfälle jährlich [1]. Insbesondere in Entwicklungsländern sind Keime, die über verseuchtes Wasser und verdorbene Lebensmittel aufgenommen werden, ein massives Problem für das Gesundheitswesen und bedingen etwa 1,6 Milliarden Erkrankungsfälle jährlich bei Kindern unter fünf Jahren [2]. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Mitglieder der Enterobakterien, die über fäkal-orale Schmierinfektionen verbreitet werden und unter schlechten hygienischen Bedingungen als besonders problematisch anzusehen sind. Zu dieser Gruppe gehört auch die Gattung *Salmonella*, deren Mitglieder aber nicht nur als sich ausweitende weltweite Bedrohung des öffentlichen Gesundheitswesens bedeutsam sind, sondern auch als ein fruchtbares Modell zur Studie grundlegender Mechanismen der bakteriellen Pathogenität. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) beispielsweise wird schon seit langem als Modellorganismus für genetische Studien benutzt, da der Organismus empfänglich für genetische Manipulationen ist [3]. Die molekularen Mechanismen seiner Virulenz sind ausführlich untersucht worden und ein gut charakterisiertes Mausmodell ist verfügbar.

1.1 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

1.1.1 Taxonomie und Charakteristika

Bei *S. enterica* handelt es sich um eine Gattung Gram-negativer, stäbchenförmiger, fakultativ anaerober Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae, die nach dem amerikanischen Bakteriologen Daniel E. Salmon (1850-1914) benannt sind [4, 5]. *Salmonella* ist nahe mit *Escherichia coli* und *Shigella* verwandt [6] und wurde 1880 von Eberth beschrieben und 1884 erstmals von Gaffky kultiviert [7, 8]. Die Bakterien sind bis auf wenige Ausnahmen peritrich begeißelt und beweglich [9]. Salmonellen sind enterische Pathogene von warm- und kaltblütigen Tieren und divergierten vom Genus *Escherichia* vor etwa 120-160 Millionen Jahren [10, 11].

Als Folge des frühen medizinischen Interesses am Genus *Salmonella* wurde für alle entdeckten Serovare ein eigener Speziesname vergeben. Dies führte zu einer unbefriedigenden Nomenklatur, die später durch die Beschränkung auf zwei Spezies (*Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*) mit insgesamt acht Subspezies aufgelöst

werden sollte [11-13]. *S. bongori* (Subspezies V) kolonisiert den Darmtrakt von poikilothermen Tieren. *S. enterica* wird in sieben Subspezies unterteilt, von denen Subspezies I (subsp. *enterica*) die wichtigsten humanpathogenen Salmonellen enthält [4, 11, 14]. Viele der bisher als eigene Spezies deklarierten Stämme werden nun als Serovare dieser beiden Spezies geführt. Es finden jedoch weiterhin beide Nomenklatorschemata Anwendung [6]. Der Genus *S. enterica* umfasst aufgrund der Typisierung der H-Antigene (zentrale Domänen der Flagellenfilamente) und der O-Antigene (O-spezifische Polysaccharidketten) über 2300 Serovare [4, 15, 16].

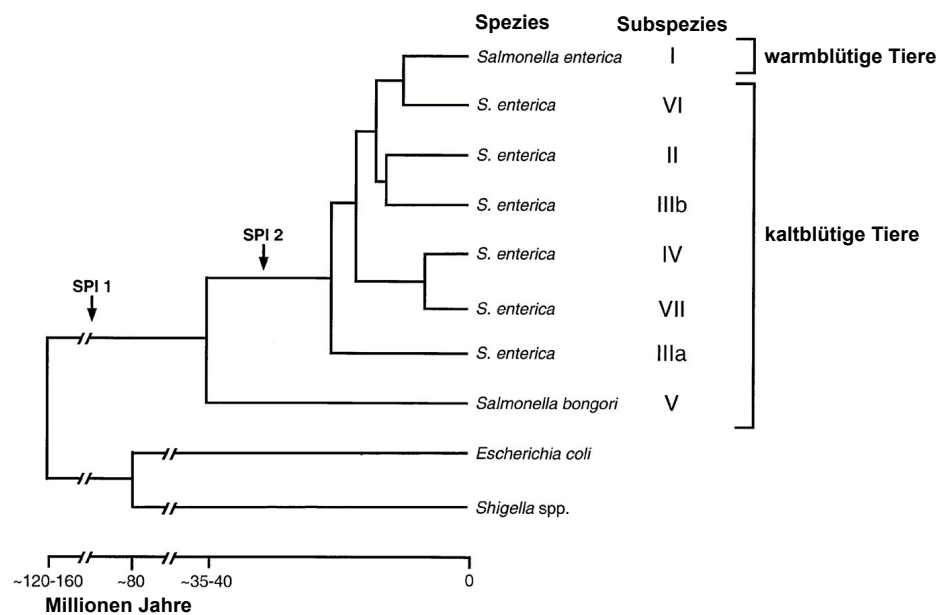


Abbildung 1: Dendrogramm der phylogenetischen Beziehungen der *Salmonella*-Subspezies

Die Abbildung zeigt die Divergenz der Gattung *Salmonella* von *Escherichia coli* und *Shigella spp.* sowie die Unterteilung der Salmonellen in *S. enterica* mit sieben Subspezies und *S. bongori* und deren Wirtsspezifität. Die Abspaltung von *E. coli* und *Shigella* wird durch die Aufnahme der Pathogenitätsinsel SPI-1 markiert, die Aufspaltung zwischen *S. enterica* und *S. bongori* durch die Aufnahme von SPI-2 (siehe 1.1.4.1). Entnommen aus [11].

Um Kontinuität mit der vorhandenen Literatur zu schaffen, wird in der vorliegenden Arbeit die ältere Nomenklatur verwendet. Diese Konvention wird auch durch Tindall et al. als gültig eingestuft [17]. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium wird folglich als *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) bezeichnet.

1.1.2 Salmonellose

S. typhimurium ist der Hauptauslöser für die selbstlimitierende Gastroenteritis beim Menschen. Diese nichttyphoiden Salmonellen verursachen alleine in den USA etwa 1,4 Millionen Lebensmittelinfektionen jährlich und ungefähr ein Viertel aller Krankenhausaufenthalte aufgrund von Lebensmittelinfektionen. In Deutschland wurden im Jahr 2004 etwa 61000 Salmonellosen gemeldet, in den letzten fünf Jahren mehr als 320000 [18]. 90 % aller Lebensmittelinfektionen in Deutschland sind auf Salmonellen zurückzuführen [19]. Es werden mehr lebensmittelbezogene Todesfälle in den USA von nichttyphoiden Salmonellen verursacht, als von allen anderen Pathogenen [20, 21]. Typhoide Erreger wie *Salmonella typhi* hingegen verursachen jährlich etwa 16 Millionen Erkrankungen und ca. 600000 Todesfälle [22]. Die Dunkelziffer für beide Erreger liegt aber wohl weit höher, denn Schätzungen gehen davon aus, dass nur etwa 1-20 % aller Salmonelleninfektionen überhaupt bekannt werden [19, 23]. Die Gesundheitsgefahr durch diese Erreger hat sich in jüngster Zeit auch durch das Auftreten multiresistenter Stämme von *S. typhimurium* (etwa DT104) bestätigt [24-27].

Eine Infektion mit Erregern der Gattung *Salmonella* erfolgt im Regelfall fäkal-oral durch kontaminierte Nahrungsmittel wie Fleisch und Fleischprodukte, Milchprodukte sowie auch durch Eier [28-30]. Dies stellt vor allem in der industriellen Massentierhaltung ein massives Problem dar, insbesondere da infizierte Tiere oft asymptomatisch, aber dennoch infektiös sind [2, 6, 31-34]. Die Infektionsdosis für Menschen liegt im Bereich von 10^6 bis 10^9 Bakterien für die meisten Serovare [35]. Andere Quellen sprechen von 10^2 bis 10^3 KbE/ml für *S. typhi* und etwa 10^6 KbE/ml für *S. typhimurium*. Diese Dosis kann je nach gesundheitlicher Prädisposition der betroffenen Person auch stark erniedrigt sein, beispielsweise bei immunsupprimierten oder älteren Patienten und Kindern [19]. So waren beinahe 50 % der zwischen 1996 und 1999 wegen Salmonellose in den USA behandelten Patienten älter als 60 Jahre und fast alle Todesfälle traten bei Patienten mit einer schweren Grunderkrankung auf [20].

S. typhimurium erzeugt bei Mäusen eine letale systemische Infektion, die dem typhoiden Fieber beim Menschen ähnlich ist, wohingegen beim Menschen nur eine milde Gastroenteritis hervorgerufen wird. Aus diesem Grund stellt die Infektion bei Mäusen ein exzellentes Modell der systemischen Infektion beim Menschen dar. Es handelt sich hierbei um eine der zurzeit am besten untersuchten Bakterium-Wirt-Interaktionen überhaupt [11]. Da murine Infektionen mit *S. typhimurium* in einer Infektion resultieren, die dem typhoiden Fieber im Menschen ähnelt, welches von *S. typhi* und *S. paratyphi* A, B und C ausgelöst wird, ist ein anderes

Tiermodell für die Studie von *S. typhimurium*-induzierter Diarrhö nötig. Kaninchen und Kälber als Modellorganismen haben sich hier als gut geeignet herausgestellt [36-39]. Kürzlich wurden streptomycinbehandelte Mäuse als ein neues Tiermodell für die Untersuchung der durch *S. typhimurium* ausgelösten Kolitis vorgeschlagen [40].

Die Infektion mit *Salmonella* spp. kann, je nach Gattung und Serovar, verschiedene Verläufe nehmen: Eine Gastroenteritis wird normalerweise von Bakterien der Gattung *S. enteritis* verursacht und verläuft nicht lebensbedrohlich. Sie ist charakterisiert durch Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Bauchschmerzen und evtl. Fieber [35]. Die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend. Enterisches Fieber wird von *S. typhi* und *S. paratyphi* A, B und C verursacht und ist gekennzeichnet durch lange Fieberperioden und Bakteriämie. Es kann zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie multiplem Organversagen kommen. Salmonellen, welche die intestinale Barriere durchbrochen haben, können in den Blutstrom gelangen und eine systemische Bakteriämie verursachen. Dies wird vor allem durch Vertreter von *S. choleraesuis* ausgelöst. Als Folge einer akuten oder asymptomatischen Infektion kann *Salmonella* für Zeitspannen > 1 Jahr in 10^6 bis 10^9 Organismen pro Gramm Stuhl ausgeschieden werden (Träger-/Dauerausscheiderstadium) [35, 41].

1.1.3 Infektionszyklus

Während der Infektion des tierischen Wirts durchläuft *Salmonella* eine Reihe von verschiedenen Mikroumgebungen. Jede dieser Umgebungen hat distinkte chemische und physikalische Charakteristika, zudem trifft das Pathogen in jeder dieser Umgebungen auf Komponenten des Wirts-Immunsystems. Die hochspezifische Anpassung des Bakteriums auf diese Anforderungen soll im Folgenden dargestellt werden.

Der Infektionszyklus von *S. typhimurium* ist charakterisiert durch folgende Phasen: Der Durchtritt durch den Magen, die Anheftung an Zellen des Dünndarmgewebes, das Eindringen in das Darmepithel, die Proliferation in den darunter liegenden Schichten des Epithels und in phagozytischen Zellen im Lymphsystem, die Besiedelung von Organen, Bakteriämie und schlussendlich die Ausscheidung der Bakterien aus dem Wirtsorganismus [6, 42-45]. Da für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nur die Phasen des Anheftens und Eindringens in das Darmepithel sowie die Proliferation im Makrophagen wichtig sind, sollen nur diese näher ausgeführt werden.

1.1.3.1 Adhäsion und Invasion

Salmonellen, welche die saure Umgebung des Magens sowie die Verdauungsaktivität der Gallensalze überleben, gelangen in den Dünndarm. Die intestinale Barriere des Dünndarms besteht überwiegend aus einer relativ undurchlässigen Schicht von durch *tight junctions* dicht miteinander verbundenen Epithelzellen [35]. Bedeutend für dieses Eindringen in Epithelzellen des Dünndarms ist die Fähigkeit des Bakteriums, an das intestinale Gewebe zu adhären, was in den verschiedenen Serovarianten von *Salmonella* von unterschiedlichen Fimbrientypen vermittelt wird [7]. Aus der anfänglichen Anheftung von *Salmonella* an die apikale Oberfläche des intestinalen Epithels resultiert eine Degeneration der Mikrovilli. Der Kontakt zwischen Bakterium und der Wirtszelle stößt die Synthese und Anheftung dünner Zellfortsätze an das Bakterium an (Trigger-Mechanismus), welche der Wirtszelle den Beginn der Ausstülpung signalisieren könnten und die Invasion vorantreiben [46]. Die Wirtszellmembran beginnt darauf als Zeichen lokaler Umlagerungen des Zytoskeletts anzuschwellen und Blasen zu werfen [47]. Gekräuselte Strukturen (*membrane ruffles*) an der Eintrittsstelle der invasiven *S. typhimurium* umschließen und internalisieren das Bakterium auf makropinozytotische Art [48, 49].

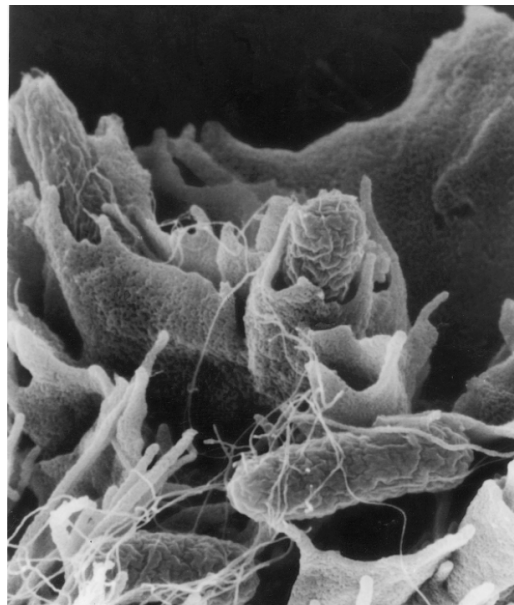


Abbildung 2: *S. typhimurium* dringt in eine Epithelzelle ein

Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. typhimurium* beim Eintritt in eine Hep-2-Zelle. Membranausstülpungen (*ruffles*) erstrecken sich von der Zelloberfläche zu den Bakterien und umschließen sie. Quelle: [3]

Salmonella passiert im Mausmodell die Darmbarrieren vorwiegend via M-Zellen im follikelassoziierten Epithel (FAE) der Peyer'schen Plaques [50]. M-Zellen fungieren als

Antigensammelzellen, die das aufgefangene Material über das FAE zum darunter liegenden Lymphgewebe bringen, wo die protektive Immunantwort initiiert wird [51-54]. Es wurde gezeigt, dass nichtinvasive (invasionsdefekte) Mutanten von *Salmonella* spp. deshalb avirulent sind, weil sie unfähig sind, in M-Zellen der Peyer'schen Plaques des Ileums einzudringen und sie zu zerstören [55]. Neuere Erkenntnisse deuten aber darauf hin, dass dendritische Zellen ebenfalls den Durchtritt der Bakterien durch die Schleimhäute des Darmbereichs vermitteln können. Diese Zellen unterbrechen die *tight junctions* zwischen den Epithelzellen, bilden Dendriten zur Außenseite des Epithels aus und können die Bakterien direkt aufnehmen [56, 57].

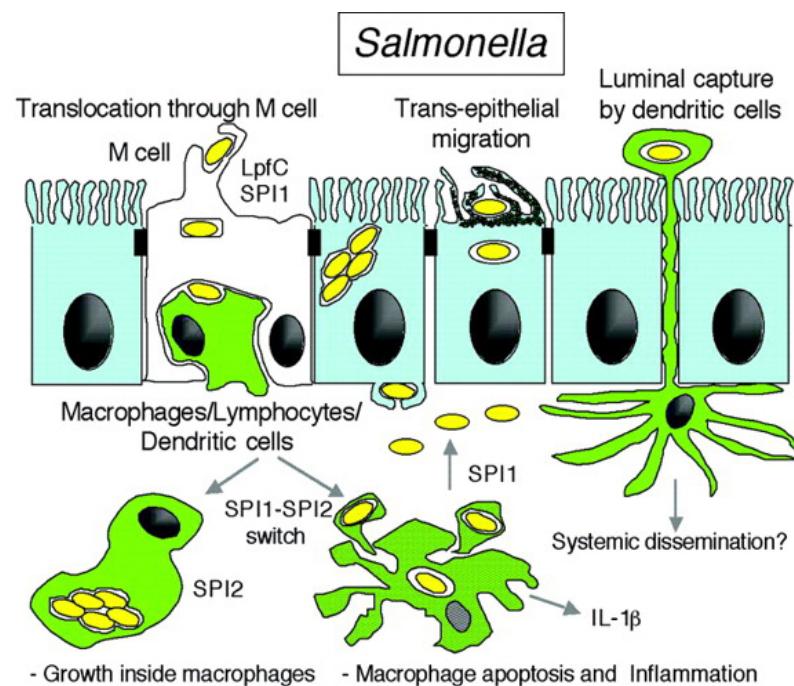


Abbildung 3: Invasionszyklus von *S. typhimurium*

Zu sehen ist die intestinale Epithelzellschicht. *Salmonella* kann in die intestinalen Epithelzellen eindringen sowie durch die in der Epithelschicht gelegenen M-Zellen. Nach der Translokation werden Salmonellen von Makrophagen attackiert. Das Pathogen kann im Makrophagen überleben und diesen durch Apoptoseauslösung zerstören. *Salmonella* spp. kann außerdem von dendritischen Zellen aufgenommen werden und so durch die Epithelzellschicht treten. Quelle: [60]

1.1.3.2 Intrazelluläre Proliferation

Es wurde bereits ausführlich gezeigt, dass *S. typhimurium* in murine Makrophagen eindringen und in diesen überleben und replizieren kann [45, 61-64]. Mutanten von *S. typhimurium*, die nicht im Makrophagen überleben können, sind avirulent [65]. Diese intrazelluläre Proliferation ist essenziell für die Pathogenität des Bakteriums [64, 65]. Bislang bekannte Virulenzfaktoren von *Salmonella*, die Einfluss auf die intrazelluläre Proliferation nehmen, sind unter anderem die Gene *rpoE*, *mig-14*, *pagC*, *virK*, *htrA*, *dnak* und *groEL* [66-71].

Salmonellen erreichen die Internalisation in den Makrophagen durch einen Trigger-Mechanismus, ähnlich der bereits beschriebenen Invasion von Epithelzellen. Nachdem die Bakterien in den Makrophagen eingedrungen sind, liegen sie in großen, membrangebundenen Phagosomen (2-6 µm im Durchmesser) vor, in denen sie meist frei beweglich sind [49, 72]. Die Biogenese dieser so genannten *Salmonella containing vacuole* (SCV) wird von den Bakterien selbst geregelt und die Fusion mit Lysosomen wird verhindert [72-75]. Die SCV akquiriert zwar einige lysosomale Membranproteine, es werden jedoch keine lysosomalen Enzyme gebildet. Das Salmonellenprotein SpiC, dessen Gen auf SPI-2 gelegen ist, ist ein Inhibitor für eine Vielzahl von zellulären Signalübertragungsprozessen wie die Phagosom-Lysosom-Fusion, die Phagosom-Endosom-Fusion, die vesikuläre Signalübertragung in degradativen Stoffwechselwegen und das Recycling von Transferrin. Das Protein SifA von *Salmonella* scheint die Wirtszell-Signalwege so zu verändern, dass ein Nettozuwachs der SCV durch Verschmelzen kleinerer Vesikel mit der SCV erfolgen kann, um Platz für die replizierenden Bakterien zu schaffen [72, 76]. Weitere Beispiele für die Manipulation der Signalübertragungsmechanismen der Wirtszelle sind die an der Änderung des Zytoskeletts beteiligten Proteine SopE und SptP (siehe 1.1.4.1) sowie die Apoptoseauslösung im Makrophagen.

Das Überleben in diesen Wirtsumgebungen beinhaltet eine Vielzahl von Gefahren für den Organismus, wie zum Beispiel erniedrigter pH-Wert, oxidativer Stress, Nährstoffmangel und antimikrobielle Moleküle (Defensine) [42]. Makrophagen und dendritische Zellen produzieren Zytokine und Chemokine, wenn sie in Kontakt mit pathogenen Bakterien kommen [77]. Speziell Makrophagen antworten auf eine Infektion durch Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor(TNF)- α , Interleukinen wie IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 und Chemokinen, wie die inflammatorischen Proteine MIP-1 und MIP-2 (*macrophage inflammatory protein*) [78]. Der durch *Salmonella* aktivierte Makrophage produziert außerdem auf Stimulation mit diesen Zytokinen hin sauerstoffabhängige antimikrobielle Substanzen wie Superoxide, Wasserstoffperoxid und Stickoxide (NO), um die intrazellulären Salmonellen an der Proliferation zu hindern und abzutöten [79-82].

Es wurde weiterhin gezeigt, dass *Salmonella* im Makrophagen den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren kann. Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob die Abtötung des Makrophagen schnell nach der Infektion eintritt [83-85] oder Infektionszeiten von bis zu 24 Stunden dazu nötig sind [86, 87]. Einige Gruppen haben gezeigt, dass von *Salmonella* abgetötete Makrophagen typische Apoptoseanzeichen zeigen, wie Chromatin-Fragmentation [83, 84], Caspase-3-Aktivierung [88] und das Vorkommen von Nukleosomenkomplexen im

Cytoplasma [83]. Andere Arbeitsgruppen hingegen berichteten, dass der Prozess eher einer Nekrose ähnelt, mit Anzeichen wie dem Fehlen der Caspase-3-Aktivität oder dem Verlust der Membranintegrität [83, 85, 89]. Diese anscheinend konträren Ergebnisse sind wahrscheinlich Folge verschiedener experimenteller Ansätze [90, 91]. Der Prozess der Makrophagenabtötung mag wichtig für das bakterielle Überleben und die Rekrutierung weiterer Phagozyten sein, die die systemische Verbreitung der Bakterien unterstützen [92].

1.1.4 Genetische Charakteristika und Virulenzdeterminanten von *S. typhimurium*

S. typhimurium besitzt ein 4875432 Basenpaare großes Chromosom, sowie ein 93939 Basenpaare großes *low-copy* Virulenzplasmid namens pSLT, mit einem GC-Gehalt von jeweils 53 %. Es wurden während der Genomsequenzierung im Chromosom 4489 kodierende Sequenzen (CDS) identifiziert, davon 39 Pseudogene und auf dem Plasmid 108 CDS, davon sechs Pseudogene [16]. Die in dieser Arbeit verwendete, aktuelle Annotation umfasst 4600 CDS auf dem Chromosom, davon 39 Pseudogene und 111 RNA-kodierende Bereiche, sowie 111 CDS, davon sechs Pseudogene, auf dem Plasmid pSLT [93]. Das Genom von *S. typhimurium* enthält mindestens fünf intakte Prophagen: Gifsy-1, Gifsy-2 und Gifsy-3 [94, 95] sowie Fels-1 und Fels-2 [94, 96].

Obwohl das Überleben im Makrophagen Salmonellen vor den Folgen der humoralen Immunantwort schützt und dem Bakterium ein Eindringen in tieferes Wirtsgewebe erlaubt [42, 86], stellt diese Umgebung das Bakterium doch vor Probleme. Es wird mit der nährstoffarmen und mikrobiziden Umgebung im Phagosom konfrontiert. Salmonellen benötigt deshalb zum intrazellulären Überleben und zur Replikation die Funktion einer Vielzahl von Proteinen. Deren Funktion reicht von der Biosynthese der Makromoleküle über Enzymaktivitäten, die Schäden durch antimikrobielle Aktivitäten des Wirts beheben, bis zu Virulenzfaktoren, die aktiv die Wirtszellfunktionen modulieren [13, 42, 97]. Auf die genetischen Determinanten, welche die genannten Funktionen vermitteln, soll im Folgenden eingegangen werden.

1.1.4.1 Anordnung von Virulenzgenen in Pathogenitätsinseln

Der Hauptunterschied zwischen nichtpathogenen und pathogenen Bakterien derselben oder nahe verwandten Spezies ist das Vorhandensein zusätzlicher Gene in den pathogenen Bakterien, die mit der Virulenz assoziiert sind [98]. Diese Virulenzfaktoren sind häufig in distinkten Regionen des Bakterienchromosoms, den so genannten Pathogenitätsinseln kodiert.

Dabei handelt es sich um Bereiche von etwa 10-200 kb Größe, die spezifische Merkmale aufweisen. Sie zeigen generell einen vom Restchromosom abweichenden GC-Gehalt. Dieser schwankt bei *S. typhimurium* zwischen 37 und 47 % im Vergleich zu 53 % im übrigen Chromosom. Pathogenitätsinseln sind häufig in tRNA-Gene inseriert, werden oft von Regionen großer Homologie zu nahe verwandten, aber apathogenen Bakterien flankiert, und Reste von Bakteriophagen und Insertionssequenzen liegen häufig nahe den Grenzen dieser Gene. Die Inseln kommen nicht oder nur sporadisch in apathogenen Stämmen derselben oder einer nah verwandten Spezies vor [98-100]. Viele der Gene von *Salmonella*, die für die Einrichtung spezifischer Interaktionen mit dem Wirt nötige Determinanten kodieren und für die bakterielle Virulenz in einem vorgegebenen Tiermodell benötigt werden, sind in solchen Regionen des Chromosoms angeordnet, die als *Salmonella pathogenicity island* (SPI) bezeichnet werden. Viele dieser Inseln haben eine Mosaikstruktur und wurden wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer erworben [98]. Zurzeit sind zwölf dieser Inseln beschrieben und zwei von ihnen (SPI-1 und SPI-2) kodieren Typ-III-Sekretionssysteme [3, 37, 101, 102]. Die Pathogenitätsinseln SPI-7 bis SPI-10 und HPI [101] kommen nach momentanem Wissensstand nicht in *S. typhimurium* vor und sollen in diesem Zusammenhang nicht weiter diskutiert werden.

SPI-1 ist 40 kb groß, wird von den Genen *fhIA* und *mutS* flankiert und hat einen GC-Gehalt von 42 %. Es enthält mindestens 29 Gene, die Komponenten eines Typ-III-Sekretionssystems kodieren, sowie dessen Regulatoren und Effektoren, die für die Invasion notwendig sind [7, 103, 104]. So beginnt die bakterielle Invasion des Darmepithels mit der Expression des Typ-III-Sekretionssystems von SPI-1 (kodiert durch die Loci *inv-spa* und *prg-org*), welches die Injektion von Effektorproteinen von der Bakterienzelle in das Zytoplasma der Wirtszelle vermittelt [7, 105, 106]. Diese Effektorproteine werden für die Invasion in nichtphagozytischen Zellen wie M-Zellen des intestinalen Epithels [50, 107-109] und die Enteropathogenese [110] benötigt. Hauptfaktor der Regulation der Genexpression des SPI-1 scheint die Veränderung des pH-Werts von sauer zu mild basisch zu sein [111]. Dies reflektiert die Physiologie der *in vivo*-Infektion: Die Bakterien gehen durch den sauren Magen in das leicht basische Milieu des Dünndarms [102]. Insgesamt wird der Effekt von mindestens sechs verschiedenen auf SPI-1 gelegenen Invasionsgenen durch Sauerstoffkonzentration, Osmolarität, das Zwei-Komponentensystem PhoP/Q und den Transkriptionsaktivator HilA koreguliert [112].

Im Folgenden sollen die wichtigsten Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems von SPI-1 kurz vorgestellt werden.

SipC fungiert als Translokase und transloziert sich selbst über das Typ-III-Sekretionssystem in das Wirtszytosol. Dieses Protein bündelt Aktinfilamente und verstärkt die Aktin-Filamentation. Daraus resultieren die bereits beschriebenen Zytoskelettlagerungen während des Invasionsvorgangs [113] (siehe 1.1.3.1). SipA, das nicht für den Invasionsvorgang benötigt wird, bindet an F-Aktin und verhindert dessen Depolymerisation. SipA verstärkt also den Effekt von SipC [113, 114]. SipB ist der bakterielle Effektor für die Apoptoseinduktion im Makrophagen. Es wird mittels des SPI-1 kodierten Typ-III-Sekretionssystems in das Zytosol sekretiert, wo es Caspase-1 bindet und aktiviert. Caspase-1 aktiviert daraufhin IL-1 β [115]. SopE2 aktiviert die zelluläre RhoGTPase Cdc42 des Wirts und spielt eine Rolle beim Rekrutieren des Aktin-Anhäufungskomplexes Arp2/3 an den Membranausstülpungen (*ruffles*) [116]. SptP fungiert als GTPase-aktivierender Faktor für Rac-1 und Cdc42. Es wurde gezeigt, dass SptP das Aktin-Zytoskelett der Zelle zerstört und damit die von den Bakterien während der Invasion erzeugten Veränderungen rückgängig machen kann [117]. SopE2 und SptP verändern also die intrazellulären Signalwege der Wirtszelle zugunsten des eingedrungenen Bakteriums.

SPI-2 bildet eine Insertion von etwa 40 kb am tRNA^{Val}-Gen und ist in zwei Segmente unterteilt, welche beide wahrscheinlich in verschiedenen horizontalen Gentransfers erworben wurden. Es enthält mehr als 40 Gene, inklusive der Komponenten für ein weiteres Typ-III-Sekretionssystem, das aber funktional und strukturell verschieden von dem in SPI-1 kodierten ist [102, 118, 119]. Die Gene auf SPI-2 werden in vier verschiedene Gruppen unterteilt: *ssa* (*secretion system apparatus*) Bestandteile des Sekretionssystems, *ssr* (*secretion system regulators*) Regulatoren des Sekretionssystems, *ssc* (*secretion system chaperones*) Chaperone und *sse* (*secretion system effectors*) Effektoren [102, 120].

Die Effektorgene *sse* und *ssc* scheinen dabei als ein großes Neun-ORF-Operon transkribiert zu werden. Das von SPI-2 kodierte Typ-III-Sekretionssystem ist für das intrazelluläre Überleben der Bakterien unabdingbar. Mutanten des SPI-2 kolonialisieren zwar Mäuse, verbreiten sich in ihnen aber nicht über die Peyer'schen Plaques hinaus [121]. Eine Schwächung der Funktion dendritischer Zellen durch SPI-2-kodierte Gene scheint überdies eine bedeutsame Rolle in der Pathogenität von Salmonellen zu spielen [57].

Über die im Folgenden vorgestellten Genominseln SPI-3 bis SPI-6 ist wenig bekannt, lediglich die Funktion einzelner Gene konnte bislang identifiziert werden.

SPI-3 ist eine 17 kb große Insertion am *sel/CtRNA*-Lokus [122]. Der GC-Gehalt beträgt 47,5 %. Auch dieses SPI hat eine Mosaikstruktur und scheint während der Evolution des Bakteriums in mehreren Schritten aufgenommen worden zu sein. SPI-3 hat zehn ORFs, organisiert in sechs Transkriptionseinheiten [102, 123]. Zwei der Gene (*mgtB* und *mgtC*), die ein hochaffines Mg^{2+} -Aufnahmesystem bilden, sind für die Anpassung an die Nährstoffeinschränkungen im intrazellulären Habitat und damit für das intrazelluläre Überleben im Makrophagen und die Virulenz in der Maus wichtig [101, 122-124].

SPI-4 ist eine 25 kb-Insertion, flankiert von den Genen *ssb* (*single strand DNA binding*) und *soxSR* (*superoxid response regulatory genes*). SPI-4 enthält 18 putative ORFs. Drei dieser ORFs kodieren Proteine, die eine signifikante Homologie zu Proteinen haben, die an Toxinsekretion beteiligt sind [102, 125]. SPI-4 wurde noch nicht im Detail untersucht, aber einige Virulenzfaktoren konnten in dieser Region identifiziert werden, darunter ein putatives Typ-I-Sekretionssystem [101].

Die chromosomale Insertion SPI-5 ist flankiert von den Genen $tRNA_1^{Ser}$ (*serT*) und *copS/copR* [126]. Der GC-Gehalt ist auch hier niedriger als im restlichen Chromosom und liegt bei 43,6 % [102]. Im Bereich dieser Insel sind die *sop*-Gene kodiert. Eine Mutante in *sopA* (*sigD*) in *S. dublin* weist eine signifikant reduzierte Aktivität bei der Auslösung von Inflammation und Flüssigkeitsabsonderung in den Darm auf- obwohl sie sich bei der Invasion der Peyer'schen Plaques wildtypisch verhält [127]. Auch das Genprodukt von *sopB* ist eine Inositol-Phosphatase, die eine Rolle in die Auslösung der Flüssigkeitsabsonderung in das Darmlumen spielt [101, 128]. Beide Gene scheinen also an der Entstehung der Diarrhösymptome beteiligt zu sein [126, 127].

Ein genomischer Bereich von 47 kb Größe wurde als SPI-6 identifiziert. Es ist neben dem *aspV*-tRNA-Gen inseriert und enthält 37 putative ORFs, darunter das *saf*-Fimbrinenoperon, den Transkriptionsregulator *sinR*, das Gen *pagN*, welches ein Invasion kodiert, sowie einige unbekannte Gene. Auch diese Pathogenitätsinsel zeigt eine Mosaikstruktur [101, 129].

Interessant ist in diesem Zusammenhang noch das *Salmonella genomic island* SGI-1, das in *S. typhimurium* DT104 und DT120 gefunden wurde, Resistenz gegen eine Kerngruppe von Antibiotika, darunter Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamide und Tetracyclin vermittelt und 15 bislang unbekannter ORFs enthält, die potenzielle

Virulenzfaktoren kodieren könnte [27, 98]. Die Aufnahme dieser Pathogenitätsinseln demonstriert eindrucksvoll das Potenzial des horizontalen Gentransfers in Bakterien.

An dieser Stelle soll noch ergänzend das Zweikomponentensystem PhoP/Q vorgestellt werden, welches an der Regulation der Virulenzgene in *Salmonella* maßgeblich beteiligt ist. Insbesondere Gene des SPI-1 und SPI-2 unterliegen der Kontrolle von PhoP/Q [112, 130]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass PhoP/Q indirekt die Expression der Gene *spi/ssa* und damit das Typ-III-Sekretionssystem des SPI-2 im Makrophagen kontrolliert [130]. Dieses Zweikomponentensystem reguliert insgesamt etwa 40 Gene in *S. typhimurium* [72]. Das System besteht aus einer membrandurchspannenden Sensorkinase (PhoQ), die auf Umweltsignale hin, wie etwa niedrige Mg^{2+} -Konzentration, eine zytoplasmatische Komponente (PhoP) phosphoryliert. Nach dieser Phosphorylierung fungiert PhoP dann als Transkriptionsaktivator [3, 131]. PhoP/Q-aktivierte Gene werden dabei als *pag* bezeichnet, reprimierte Gene als *prg*. *pags* werden im Phagosom des Makrophagen exprimiert. *prg*-Gene dagegen werden im Phagosom ausgeschaltet. Darunter scheinen sich auch Komponenten des Typ-III-Sekretionssystems von SPI-1 zu befinden [3, 132]. Die Transkription von *pags* wird 3-4 Stunden nach der Internalisation der Bakterien durch den Makrophagen induziert, während eine Induktion in Epithelzellen nicht stattfindet [133, 134]. Signale, die vom PhoP/Q-System erkannt werden, sind beispielsweise die pH-Wert-Erniedrigung im Phagosom des Makrophagen [133] oder Mg^{2+} -Ionen [131].

Mutanten im Gen *phoP* sind hoch virulenzattenuiert und zeigen einen starken Überlebens- und Replikationsdefekt im Makrophagen [135] sowie im Mausmodell [136]. Mäuse überleben eine Verzehnfachung der LD_{50} -Dosis (Infektionsdosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben), wenn sie mit einer *phoP*-Mutanten statt dem Wildtypstamm infiziert werden [136]. Sogar eine zehntausendfache Virulenzreduktion durch eine Deletion von *phoP/Q* wurde berichtet [135].

1.1.4.2 Nichtkollineare Genominseln in *Salmonella*

Aus der Publikation der Genomsequenz von *S. typhimurium* LT-2 durch McClelland et al. [16] geht hervor, dass bestimmte Bereiche im Genom von *S. typhimurium* nichtkollinear im Vergleich zu den Genomen nahe verwandter Organismen sind. Nichtkollinear bedeutet, dass weder eine Konservierung der Syntenie, also der Reihenfolge zweier Gene auf dem Chromosom, unabhängig von etwaigen Verwandtschaftsbeziehungen, noch der Reihenfolge von orthologen Loci in zwei oder mehr Spezies vorliegt. Untersucht wurde in dieser Studie die Genomsequenz von *S. typhimurium* im Vergleich zu den drei komplett sequenzierten

Genomen von *S. typhi*, *Escherichia coli* K-12 und O157:H7 sowie zu den teilsequenzierten Genomen von *S. paratyphi* A und B, *S. arizonae*, *S. bongori* und *Klebsiella pneumoniae*. Dies geschah auf Basis von Sequenzvergleichen und Mikroarrayanalysen. Es handelt sich hier um allesamt sehr nahe verwandte Organismen [16].

Mehr als 60 Genominseln, mit einer Mindestlänge von vier Genen, konnten identifiziert werden, darunter die bereits bekannten SPI-1 mit SPI-6 [101] sowie fimbrienkodierende Regionen und die Prophagen Gifsy-1 und Gifsy-2 sowie Fels-1 und Fels-2. Diese nur in *Salmonella* zu findenden Gene könnten erst nach der Divergenz der Gattungen *Escherichia* und *Klebsiella* aufgenommen worden sein oder wurden in diesen Genera verloren [16]. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades im Genus *Salmonella* kann aber angenommen werden, dass diese Inseln unter bestimmten Bedingungen einen Selektionsvorteil darstellen. Nur ein kleiner Teil dieser Gene von etwa 20 % scheint bisher näher untersucht worden zu sein, was Raum für die Auffindung potenzieller neuer Virulenzfaktoren lässt.

1.1.4.3 Intrazellulärer Stoffwechsel von *Salmonella*

Die Interaktion zwischen pathogenen Bakterien und deren Wirt wird durch Überlebensstrategien auf beiden Seiten bestimmt, zu denen auch der Wettstreit um essenzielle Nährstoffe gehört [137]. Über den Stoffwechsel von *Salmonella* im Makrophagen ist jedoch bislang nur sehr wenig bekannt.

Wie bereits dargelegt, trifft das Bakterium in der Vakuole im Makrophagen ein sehr nährstoffarmes Milieu an. Ein Teil der Gene, die für das Wachstum im Makrophagen benötigt werden, kodiert folglich Enzyme, die an biosynthetischen Stoffwechselwegen beteiligt sind, wie etwa an der Synthese von Purinen (z.B. *purA*, *purE*, *purB/D*) und aromatischen Aminosäuren (z.B. *aroA*, *aroC*, *aroD*). Deren Funktion ist indikativ für das Nährstoffangebot in der Vakuole [65, 72]. Es wurde bereits früh gezeigt, dass Mutanten in diesen Genen in der Maus attenuiert sind [138, 139]. Das *aroA*-Gen etwa kodiert die Chorismat-Synthase, ein in der Biosynthese von aromatischen Verbindungen benötigtes Enzym. Der Grund für die attenuierende Wirkung der Mutanten von *aroA* scheint zu sein, dass zwei aromatische Verbindungen, para-Aminobenzoessäure und 2,3-Dihydroxyaminobenzoessäure wachstums-limitierend im Säugetiergewebe sind [139, 140].

In genomweiten Ansätzen zur Untersuchung auf Virulenzgene werden häufig Gene, die für Enzyme des Kohlenstoff- (Galaktosidase, Fruktosidase) oder Aminosäure-Metabolismus (Purin-, Threonin-, Prolinsynthese, Serinstoffwechsel) kodieren, als virulenzwichtig eingestuft [141, 142].

Die Beobachtung, dass viele auxotrophe Mutanten von *Salmonella* nicht intrazellulär replizieren können und virulenzattenuiert sind, hat zu der Vermutung geführt, dass die intrazellulären Bakterien eine *de novo*-Synthese spezieller Makromolekül-Vorstufen nutzen, sobald sie in die Wirtszelle gelangt sind [65, 143, 144]. Ein kürzlich erstelltes Expressionsprofil intrazellulärer *S. typhimurium* zeigte aber, mit Ausnahme der *aro*-Gene, keine Regulation einer Reihe von Genen, die in diese *de novo*-Synthesen involviert sind [144].

Anscheinend nutzt *S. typhimurium* den Entner-Doudoroff-Weg der Verstoffwechslung von Glukonat und verwandten Zuckern als eine Kohlenstoffquelle im Makrophagen, da die Gene der anderen beiden Zuckerkatabolismuse in *S. typhimurium* (Embden-Meyerhof-Weg und Pentosephosphatweg) bis zu 85fach herunterreguliert werden [144].

Mutanten im Gen *nagA*, welches für die N-Acetylglukosamindeacetylase kodiert, können N-Acetylglukosamin nicht abbauen und sind im Makrophagen ebenfalls attenuiert [70].

Auch haben viele Pathogene im Laufe ihrer Evolution, oft zugunsten von Virulenzgenen, Stoffwechselfgene verloren, die vornehmlich für die Biosynthese kleiner organischer Moleküle kodieren. Hierdurch können Auxotrophien entstanden sein [137, 145, 146].

1.2 Genomweite Ansätze zur Identifikation von Virulenzgenen

In vorhergehenden Abschnitt wurden die bislang bekannten Virulenzdeterminanten von *Salmonella* im Überblick dargestellt. In der Vergangenheit wurde die Suche nach Genen, die das Bakterium zum Überleben im Wirt benötigt, meist nichtsystematisch *in vivo* vorgenommen, wobei hauptsächlich stark attenuierende Mutationen gefunden wurden. Mittlerweile sind jedoch auch genomweite Ansätze zur Identifikation von Virulenzgenen verfügbar. Diese Methoden sollen im Folgenden vorgestellt werden. Dazu gehören Reporterengenfusion und Transposonmutagenese, *in vivo*-Expressionstechnologie (IVET), signaturmarkierte Mutagenese (STM) und differenzierte Fluoreszenzinduktion.

1.2.1 Reporterengenfusion und Transposonmutagenese

Bei der Reporterengenfusion, einer Methode, die seit den Anfangszeiten der molekularen Genetik genutzt wird, wird ein detektierbares Genprodukt unter die Kontrolle eines zu untersuchenden Gens gestellt. Dessen Expression kann so überwacht werden. Anfangs wurde vor allem das *lac*-Operon benutzt, um Fusionen mit einer Reihe von Genen zu erzeugen- insbesondere in *E. coli*. Heute stehen eine Vielzahl an Reporterengen zur Verfügung,

beispielsweise Chloramphenicol-Resistenzkassetten, das Enzym Luziferase und das grün fluoreszierende Protein GFP [147].

Transposons wurden erstmals 1974 beschrieben [148]. Eine Vielzahl an gut charakterisierten Transposons ist für die Mutagenese verfügbar, darunter etwa Tn3, Tn5 und Tn10 [147]. Durch Insertion eines Transposons in eine genetische Sequenz wird die Kontinuität des Gens zerstört und das Gen damit mutiert.

Mittels der Transposonmutagenese wurden zum Beispiel in *S. typhimurium* Gene identifiziert, die unter der Kontrolle der Nährstoffmangelantwort stehen [149]. Der Hauptnachteil der transposonbasierten Ansätze ist eine Beschränkung auf die Charakterisierung nichtessenzieller Gene. Die Inaktivierung eines essenziellen Gens durch Transposoninsertion würde einen letalen Phänotyp hervorbringen [147]. Mittlerweile wird jedoch ebendieses Phänomen genutzt, um essenzielle Gene zu identifizieren.

1.2.2 *In vivo*-Expressionstechnologie

Bei dieser, 1993 erstmals von Mahan et al. publizierten Methode handelt es sich um eine Strategie zur Anreicherung *in vivo* induzierter Gene. Dabei werden die bakterielle Promotoren selektiert, welche die Expression von Genen kontrollieren, die für das Wachstum im Wirt gebraucht werden [150] [151]. Die *in vivo*-Expressionstechnologie (IVET) erlaubt es, die bakterielle Antwort auf den Kontakt mit einem Wirtskompartiment *in situ* zu studieren [147]. Es wird ein promotorloses Reporter-gen benutzt, dessen Genprodukt einen Phänotyp bedingt, der positiv selektiert werden kann [152]. Dazu werden promotorlose Operonfusionen der *lacZY*-Gene mit dem *purA*-Gen bzw. dem *thyA*-Gen in einen Suizid-Vektor *downstream* einer *BglII*-Restriktionsschnittstelle kloniert. Durch die anschließende Klonierung chromosomaler DNA-Fragmente in die *BglII*-Stelle, und damit vor das promotorlose Operon, kann ein eventuell im Fragment vorhandener, konstitutiver oder *in vivo* induzierter Promotor das Operon unter seine Kontrolle bringen und dessen Expression induzieren. Man transformiert und integriert diese Konstrukte nun in Bakterienstämme mit Mutationen in *purA* und *thyA*, die eine Auxotrophie bedingen. Im Tiermodell sind folglich nur solche Stämme aufgrund der Auxotrophie lebensfähig, in denen ein *in vivo* induzierbarer oder konstitutiver Promotor vor das Operon im Plasmid kloniert wurde, der die Transkription von *purA* bzw. *thyA* ermöglicht [147, 150]. Die aus dem Tiermodell nach der Infektion wiedergewonnenen Mutanten werden anschließend einer Selektion auf die durch LacZ vermittelte β -Galaktosidaseaktivität unterzogen. Klone, die Genfusionen tragen, die spezifisch im Wirtsorganismus aktiviert

werden, zeigen unter Laborbedingungen kaum *lacZ*-Expression, müssen aber *in vivo* induziert gewesen sein, sonst hätten sie nicht aus dem Tiermodell wiedergewonnen werden können. Es werden also nur *in vivo* induzierte, aber unter Laborbedingungen nicht induzierte Promotoren in einer solchen Untersuchung gefunden [147, 150].

Wichtige Merkmale des IVET-Systems sind folgende: 1. Die Fusion ist nur in einer einzigen Kopie in der Bakterienzelle vorhanden. Damit unterliegt IVET nicht eventuellen polaren Effekten oder durch die Präsenz einer Resistenzkassette erzeugten Nebeneffekten, wie die Transposonmutagenese oder die Mutagenese durch Plasmide. 2. Die Integration des Konstrukts in das Zielgen auf dem Chromosom durch homologe Rekombination erzeugt eine Duplikation dieses Orts. Der native Promotor des ursprünglichen Gens kontrolliert die Fusion. 3. Es ist eine funktionelle Kopie des Zielgens vorhanden, d.h. es treten wahrscheinlich keine polaren Effekte wie bei einer *knockout*-Mutation auf [147].

Mittlerweile ist eine Reihe von Modifikationen für IVET verfügbar. Zum einen kann die Selektion im Wirt auf Basis von Antibiotikaresistenzen anstelle von Auxotrophie erfolgen, beispielsweise durch Chloramphenicol-Acetyltransferase-vermittelte Chloramphenicol-resistenz, oder durch eine Tetracyclin-Resistenzkassette [153]. Allerdings können hierbei Probleme mit der Konzentrationsverteilung des Antibiotikums im Tiermodell auftreten.

Eine weitere Modifikation ist die Verwendung der $\gamma\delta$ -Resolvase, die irreversible Rekombination vermittelt. Bei induziertem Promotor schneidet die aktivierte Resolvase ein Tetracyclin-Resistenzgen aus dem Chromosom. Diese Methode detektiert die Promotoraktivität auch, wenn der Promotor nur kurz während der Infektion aktiv ist, und wird RIVET (*recombination-based in vivo expression technology*) genannt [152, 154, 155].

Bei der differenzierten Fluoreszenzinduktion, als Modifikation der IVET, handelt es sich um eine Strategie, die Hochdurchsatzmethoden und halbautomatisches fluoreszenzaktiviertes Sortieren von Zellen (FACS) ausnutzt, um intrazelluläre Fluoreszenz einzelner Bakterienzellen zu messen [156]. Genutzt wird dazu das grün fluoreszierende Protein GFP, ein kleines Molekül, das seine Fluoreszenz auch beibehält, wenn es mit dem zu untersuchenden Protein verschmolzen wird, und das, anders als β -Galaktosidase und Luziferase, weder Substrat noch Kofaktor benötigt [151].

Wie bei IVET auch, werden chromosomale Fragmente der bakteriellen DNA *upstream* von einem promotorlosen Indikatorgen, hier *gfp*, kloniert. Nur Fragmente, die einen aktivierbaren Promotor enthalten, können die Expression von *gfp* anstoßen. Wirtszellen werden nun mit diesen Bakterien infiziert. Die Zellen werden durch eine fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) auf hohe Fluoreszenzintensität hin selektiert, die

einen während der Wirtszellinfektion aktiven Promotor anzeigt. Nach anschließender Lyse der Wirtszelle werden die befreiten Bakterien unter *ex vivo*-Bedingungen angezogen und erneut einer FACS-Analyse unterzogen. In diesem zweiten Schritt wird auf schwache oder keine Fluoreszenz in Abwesenheit der Wirtszelle selektiert. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der Bakterien während des Wachstums in der eukaryotischen Wirtszelle mit der Intensität der Bakterien in Kulturmedium können in Zellkultur induzierte Promotoren identifiziert werden [134, 152, 156]. Eine GFP-Markierung ermöglicht somit die Echtzeitmessung der Genexpression *in vivo*. Dies ist auch in großen Zellpopulationen möglich [151].

1.2.3 Signaturmarkierte Mutagenese (*signature-tagged mutagenesis*)

Eine Reihe von experimentellen Ansätzen befasste sich mit der Isolation bakterieller Virulenzgene durch die Transposonmutagenese. Oft scheiterten diese jedoch an der Undurchführbarkeit der Identifikation der als attenuiert erkannten Mutanten in der Mutantenbank. Durch die Entwicklung der signaturmarkierten Mutagenese konnten diese Schwierigkeiten größtenteils umgangen werden [147].

Bei der signaturmarkierten Mutagenesemethode (*signature-tagged mutagenesis*) handelt es sich um einen 1995 von Hensel et al. [157] publizierten genomweiten Ansatz zur Identifikation habitatspezifischer Gene durch eine negative Selektionsstrategie. Dabei wird ein Tiermodell mit einer Vereinigung verschiedener signaturmarkierter Transposoninsertionsmutanten infiziert. Mutanten, die zwar im ursprünglichen Inokulum vorhanden sind, aber nicht mehr aus dem Wirtsorganismus nach der Infektion zurückgewonnen werden können, sind wichtig für die Infektion [157]. Bei der signaturmarkierten Mutagenese ist jedes Transposon mit einer unterschiedlichen DNA-Sequenz markiert, welche eine Identifikation der aus dem mit einer gemischten Population von Mutanten infizierten Wirt wiedererlangten Bakterien ermöglicht.

Die Markierung wird als eine komplexe Mischung kurzer doppelsträngiger DNA-Segmente mit variablen Zentralregionen (40 bp), flankiert von Armen invarianter Sequenzen, durch PCR und Oligonukleotidsynthese hergestellt. Mehrere Zusammenschlüsse mit jeweils 96 unterschiedlichen, sequenzmarkierten Insertionsmutanten werden im Tiermodell zur Infektion gebracht. In den nach der Infektion wiedergewonnenen Bakterien wird die Markierung mittels PCR amplifiziert und spezifisch gekennzeichnet, etwa durch Radioaktivität. Die so erzeugten Sonden können verwendet werden, um Kolonieblots des ursprünglichen Inokulums zu beproben und die wiedergewonnenen Mutanten zu identifizieren (vergleichende

Hybridisierungsstrategie) [147, 157, 158]. Mutanten, die den Infektionsprozess nicht überleben, können identifiziert werden, da diese zwar im Eingangspool, nicht aber im Ausgangspool präsent sind.

Kürzlich wurde die Kombination von DNA-Mikroarraysystemen mit der signaturmarkierten Mutagenese beschrieben. Die Nutzung eines Mikroarrays erlaubt dabei ein *Screening* der negativ selektierten Bakterien nach Passage durch die Wirtszelle mit weniger Zeit- und Arbeitsaufwand durch Hybridisierung der signaturmarkierten Mutanten nach der Wirtspassage mit einem cDNA-Mikroarray von *S. typhimurium* [159].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses einer Reihe von neuen Genen und Genclustern auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit von *S. typhimurium*.

Die bislang existenten Methoden zur genomweiten Suche nach Virulenzgenen zeigen alle mehr oder weniger starke Nachteile hinsichtlich Verwendbarkeit in bestimmten Organismen, tatsächlicher Genomabdeckung, Arbeitsaufwand und Erfolgsquote. In diesem Zusammenhang spielte der Aufbau einer Bibliothek mutagenischer Fragmente von *S. typhimurium*, die erstellt wurde, um auf homologer Rekombination basierende Insertions-Duplikations-Mutagenese (IDM) durchzuführen, eine entscheidende Rolle [160-162]. In einem ersten Schritt sollte nun dieser Ansatz in Bezug auf seine Effektivität und Verlässlichkeit validiert werden. Dazu sollte ein Satz von IDM-Mutanten *in silico* hinsichtlich potenzieller polarer Effekte bewertet, auf das Wachstum *in vitro* geprüft und auf eine Attenuation der intrazellulären Überlebensfähigkeit im Zellkulturmodell untersucht werden.

Um die untersuchten Mutanten näher zu charakterisieren, sollte der kausale Zusammenhang zwischen dem durch die IDM erzeugten Genotyp und dem in Zellkulturversuchen beobachteten Phänotyp durch nichtpolare Deletion ausgewählter Gene und Erhebung von Zellkulturdaten für diese Mutanten nachgewiesen werden. Weiterhin sollte versucht werden, eine Funktionscharakterisierung mittels Sequenzvergleichen, Fluoreszenzfärbung und Promotorstudien für ausgewählte Gene im Bereich von bislang größtenteils unerforschten, der von McClelland et al. [16] vorgeschlagenen Genominsele, vorzunehmen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle verwendeten Bakterienstämme sowie deren genetische Charakteristika und Herkunft.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung und Charakteristika	Quelle/ Erstbeschreibung
14028	<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium (<i>Salmonella typhimurium</i>) Wildtypstamm ATCC14028	Stammsammlung des Institut Pasteur, Paris
EC101	<i>E. coli</i> Stamm JM101 mit einer wildtypischen Kopie von <i>repA</i> aus pWV01, <i>kan^R</i>	[163]
DH5 α	<i>E. coli</i> F ⁻ Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁻) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL-1 blue	<i>E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10 (tet^R)</i>]	ETH Zürich, Lössner, M.
S17-1 (λ <i>pir</i>)	λ -Lysogen von <i>E. coli</i> S17.1 <i>recA thi pro hsdR⁻ M⁺ RP4-2 (bla::ISR1 tet::Mu, aphA::Tn7)</i>	[164]
BW25113	<i>E. coli</i> K-12 <i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	CGSC, Yale; [165]
BW25141	<i>E. coli</i> K-12 <i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} ΔphoBR580 hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78} galU95 end-A_{BT333} uidA(ΔMluI)::pir1 recA1</i>	CGSC, Yale; [165]
SSM2005	<i>S. typhimurium</i> mit Plasmid pCP20	Überlassung von Sergio Uzzau; [166]
14028 <i>phoP</i> (593)::pIDM1	Insertions-Duplikations-Mutante von <i>phoP</i> in 14028	[162]
14028 <i>phoN</i> (628)::pIDM1	Insertions-Duplikations-Mutante von <i>phoN</i> in 14028	[162]
14028STM1540(687)::pIDM4	Insertions-Duplikations-Mutante von STM1540 in 14028	Diese Arbeit
14028STM1554(743)::pIDM4	Insertions-Duplikations-Mutante von STM1554 in 14028	Diese Arbeit
14028STM1558(879)::pIDM4	Insertions-Duplikations-Mutante von STM1558 in 14028	Diese Arbeit
14028 <i>pocR</i> (385)::pIDM4	Insertions-Duplikations-Mutante von STM2036 (<i>pocR</i>) in 14028	Diese Arbeit

Bakterienstamm	Beschreibung und Charakteristika	Quelle/ Erstbeschreibung
14028 Δ <i>safC</i>	Nichtpolare Deletionsmutante von <i>safC</i> in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM1031	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1031 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM1033	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1033 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM1042	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1042 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM1257	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1257 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM1555	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1555 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM1677	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1677 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ <i>cobS</i>	Nichtpolare Deletionsmutante von <i>cobS</i> in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ STM2603–2605	Nichtpolare dreifach-Deletionsmutante von STM2603, STM2604 und STM2605 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ 1257–pBR322:: <i>STM1257</i>	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1257, komplementiert mit Plasmid pBR322:: <i>STM1257</i> in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ 1555–pBR322:: <i>STM1555</i>	Nichtpolare Deletionsmutante von STM1555, komplementiert mit Plasmid pBR322:: <i>STM1555</i> in 14028	Diese Arbeit
14028–pDEW:: <i>P_{STM1255}</i>	Plasmid pDEW201 mit kloniertem Promotor von STM1255 in 14028	[167, 168]
14028 Δ 1555/1556:: <i>pIDM1</i>	Doppelmutante in STM1555 und STM1556 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ 1677/1672:: <i>pIDM1</i>	Doppelmutante in STM1677 und STM1672 in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ <i>cobS/pduK</i> :: <i>pIDM1</i>	Doppelmutante in <i>cobS</i> und <i>pduK</i> in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ 2603-2605/2585A:: <i>pIDM1</i>	Doppelmutante in STM2603-2605 und STM2585A in 14028	Diese Arbeit
14028 Δ 2603-2605/2595:: <i>pIDM1</i>	Doppelmutante in STM2603-2605 und STM2595 in 14028	Diese Arbeit

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle bakteriologischen Experimente am Wildtypstamm 14028 durchgeführt.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, deren Charakteristika und Herkunft.

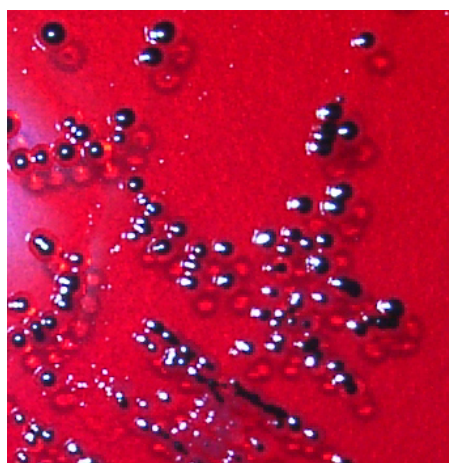
Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung und Charakteristika	Quelle/Erstbeschreibung
pBR322	<i>ori</i> (pMB1), <i>rop</i> , <i>amp^R</i> , <i>tet^R</i>	MBI Fermentas, [169]
pCP20	FLP-Rekombinase, <i>tet^R</i> , <i>amp^R</i>	CGSC, Yale; [165]
pDEW201	<i>ori</i> (pBR322), <i>rop</i> , T1 ₄ , <i>luxCDABE</i> , <i>amp^R</i>	[168]
pIDM1	temperatursensitives Plasmid, <i>repA</i> , <i>tet^R</i>	[160, 162]
pIDM4	pIDM1 Derivat mit <i>lacI</i> (kodiert für <i>lac</i> -Repressor)	[160]
pKD4	<i>kan^R</i> , <i>pir</i> -abhängig	CGSC, Yale; [165]
pKD46	λ -Red-Trägerplasmid, <i>araC</i> -P _{ara} γ β <i>exo amp^R</i>	CGSC, Yale; [165]

2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen

2.2.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Die Kultivierung aller Stämme erfolgte aerob und bei 37 °C bzw. 30 °C unter stetigem Schütteln (150 UpM). Soweit nicht anders angegeben, wurde für alle Flüssigkulturen sowie Agarplatten Luria-Bertani(LB)-Medium verwendet (Zusammensetzung siehe 6.2). Die Identität der verwendeten Stämme wurde in regelmäßigem Turnus durch Ausstriche auf XLD-Selektionsmedium (Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar; Sifin, Berlin) überprüft. Bedingt durch eine Präzipitation von Eisen(II)-Schwefel färben sich die Zentren den Kolonien von *Salmonella* schwarz, wodurch sie deutlich von eventuell vorhandener Begleitflora zu unterscheiden sind.

Abbildung 4: Kolonien von *S. typhimurium* auf XLD-Agar

2.2.2 Antibiotika

Natürlich resistente sowie rekombinante Bakterienstämme wurden in Flüssig- und auf Festmedien durch Zugabe von Antibiotikallösungen selektiert. Die entsprechenden Endkonzentrationen der Antibiotika im Medium wurden durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt:

Tabelle 3: Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	10 mg/ml in Methanol	20 µg/ml
Gentamycin	10 mg/ml in ddH ₂ O	10 oder 100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	12 mg/ml in Methanol	12 oder 18 µg/ml

Bei der Zugabe von Antibiotika zu Festmedien wurde das Medium nach dem Autoklavieren auf eine Temperatur von 50 °C gekühlt, das Antibiotikum zugegeben und das Medium in runde bzw. quadratische Petrischalen (Greiner, Frickenhausen) gegossen.

2.2.3 Gefrierkulturen und Stammsammlung

Die Lagerung von Bakterienstämmen für Zeiträume länger als vier Wochen erfolgte bei einer Temperatur von -80 °C. Dazu wurden Flüssigkulturen der betreffenden Stämme bis zu einer, durch Absorptionmessung bei 600 nm bestimmten, optischen Dichte (OD_{600}) von ungefähr 0,6 herangezogen, mit Glycerin (15 % Endkonzentration) versetzt und eingefroren.

Die langfristige Lagerung der Stämme erfolgte durch Gefriertrocknung und Einlagerung in die Weihenstephaner Stammsammlung.

2.2.4 Wachstumsversuche

Untersuchungen des Wachstums von Bakterienstämmen erfolgten im Regelfall in Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen). In jede der 96 Vertiefungen wurden 200 µl des erforderlichen Mediums pipettiert. Die Messungen der Absorption pro Vertiefung der Platte wurden entweder im Wallac Victor² 1420 *multilable counter* (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) bei einer Wellenlänge von 490 nm oder im Spectra Classic ELISA Reader (Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 620 nm durchgeführt, jeweils nach 15 Sekunden

Schütteln auf normaler Stärke. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel. Alle Messungen wurden mindestens im Doppelansatz durchgeführt. Aus den Ergebnissen aller Ansätze pro Stamm wurde zuletzt der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet.

2.3 Amplifikation, Transformation und Modifikation von DNA

2.3.1 PCR

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Enzyme wurden sowohl Taq-Polymerase (ThermoPrime Plus, ABgene, Hamburg) als auch Pfu-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Reaktionspuffer, MgCl₂, MgSO₄, sowie dNTP-Mix wurden ebenfalls von den Firmen ABgene und MBI Fermentas bezogen. Alle Primer wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) bzw. Sigma Genosys (Haverhill, UK) produziert und aufgereinigt.

Die PCR-Ansätze setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Menge pro Ansatz
Reaktionspuffer (10x, ohne MgCl ₂)	5 µl
0,8 mM dNTP Mix (20 mM, 5 mM von jedem dNTP)	2 µl
1,5 mM MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
20 pmol Primer 1 (10 pmol/µl)	2 µl
20 pmol Primer 2 (10 pmol/µl)	2 µl
10-1000 ng Template (aufgereinigte DNA)	variabel
0,5 U Taq- und/oder Pfu-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
steriles ddH ₂ O	ad 50 µl

Die PCR-Reaktion erfolgte im Allgemeinen nach folgendem Schema:

Tabelle 5: PCR-Zyklusabfolge

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing	variabel	30 sec
Elongation	72 °C	1 min pro Kilobase erwartetes Amplifikat
finale Elongation	72 °C	8 min
Aufbewahrung	4 °C	

} 30x

Als PCR-Geräte benutzt wurden Cyler Uno (Biometra, Göttingen), Robocycler (Stratagene, La Jolla, USA) und Primus (MWG). Die Länge des Amplifikats wurde im Anschluss an die

PCR-Reaktion im Agarosegel überprüft und die PCR-Ansätze über den QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder den GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) bzw. durch Phenol-Chloroform-Fällung (siehe 2.5.4) gereinigt. Es wurde wiederum ein Kontrollgel angefertigt und die DNA-Konzentration der PCR-Produkte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm photometrisch bestimmt.

Als Variante zur PCR mit gereinigter DNA als Template wurde, insbesondere zur Kontrolle von Zwischenschritten der Mutagenese, eine Kolonie-PCR durchgeführt: Dabei wurde eine frische Bakterienkolonie von der Agarplatte abgenommen, in 100 μ l sterilem ddH₂O gelöst und 5 μ l als Template für die PCR verwendet. Am oben beschriebenen PCR-Protokoll wurden folgende Modifikationen vorgenommen: Die zehnfache Menge Primer und die doppelte Menge DNA-Polymerase wurde eingesetzt; die Zyklenzahl wurde von 30 auf 35 erhöht.

2.3.2 Transformation

2.3.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen wurden 200 ml LB-Medium (bei Bedarf mit Antibiotikum versetzt) im Verhältnis 1:1000 von einer Übernachtskultur inokuliert und bei entsprechender Wachstumstemperatur unter Schütteln (150 UpM) inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Das gesamte Kulturvolumen wurde für zehn Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert (Beckman J2-HS, JA-14 Rotor), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 ml eiskalter 5%iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male unter Reduzierung des Glycerinvolumens auf 100 ml bzw. 8 ml wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (in Zentrifuge Sigma 3K30, Rotor 19777) wurde das Pellet in 0,8 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, zu je 40 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Glycerinlösungen: 10 % (w/v) 125 g ddH₂O ad 1000 ml, autoklavieren, 4 °C
 5 % (w/v) 62,5 g ddH₂O ad 1000 ml, autoklavieren, 4 °C

2.3.2.2 Elektroporation

Durch das Anlegen kurzer, starker Stromstöße kann eine Depolarisation der bakteriellen Zellmembran erfolgen und damit die Aufnahme von linearer und zirkulärer DNA in die Bakterienzelle erreicht werden. Diese Form der Transformation von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte mit Hilfe eines Elektroporationsgeräts (GenePulser, Biorad, Hercules, USA). 40 μ l elektrokompente Bakterienzellen wurden auf Eis mit 10-1000 ng der zu

transformierenden DNA vermischt und eine Minute inkubiert. Ligationsansätze wurden vor der Elektroporation mit Hilfe von Dialysemembranen (0,025 μm Porengröße, Millipore) 30 Minuten lang entsalzt, da eine zu hohe Leitfähigkeit der Proben die Transformationseffizienz stark beeinträchtigt. Daraufhin wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und einem Stromstoß von 2,5 kV bei einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 μF ausgesetzt. Die Küvette wurde nach dem Stromstoß umgehend mit einem Milliliter SOC-Medium aufgefüllt und die Bakterien eine Stunde bei 37 °C bzw. zwei Stunden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen auf Agarplatten konnten der Erfolg der Transformation ermittelt und Einzelkolonien gewonnen werden.

2.3.3 Schneiden von DNA

DNA-Fragmente und Plasmide können mit Hilfe sog. Restriktionsendonukleasen an palindromischen Erkennungsstellen in der DNA gespalten werden. Dabei entstehen im Regelfall klebrige, d.h. versetzt gespaltene Enden. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen und nach folgendem Schema angesetzt:

2 μl	10fach-Puffer (MBI Fermentas; passend zum jeweils verwendeten Enzym)
100 ng-2 μg	DNA (je nach Art des Experiments)
10 U	Enzym pro μg DNA, mindestens aber 10 U pro Ansatz
ad 20 μl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt (siehe 2.5.4)

2.3.4 Ligation

Linearisierte DNA wurde vor der Ligation mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dabei werden die endständigen Phosphatgruppen an den Basen der DNA-Enden entfernt, um eine Religation der DNA mit sich selbst zu verhindern. So werden intermolekulare Bindungen zwischen linearisiertem Vektor und Fragment gegenüber intramolekularen Bindungen der beiden Vektorenden bevorzugt.

variabel	linearisierte DNA
1 U	SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>) (MBI Fermentas)
1 μl	10fach-SAP-Puffer (MBI Fermentas)
ad 10 μl	ddH ₂ O

2.5 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

2.5.1 Präparation chromosomaler DNA

Fünf Milliliter einer Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase bzw. 1,5 ml einer ÜNK wurden abzentrifugiert, in 400 µl Lyse-Puffer (100 mM Tris, pH 8; 0,5 mM EDTA; 200 mM NaCl) und 100 µl Lysozym (10 mg/ml in Lyse-Puffer) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 10%iger SDS-Lösung und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden die Proben über Nacht bei 55 °C inkubiert und anschließend die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit 96%igem und 70%igem EtOH gewaschen und getrocknet. Nach Lösen in 500 µl TE-Puffer (1x, pH 7,4) und 1 µl RNase (19 mg/ml) wurde eine 1:1-Verdünnung mit TE-Puffer hergestellt und bei $\lambda = 260$ nm die DNA-Konzentration bestimmt.

2.5.2 Präparation von Plasmid-DNA

Bakterielle Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse freigesetzt und durch die Bindung an eine Anionenaustauschersäule gefolgt von einem Wasch- und einem Elutionsschritt isoliert. Die Aufreinigung von Plasmiden aus den Trägerstämmen erfolgte je nach Menge des gewünschten Produkts entweder mit dem GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit (Sigma Aldrich, Taufkirchen) für bis zu 15 µg DNA oder dem Plasmid Purification Kit (Qiagen) für Ansätze mit größerem Volumen.

2.5.3 Dialyse

Die Dialyse ist eine effektive Methode zur Elution von DNA aus Agarosegelen. Die Gelfragmente wurden dazu, zusammen mit ca. 200 µl 1x TE-Puffer, in ein kurzes Stück Dialyseschlauch (VISIKING, Roth, Karlsruhe) verbracht, der zuvor mit 1%iger Na₂CO₃-Lösung aufgeköcht und anschließend autoklaviert worden war. Durch Anlegen einer Spannung von 80 V für 45 Minuten in der Elektrophoresekammer wandert die DNA aus dem Gel in den umgebenden Puffer und kann aus diesem durch Phenol-Chloroform-Fällung (siehe 2.5.4) aufbereitet werden.

2.5.4 Phenol-Chloroform-Fällung

Die Fällung mit Phenol-Chloroform dient zur Reinigung von DNA aus Lösungen. Es wurde ein Volumen Phenol-Chloroform (v/v) zur Probe zugegeben, beides gründlich vermischt und zehn Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Dann wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 0,1 Volumen Natriumacetat und 2,5 Volumen 96 % EtOH (-20 °C) (v/v) versetzt. Anschließend wurde erneut zehn Minuten zentrifugiert (13000 UpM). Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 200 µl 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen, getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

2.5.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA in Lösung wurde photometrisch im Spektrometer ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA) bei 260 nm Wellenlänge (A₂₆₀) durch Auftropfen von 1 µl der Lösung auf den Messpunkt des Geräts bestimmt. Der Absorptionswert bei 280 nm (A₂₈₀) wurde ebenfalls bestimmt, um daraus den Quotienten aus A₂₆₀/A₂₈₀ zu ermitteln. Dieser Quotient gibt Auskunft über die Reinheit von Nukleinsäuren und sollte bei DNA annähernd 1,8 betragen.

2.6 Insertionsmutagenese

Zur Erstellung der in dieser Arbeit untersuchten Mutantenbank wurde von Knuth et al. [160] ein auf der Insertions-Duplikations-Mutagenese basierender Ansatz benutzt. Dazu wurden kleine, zufällig erzeugte genomische DNA-Fragmente in einen temperatursensitiven Vektor (pIDM1) kloniert. Diese Genfragmente waren 350 bis 450 Nukleotide lang und wurden durch einen modifizierten PCR-Ansatz nach Froussard [170] erzeugt. Die *Kpn*I-verdauten DNA-Fragmente wurden dann hinter den *lac*-Promotor in den Vektor kloniert und die daraus resultierende Bibliothek in *E. coli* EC101 transformiert. So konnte unter permissiven Bedingungen eine Bibliothek von mutagenen rekombinanten Plasmiden aufgebaut werden [160].

Der Vektor pIDM1 weist folgende Eigenschaften auf: Er ist temperatursensitiv und kann unter nichtpermissiven Bedingungen (37 °C) nicht replizieren. Weiterhin trägt der Vektor verschiedene Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme, kodiert für ein Tetracyclin-Effluxsystem und ermöglicht eine Blau/weiß-Selektion für eine effizientere Klonierung [162].

Nach der Isolierung des Vektors aus den Stämmen der Bibliothek und Transformation in *S. typhimurium* wurden durch homologe Rekombination zwischen dem in den temperatursensitiven Vektor klonierten DNA-Fragment und der entsprechenden Stelle auf dem Bakterienchromosom Insertionsmutanten erzielt. Erfolgreiche Insertionen konnten bei nichtpermissiver Temperatur durch Tetracyclinresistenz selektiert werden. Da der Vektor bei dieser Temperatur nicht replizieren kann, muss in resistenten Stämmen die Resistenzkassette in das Chromosom integriert worden sein. Die erfolgreiche Insertion resultiert in einer Kointegratstruktur unter Verdopplung des homologen Fragments [160, 162].

Ein Vorteil der IDM ist, dass sie auch für die gezielte Mutagenese eines Gens verwendet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden so einzelne zielgerichtete Mutationen durch ein definiert erzeugtes PCR-Fragment und Klonierung dieses Fragments in pIDM1 bzw. pIDM4 sowie Integration des Vektors in das Bakterienchromosom erzeugt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine durch Integration von pIDM1 in das bakterielle Chromosom erzeugte Mutation auch ohne Selektionsdruck durch Tetracyclin hochstabil ist [162]. Eine Reversion der Mutation durch Ausschneiden des Plasmids aus dem Chromosom ist ebenfalls problemlos möglich und stellt den wildtypischen Genotyp mit einer Verlässlichkeit von 98 % wieder her. Intrazelluläres Auffangen des ausgeschnittenen Vektors ermöglicht es, schnell zwischen zwei Genotypen hin- und herzuschalten [162].

Zur Erzeugung von Insertions-Duplikations-Mutanten wurden in der vorliegenden Arbeit die temperatursensitiven Vektoren pIDM1 und pIDM4 verwendet, welche unter anderem die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *KpnI* bzw. *BglII* tragen.

2.6.1 Primer für die Insertionsmutagenese

Es wurden Primer entworfen, in denen jeweils das 5'-Ende durch Anhängen der Erkennungssequenz für das Enzym *BglII* bzw. *KpnI* modifiziert ist. Vor die Erkennungssequenz wurde zusätzlich das Nukleotidtriplet GGA angefügt, was die Enzymaktivität beim nachfolgenden Schneiden deutlich erhöhen soll [171].

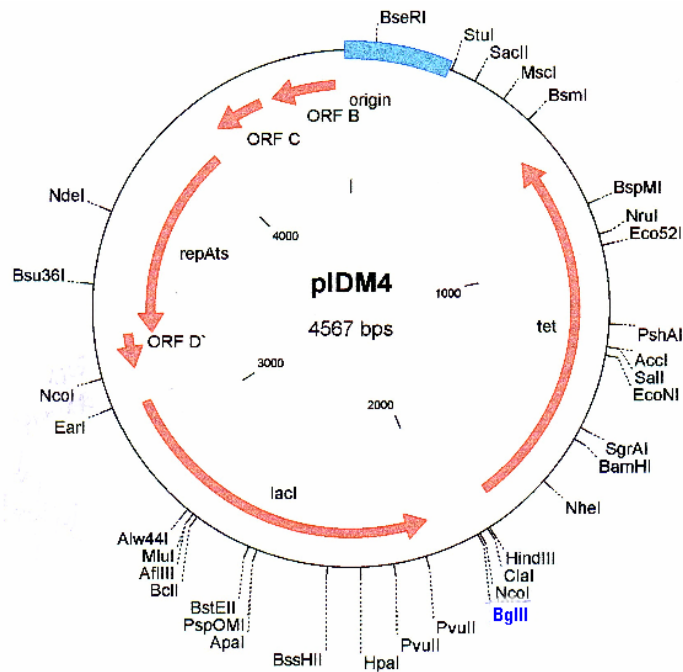


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Vektor pIDM4

Der Vektor trägt eine Tetracyclin-Resistenzkassette (*tet*) sowie das *lacI*-Gen, welches für den *lac*-Repressor codiert. Dieser Vektor unterscheidet sich von pIDM1 nur geringfügig durch einen Austausch des *lacI*-Gens gegen *lacZ* sowie eine *KpnI*-Erkennungsstelle im *lacZ*-Gen.

2.6.2 Herstellung des rekombinanten Vektors

Mittels einer PCR-Reaktion mit gereinigter chromosomaler DNA von *S. typhimurium* als Template und den jeweils für die Reaktion passenden Primerpaaren wurde ein Insertionsfragment hergestellt, das an beiden Enden Erkennungsstellen für *BgIII* trägt. Dieses Fragment wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit *BgIII* verdaut, um klebrige Enden zu erzeugen. Nach erneuter Aufreinigung wurde das Fragment in den ebenfalls mit *BgIII* gespaltenen Vektor pIDM1 bzw. pIDM4 ligiert.

2.6.3 Transformation und Integration

Der gereinigte rekombinante Vektor pIDM4 wurde in *E. coli* EC101 transformiert und amplifiziert. Durch eine Plasmidpräparation im Midi-Maßstab (Qiagen) konnte das Konstrukt in größeren Mengen gewonnen werden.

Durch anschließende Elektroporation wurde das rekombinante Plasmid in *S. typhimurium* transformiert. Durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 37 °C unter Fortführung des Selektionsdrucks (Tetracyclin 18 µg/ml) konnten Mutanten mit einer Integration des Vektors in das Bakterienchromosom über den homologen Bereich zwischen Gen und Genfragment selektiert werden.

2.7 Deletionsmutagenese

Eine effektive Methode zur Deletion von chromosomalen Genen in Prokaryoten wurde von Datsenko und Wanner entwickelt [165]. Sie beruht auf dem Red-Rekombinase-System des Phagen λ sowie einer FLP-vermittelten, sequenzspezifischen homologen Rekombination. Im Allgemeinen ist es schwierig, Bakterien mit linearer DNA zu transformieren, da sie intrazelluläre Exonukleasen, beispielsweise Exonuklease V, besitzen, die lineare DNA abbauen, bevor eine Rekombination erfolgen kann. Bakteriophagen besitzen jedoch Wirtszell-unabhängige Systeme zur homologen Rekombination. Das Red-System des Phagen λ besitzt drei Gene, von denen ein Genprodukt (γ) die Exonuklease V des Wirts hemmt, während die anderen (β und *exo*) die Rekombination unterstützen [165, 172]. Die Einführung der Deletion unter Ausnutzung der Rekombinaseaktivität erfolgt, wie auch in Abbildung 6 dargestellt, in drei Schritten.

Zunächst wird durch PCR ein Fragment hergestellt, das eine Antibiotika-Resistenzkassette trägt, die von zwei Zielgen homologen Bereichen und von zwei FRT(*FLP-recognition target*)-Sequenzen flankiert wird. Als PCR-Template diente in dieser Arbeit das Plasmid pKD4, welches eine Kanamycin-Resistenzkassette trägt. Es wurden Primer verwendet, die neben zu pKD4 komplementären Sequenzabschnitten (p1 und p2) homologe Sequenzen (H1 und H2) tragen, die zu den Endbereichen des Zielgens im Bakteriengenom komplementär sind.

Anschließend wird 14028-pKD46 mit dem erzeugten PCR-Fragment transformiert. Bei pKD46 handelt es sich um ein temperatursensitives *low-copy* Plasmid [173] mit einer Ampicillin-Resistenzkassette, welches die für die λ -Red-Rekombinase kodierenden Gene unter Kontrolle eines durch L-Arabinose induzierbaren P_{araBAD} -Promotors besitzt. Das Rekombinationssystem ermöglicht die homologe Rekombination linearer DNA mit der entsprechenden homologen Region auf dem Bakterienchromosom. Das Zielgen der Mutagenese wird durch einen Allelaustausch gegen die FRT-flankierte Antibiotika-Resistenzkassette ausgetauscht. Der temperatursensitive Vektor pKD46 wird danach durch Inkubation bei nichtpermissiver Temperatur aus der Bakterienzelle entfernt. Der Verlust des pKD46-Plasmids kann durch die wiedererlangte Ampicillinsensitivität der Bakterien nachgewiesen werden. Durch Kultivierung auf kanamycinhaltigem Agar werden die Bakterien auf die chromosomale Insertion der Resistenzkassette selektiert. Ein eventuell aus der PCR-Reaktion mittransformiertes Plasmid pKD4 kann in den *pir*-negativen Empfängerbakterien nicht replizieren, weshalb eine entstandene Kanamycinresistenz nur durch die Insertion in das Chromosom vermittelt worden sein kann [165].

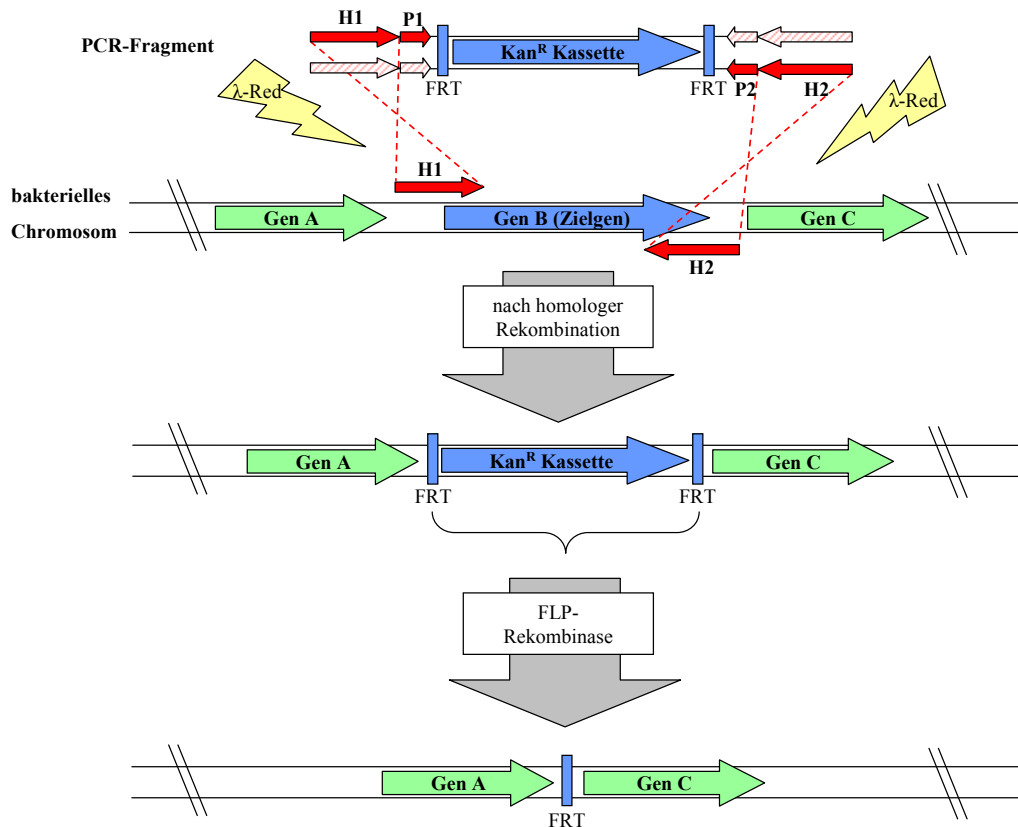


Abbildung 6: Ablaufschema der Deletionsmutagenese

Im ersten Schritt findet eine Transformation des PCR-Fragments in pKD46-tragende Bakterienzellen statt. Die λ -Red-Rekombinase vermittelt den Allelaustausch über die homologen Regionen von Fragment und Chromosom. Die inserierte Kanamycinkassette kann in einem letzten Schritt durch die pCP20-kodierte FLP-Rekombinase entfernt werden.

In einem letzten Schritt wird die eingesetzte Antibiotika-Resistenzkassette entfernt. Dazu werden kanamycinresistente Bakterien aus dem vorangegangenen Schritt mit dem temperatursensitiven *low-copy* Plasmid pCP20 transformiert, welches eine Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenzkassette sowie die FLP-Rekombinasegene trägt [174]. Die FLP-Rekombinase entfernt den DNA-Abschnitt zwischen den FRT-Sequenzen, wobei eine kurze Fremdsequenz verbleibt, die eine FRT-Sequenz anstelle des ursprünglichen Gens enthält. Der Vektor pCP20 kann durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C aus der Bakterienzelle entfernt werden. Ein Verlust aller Antibiotikaresistenzen zeigt den Erfolg der Mutagenesemethode an [165].

2.7.1 Primerwahl für die Deletionsmutagenese

Es wurden Primerkonstrukte entworfen, die 50 Nukleotide lange, zum Zielgen komplementäre homologe Regionen tragen. Diese Bereiche überlappen das 5'-Ende des Zielgens um 18 nt, das 3'-Ende um 36 nt und wurden eingeführt, um dem Problem von

transkriptionalen und translationalen Überlappungen in bakteriellen Operonstrukturen aus dem Wege zu gehen. Die Mutationen wurden so erzeugt, dass die translationale Kopplung erhalten bleiben kann und eine Unterbrechung der Regulation benachbarter Gene minimiert wird [175].

Außerdem besitzen die Primer 19 bzw. 20 nt lange Bereiche, die komplementär zur pKD4-Sequenz sind und die Nutzung des Plasmids als Template für die Reaktion ermöglichen [165]. Zusätzlich wurden für jedes zu deletierende Gen Testprimer entworfen, die etwas außerhalb der Zielgensequenz binden. Sie wurden benutzt, um den Insertions- bzw. Deletionsschritt im Vergleich zum intakten Gen im Wildtyp mit Hilfe von Kolonie-PCR darstellen zu können. Die Primersequenzen wurden anhand der Genomannotation von *S. typhimurium* [93] ausgewählt und sind im Anhang 6 aufgeführt.

2.7.2 Herstellung der PCR-Fragmente

Die zur Integration benötigten Fragmente wurden mittels der PCR-Reaktion erzeugt und vervielfältigt. Dazu wurde eine Reaktion (siehe 2.3.1) mit dem Plasmid pKD4 als Template bei einer Annealingtemperatur von 52-56 °C nach bereits genanntem Schema (vgl. 2.3.1) durchgeführt. Das Produkt aus zehn Einzelreaktionen von je 50 µl wurde vereinigt, durch Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt und auf einem Agarosegel auf Reinheit kontrolliert.

2.7.3 Integration der Resistenzkassette ins Genom

Das PCR-Fragment wurde mittels Elektroporation in elektrokompente, das Plasmid pKD46 tragende und mit 1 mM L-Arabinose aktivierte Salmonellen transformiert. Pro Reaktion wurden 500-1000 ng PCR-Fragment eingesetzt (Modifikation des Originalprotokolls nach Uzzau et al. [166] und S. Uzzau, persönliche Kommunikation). Nach Zugabe von SOC-Medium und Inkubation bei 30 °C für zwei Stunden wurden die Bakterien bis 10^{-4} verdünnt und auf kanamycinhaltigen Agarplatten (50 µg/ml) ausplattiert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C konnten Klone identifiziert werden, bei denen das PCR-Fragment erfolgreich in das Bakterienchromosom rekombiniert hatte und die Kanamycinresistenz ausgebildet wurde. Konnten keine kanamycinresistenten Klone identifiziert werden, so wurde der Transformationsansatz in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika für fünf Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend ausplattiert. Diese Methode erzeugte stets positive Klone (Modifikation nach S. Uzzau, persönliche Kommunikation).

2.7.4 Entfernung der Resistenzkassette

Nach mehrmaliger klonaler Passage der kanamycinresistenten Klone aus dem vorangegangenen Schritt bei 37 °C wurden diese erneut elektrokompent gemacht und mit etwa 200 ng des Plasmids pCP20 transformiert. Nach Inkubation für zwei Stunden in SOC-Medium bei 30 °C wurde auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (12 µg/ml) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Weiterhin konnte durch parallele Passage der Kolonien auf Agarplatten mit und ohne Chloramphenicol bei 37 °C auf Verlust der Resistenz selektiert werden.

2.7.5 Überprüfung der Gendeletion

Erfolgreiche Gendeletionen wurden zum einen durch Untersuchung auf den Verlust der Kanamycinresistenz überprüft. Vollständige Sensitivität bedeutet, dass die inserierte Kanamycinkassette korrekt aus dem Deletionsort ausgeschnitten wurde. Zum anderen wurde die Deletion durch Kolonie-PCR mit den eingangs genannten Testprimersätzen nachgewiesen. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel mit dem PCR-Produkt des Wildtypstamms und des Kanamycin-Insertions-Zwischenschritts verglichen. Letzterer wurde mittels der Testprimersätze oder Kanamycinkassetten-ständiger Primer (*kanR1-3*) nachgewiesen.

2.8 Genkomplementation

Um die Ausschaltung eines Gens auf dem Chromosom zu komplementieren, bedient man sich der Einführung desselben Gens in die Bakterienzelle *in trans*, also auf einem geeigneten Vektor. Für Genkomplementationen in dieser Arbeit wurde stets der Vektor pBR322 [169] verwendet. Dieser Vektor trägt unter anderem eine Ampicillin-Resistenzkassette und eine Tetracyclin-Resistenzkassette (siehe Abbildung 7).

Mittels PCR und geeigneten Primerpaaren wurde jeweils das betreffende Gen, wenn möglich mit dem dazugehörigen Promotor, amplifiziert. Durch entsprechendes Design der Primer wurden so Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme an die Enden der Amplifikate angehängt. In dieser Arbeit wurden Klonierungen mittels der Enzyme *EcoRI* oder *PstI* (MBI Fermentas) durchgeführt. Durch Auftrennung auf einem Elektrophoresegel, Elution der gewünschten Fragmente aus dem Gel mittels Dialyse und anschließender Phenol-Chloroform-Fällung wurde die DNA aufgereinigt. Dieses Fragment (Insert) wurde mit dem für die

erzeugte Erkennungssequenz am Ende des Amplifikats spezifischen Restriktionsenzym verdaut und anschließend erneut aufgereinigt. Das Amplifikat wurde mit dem durch das selbe Enzym linearisierten und über Gel und Phenol-Chloroform-Fällung gereinigten Vektor pBR322 (4363 bp) ligiert und nach einer Amplifikation in *E. coli* DH5 α bzw. XL-1 blue und anschließender Plasmidpräparation in *S. typhimurium* transformiert.

Die Bestätigung des Erfolgs der Klonierung konnte durch Amplifikation der betreffenden Region auf dem Plasmid pBR322 mittels Kolonie-PCR oder durch Restriktionsverdau des Plasmids mit Enzymen, die charakteristische Fragmentlängen erzeugen, erlangt werden. Eine erfolgreiche Klonierung mit *Pst*I konnte zusätzlich über die Sensitivität der mit dem rekombinanten Plasmid transformierten Stämme gegen Ampicillin bestätigt werden, da die Resistenzkassette im Vektor durch die Klonierung inaktiviert wurde.

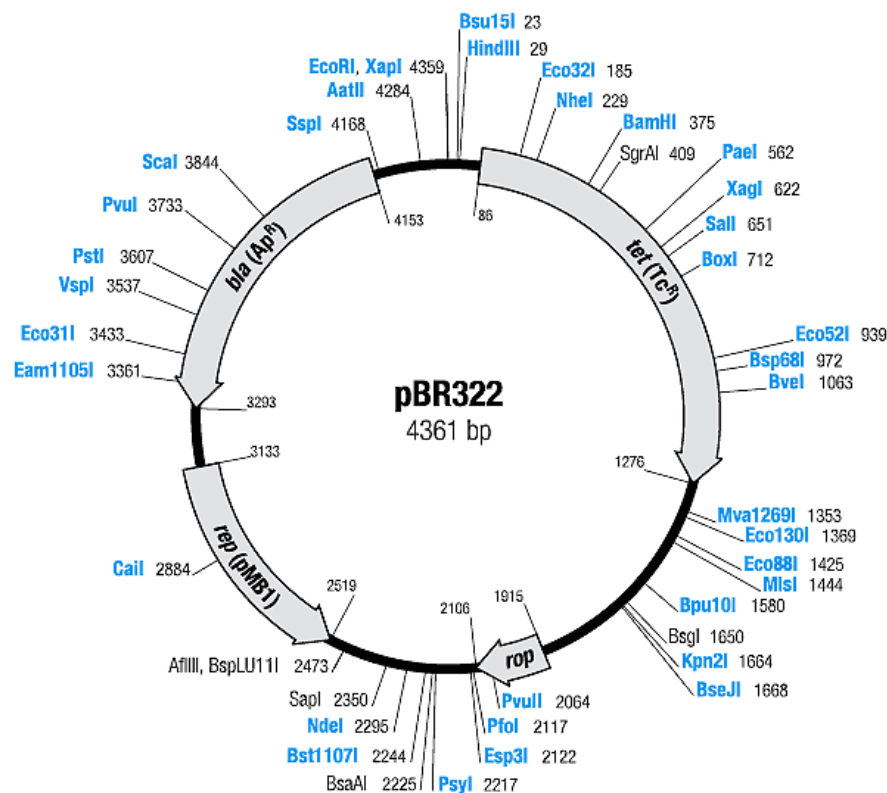


Abbildung 7: Schematische Darstellung von Vektor pBR322

Zu sehen sind unter anderem die Tetracyclin-Resistenzkassette (*tet*) und die Ampicillin-Resistenzkassette (*bla*) sowie die Schnittstellen aller Restriktionsenzyme, die nur eine einzelne Erkennungsstelle im Vektor besitzen.
Quelle: MBI-Fermentas

2.9 Zellkulturmethoden

2.9.1 Zelllinie und Kulturbedingungen

Immortalisierte murine makrophagenähnliche Monozyten der Zelllinie J-774A.1 [176] wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) (Biochrom, Berlin) (mit 4,5 g/L Glukose, 3,7 g/L NaHCO₃ und stabilem Glutamin), ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) (PAA, Linz), bei 37 °C, 5 % CO₂ und > 95 % Luftfeuchte bis zu sechs Wochen kultiviert. Als Kulturgefäße wurden Schalen mit 25 cm² und 75 cm² Kulturfläche sowie Petrischalen verwendet (TPP, Trasadingen, Schweiz).

2.9.2 Zellpassage

Konfluente Zellkulturen wurden zweifach mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Biochrom) gewaschen. Die Ablösung der Zellen von der beschichteten Kulturfläche erfolgte mit 6 ml (75 cm²-Schalen) bzw. mit 3 ml (25cm²-Schalen) TEN-Puffer (40 mM TrisCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 7,5; 150 mM NaCl) bei 37 °C, 5 % CO₂ für 15 Minuten. Nicht abgelöste Zellen wurden mit einem Zellschaber (TPP) vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Puffer-Zell-Gemisches für fünf Minuten bei 1000 UpM. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Kulturmedium gelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:6 auf Kulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden für höchstens sechs Wochen in Kultur gehalten, was etwa zwölf Passagen entspricht, und regelmäßig durch Fluoreszenzfärbung auf Mykoplasmenkontaminationen untersucht.

2.9.3 Zellzählung

Die genaue Zahl der abgelösten, zentrifugierten und in DMEM resuspendierten Zellen pro Milliliter wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer (*Neubauer improved*) bestimmt. Dabei wurden mindestens drei verschiedene Gruppenquadrate ausgezählt und der Mittelwert aus den Einzelzählungen gebildet. Wichen die Einzelwerte mehr als 10 % voneinander ab, so wurde die Kammer neu beschickt und erneut drei Gruppenquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellen pro Gruppenquadrat} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

Alle Zählungen wurden unter Trypanblau-Färbung (Biochrom) durchgeführt, so dass sichergestellt werden konnte, dass nur lebende Zellen in die Berechnung der Gesamtzellzahl eingingen.

2.9.4 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Nach dem in Abschnitt 2.9.2 beschriebenen Ablösen und Zentrifugieren der Zellen, wurden diese in Lösung A (DMEM mit 20 % FCS) resuspendiert und dann mit Lösung B (DMEM mit 20 % FCS und 20 % DMSO) durch langsames Zutropfen vermischt. Nach Aliquotierung von ca. 10^6 Zellen je Gefrier Röhrchen (Greiner) wurden diese um 1 °C pro Minute auf -80 °C abgekühlt und anschließend in die Gasphase von flüssigem Stickstoff (ca. -270 °C) verbracht. Das Auftauen von derart eingefrorenen Zellen erfolgte durch Inkubation der Gefrier Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C bis zum Schmelzen des Inhalts. Nach Zentrifugation, bei der das Gefriermedium und tote Zellen entfernt werden, und anschließendem Resuspendieren in Kulturmedium wurden die Zellen in Kulturflaschen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

2.10 Zellkultur-Infektionsassay

Die Untersuchungen auf eine mögliche Attenuation der intrazellulären Replikationsfähigkeit in der Zellkultur wurden in einem intrazellulären Überlebensassay in J-774A.1-Makrophagen in 24-Well-Format durchgeführt.

2.10.1 Vorbereitung der Bakterienkultur

2.10.1.1 Flüssigkultur

Eine Kolonie des Bakterienstamms wurde in jeweils zwei Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) (Greiner) in je 200 µl LB-Medium, teilweise mit Antibiotikum versetzt, angeimpft. Die Platte wurde bei 37 °C, 500 UpM für zehn Stunden im Mikrotiterplattenschüttler ST-3 (Elmi, Riga, Lettland) inkubiert. Von dieser Kultur wurde im Verhältnis 1:1000 eine Übernachtskultur in 200 µl LB-Medium in einer Mikrotiterplatte angeimpft. Am darauf folgenden Tag wurde die Kultur 1:10 in PBS verdünnt und im Spektrometer Spectra Classic (Tecan) die Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Die durch eine Kalibriergerade festgestellte Absorption, bei der 8×10^6 KbE/ml vorhanden sind, beträgt

0,100. Durch Einrechnen dieses Faktors in die gemessene Absorption ergab sich die zu verwendende Menge an Bakterienlysat für die Infektion.

2.10.1.2 Gefrierkultur

20 ml LB-Medium, teilweise mit Antibiotikum versetzt, wurden mit einer Kolonie des betreffenden Bakterienstamms inokuliert und bei 37 °C, 150 UpM inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wurde die Kultur mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 15 % v/v), in 1-ml-Portionen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde zeitnah zum Infektionsversuch aufgetaut, dezimal bis 10⁻¹² in PBS verdünnt und auf den entsprechenden Agarplatten ausplattiert. Nach einer 18-stündigen Inkubation bei 37 °C konnte durch Auszählung die Zahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter und daraus die benötigte Infektionsdosis berechnet werden.

2.10.2 Vorbereitung der eukaryotischen Zellen

24 Stunden vor der Infektion wurden 4x 10⁵ J-774A.1-Zellen pro Vertiefung einer beschichteten 24-Well-Kulturplatte (Biochrom) in 1,5 ml Kulturmedium (DMEM mit FCS) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.10.3 Infektion der Zellkultur

Die verdünnte Bakteriensuspension wurde im Verhältnis 10:1 (*multiplicity of infection*, MOI = 10) auf die zweimal mit Zellkulturmedium ohne FCS gewaschenen Makrophagenzellen in 200 µl Kulturmedium ohne FCS aufgebracht. Um die Infektion zu verstärken und zu synchronisieren, wurden die 24-Well-Platten bei 1000 UpM für fünf Minuten zentrifugiert und danach für 30 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Abnehmen der Bakteriensuspension und zweimaliges Waschen mit Zellkulturmedium ohne FCS. Anschließend wurde 1 ml Zellkulturmedium pro Vertiefung (mit FCS und 100 µg/ml Gentamycin) zugegeben und die Platte für eine Stunde inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde ein Teil der Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 % Desoxycholat (w/v, 1 ml pro Vertiefung) durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. In den anderen Vertiefungen wurde das Kulturmedium gegen Medium mit 10 µg/ml Gentamycin ausgetauscht. Diese wurden nach weiteren sechs Stunden Inkubation ebenfalls wie beschrieben lysiert.

2.10.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Das Zellysate aus den Infektionsversuchen wurde in einer Mikrotiterplatte unter Zuhilfenahme einer Zwölfkanalpipette dezimal in PBS bis 10^{-4} verdünnt. Zwölf Proben einer Reihe der Mikrotiterplatte wurden mit der Mehrkanalpipette synchron auf schräg aufgestellte, quadratische Agarplatten aufgetropft (15 μ l pro Kanal) und durch Hochstellen der Agarplatte vertikal auf selbiger verteilt. Pro Verdünnungsstufe wurden drei bis vier Platten angefertigt. Nach Inkubation für 18-24 Stunden bei 37 °C konnte die Zahl der koloniebildenden Einheiten pro Stamm auf der Platte bestimmt werden. Es wurde darauf geachtet, mindestens drei verlässliche KbE-Werte pro Stamm und Zeitwert zu erhalten. Für jeden Stamm und jeden Zeitwert wurde das gewichtete Mittel nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gewichtetes Mittel} = \frac{n}{1fa + 0,1fb} * d$$

n = Summe der Kolonien aller ausgezählten Platten

fa = Zahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden

fb = Zahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe von fa

d = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (Reziprokwert der Verdünnungsstufe fa)

Modifiziert nach [177]

2.10.5 Fluoreszenzfärbung infizierter Zellen

Um die Lokalisation der Bakterienstämme bei der Infektion in der Zellkultur darzustellen, wurden Experimente mit fluoreszenzmarkierten Bakterien durchgeführt.

Aus Übernachtskulturen der Bakterienstämme wurde Kulturmedium (evtl. mit Antibiotikum) inokuliert und die Bakterien bei optimaler Wachstumstemperatur etwa vier Stunden angezogen. Nach Zugabe von 2 μ g/ml des Fluoreszenzfarbstoffs 6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Biochrom) in PBS wurden die Bakterien für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen der Bakterien mit je 20 ml PBS (vgl. [178]). Durch Absorptionsmessung wurde die Bakterienzahl pro Milliliter Lösung abgeschätzt und am Vortag auf speziellen Objektträgern (Chamber Slide CC-2, Nunc, Wiesbaden) ausgesäte Makrophagenzellen mit einer MOI von 100 infiziert. 35 Minuten nach Infektion wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) oder Methanol-Eisessig (3:1) für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurde die Hintergrundfluoreszenz durch zehnmünütige Quellung mit Ammoniumchlorid entfernt. Die

Kammer wurde vom Objektträger entfernt, ein Deckglas aufgelegt und die Ränder mit Nagellack luftdicht verschlossen.

Die Präparate wurden im Mikroskop BX41 (Olympus, Hamburg) bei 100facher Vergrößerung mit DAPI-Filtern (Anregungswellenlänge: 358 nm, Emissionswellenlänge: 461 nm) mikroskopiert.

2.11 Promotorstudien

Ausgehend von einem bereits vorhandenen Konstrukt, basierend auf dem Vektor pDEW201 [168], in den der Promotor des Gens STM1255 kloniert worden war [179], wurden in dieser Arbeit Induktionsstudien durchgeführt. Der Vektor pDEW201 hat eine moderate Kopienanzahl und enthält das *luxCDABE*-Operon als Reportersystem. Dieser Vektor kann benutzt werden, um Promotorsequenzen aufzufinden und zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wird chromosomale DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend in die *upstream* des *lux*-Operons gelegene multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) ligiert. Ein im klonierten Fragment enthaltener Promotor stößt die Expression der *lux*-Gene an. Es erfolgt eine messbare Lichtemission, über welche die Stärke der Promotorinduktion abgeschätzt werden kann. pDEW201 enthält den Replikationsursprung und das *rop*-Gen des Plasmids pBR322, was eine moderate Kopienzahl zur Folge hat. Die promotorlosen *luxCDABE*-Gene aus *Photobacterium luminescens* liegen *downstream* der MCS. Vier Transkriptionsterminatoren des Phagen T1 liegen *upstream* der MCS und verhindern eine signifikante Transkription der *lux*-Gene ohne Induktion. Daher haben Zellen, die das promotorlose Plasmid enthalten, eine geringe Eigenlumineszenz. Zusätzlich enthält das Plasmid noch einen Selektionsmarker (Ampicillin).

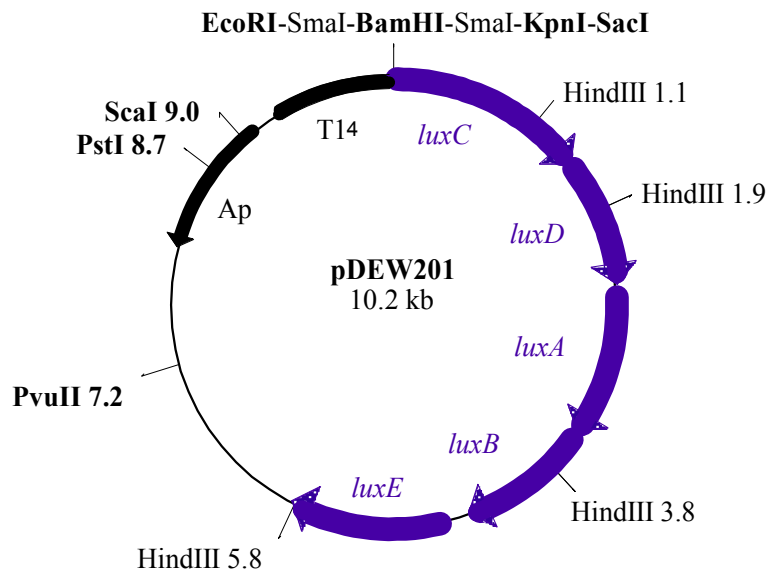
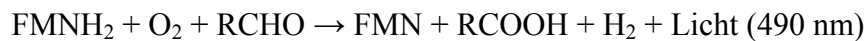


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Vektor pDEW201

Die *luxCDABE*-Gene aus *P. luminescens* sind blau hinterlegt. Außen an der Vektorkarte sind die Restriktionsschnittstellen angezeigt. Fett gedruckte Restriktionsschnittstellen kommen singular im Vektor vor.

Die Produkte der *lux*-Gene katalysieren folgende Reaktion:



FMN: Flavinmononukleotid; RCHO: langkettiger Aldehyd, RCOOH: Karbonsäure

In dieser Arbeit wurde in jedem der Lumineszenzversuche das Leuchtverhalten der Stämme 14028 (Negativkontrolle), 14028-pDEW (Kontrolle der Eigenlumineszenz des Plasmids pDEW) und des Promotorkonstrukts 14028-pDEW::P_{STM1255} untersucht. Die Stämme wurden in definiertem Minimalmedium (siehe 6.2) unter Anlegen verschiedener Bedingungen unter Schütteln bei variablen Temperaturen inkubiert und Absorption und Lumineszenz stündlich gemessen. Die Messungen erfolgten im Wallac Victor² 1420 *multilable counter* (Perkin Elmer) bei folgendem Messprogramm:

Eine Sekunde Schütteln → Messung der Lumineszenz 0,1 Sekunden pro *Well* → Schütteln für eine Sekunde → Messung der Absorption bei 490 nm Wellenlänge für 0,1 Sekunde pro *Well*.

Für die Messung der Lumineszenz bei der *in vitro*-Infektion wurde auf die Schüttelschritte und die Absorptionsmessung verzichtet sowie die Infektion in 96-*Well*-Platten (Nunc) durchgeführt. Für die Parallelansätze pro Stamm, Bedingung und Messzeitpunkt wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt.

2.12 Bioinformatische und statistische Methoden

Zur Genomannotation wurde das Programm CloneManager 6 (SciEd, Cary, USA) benutzt. Das vollständig sequenzierte und annotierte Genom von *S. typhimurium* wurde vom Genome Sequencing Centre der Washington University (St. Louis, USA) [93] bezogen.

Zur Aufklärung der Genstruktur einer von Mutagenese betroffenen Region war die Untersuchung auf Operonstrukturen von entscheidender Bedeutung. Promotorsequenzen wurden mit Hilfe zweier Programme identifiziert:

Berkeley Drosophila Genome Project, Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) sowie Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark (DTU), Promoter 2.0 Prediction Server ([180], <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>).

Zur Identifikation potenzieller Terminatorregionen wurde mit dem HUSAR Bioinformatics Lab (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/>), Programm „Terminator“ gearbeitet.

Folgende Einstellungen wurden vorgenommen: „*Linear Sequence; include reverse strand*“.

Primer wurden entweder frei oder unter Zuhilfenahme des Programms „Primer 3“ ([181], http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen. Dabei wurde besonderer Wert auf die Vermeidung von Sekundärstrukturen sowie Primerdimeren gelegt. Wenn möglich, beginnt und endet eine Primersequenz mit einem oder mehreren Paar(en) der Basen G-C, um die Bindungsfestigkeit zu erhöhen. Eine Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Primer gibt die Tabelle in Anhang 6.

Paarweise genetische Sequenzvergleiche (lokales Alignment) auf Nucleotid- oder Aminosäureebene wurden mit Hilfe des Programms BLAST [182, 183] über die Homepage des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) vorgenommen. Insbesondere wurden die Algorithmen „blastn“, „blastx“ und „blastp“ verwendet. Für multiples lokales Alignment mehrerer Sequenzen wurde ClustalW [184] verwendet.

Funktionsvorhersagen wurden auch mittels Abfrage der Datenbank Interpro [185] durch das Programm InterproScan [186] durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). Folgende Einstellungen wurden verwendet: „Alle Programme verwenden“ und „kleinste ORF-Länge 100 Nukleotide“.

Statistische Signifikanzberechnungen wurden mit dem Student-t-Test für Wertepaare der Universität Amsterdam, Niederlande, auf der Internetseite http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/2Sample_Student_t_Test.html durchgeführt. Der dabei errechnete p-Wert sollte unter 0,05 liegen, damit die Daten signifikant im Vergleich zur Kontrolle sind, d.h. die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als fünf Prozent.

Berechnungen von arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung wurden mittels Microsoft Excel XP durchgeführt. Für die Standardabweichung wurde die Funktion STABWN (Standardabweichung ausgehend von der Grundgesamtheit) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Validierung der Insertionsmutantenbank

In einer vorläufigen Untersuchung waren 438 Stämme einer *S. typhimurium*-Insertionsmutantenbank auf ihre intrazelluläre Überlebensfähigkeit untersucht worden. Durch Sequenzierung der ersten 100-150 bp des klonierten Fragments und Abgleich mit der Genomsequenz des Bakteriums [16] waren 223 verschiedene Fragmente identifiziert worden, die durch IDM in das Bakterienchromosom inseriert waren [187]. Diese bereits vorhandene Bank sollte in der vorliegenden Arbeit in einem ersten Schritt validiert werden. Dazu wurde dreistufig vorgegangen. Durch sorgfältige bioinformatische Analyse der Insertionsorte wurde eine Vorauswahl an Mutanten getroffen, die im zweiten Schritt auf ihre Wachstumscharakteristika geprüft und schlussendlich zur Infektion in kultivierten eukaryotischen Zellen gebracht wurden. Das Ziel war es, bislang unbekannte attenuierte Mutanten zu identifizieren, welche die Basis für weitere Studien bilden konnten.

3.1.1 *In silico*-Validierung

Es wurden solche Insertionsmutanten aus dem Fundus der 223 Mutanten von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen, bei denen entweder keine klare Zuordnung des Insertionsfragments getroffen werden konnte oder die bereits als wahrscheinlich essenziell oder Bestandteil von Haushaltsgengruppen eingestuft wurden. So konnten vorläufig 169 Kandidatenstämme mit Insertionen ausgewählt werden, die näher untersucht werden sollten. Auf Basis der aktuellen Genomannotation von *S. typhimurium* [93] wurde in einem ersten Schritt versucht, eine Gruppierung dieser 169 Insertionsmutanten nach der putativen Funktion des getroffenen Gens zu erstellen.

Abbildung 9 ist deutlich zu entnehmen, dass stoffwechselassoziierte Gene den größten Teil der von der IDM getroffenen Gene darstellen, was eine Fokussierung auf diesen Bereich der für das intrazelluläre Überleben wichtigen Gene nahe legt. Wie bereits in 1.1.4.3 dargelegt, sind über den Stoffwechsel intrazellulärer Salmonellen bislang relativ wenige Informationen verfügbar.

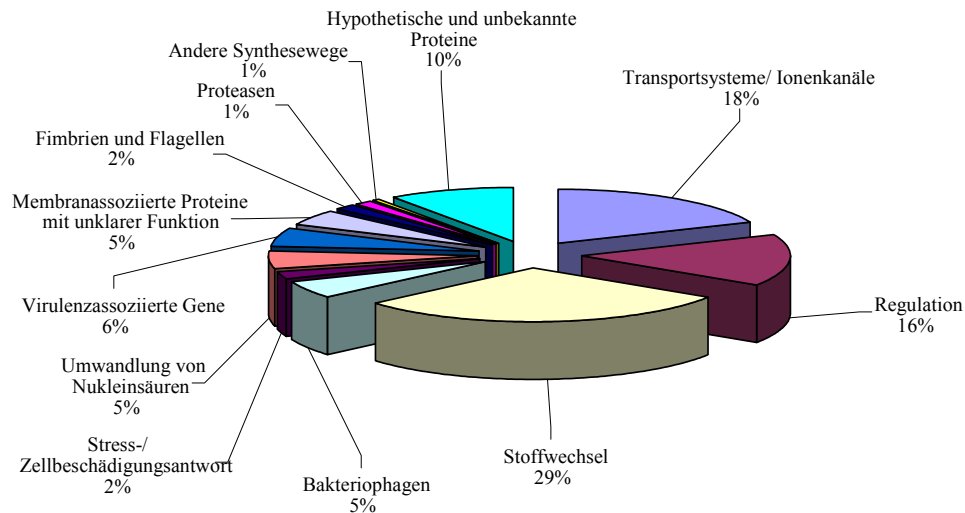


Abbildung 9: Funktionelle Gliederung der 169 Insertionsmutanten

Gezeigt ist eine Grobgliederung der Genprodukte von 169 Genen mit Vektorinsertionen in zwölf definierte Funktionsgruppen unter Angabe des Prozentsatzes der Genprodukte, die in dieser Gruppe liegen.

Nachfolgend wurden von allen 169 Mutanten die von der Insertionsmutagenese betroffenen Regionen des Bakterienchromosoms auf ihre genetische Organisation hin untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf durch Insertionsmutagenese ausgeschaltete Gene im Bereich der in Kapitel 1.1.4.2 beschriebenen nichtkollinearen Genominseln gerichtet. Ein Abgleich der von McClelland et al. [16] publizierten Daten mit den Orten der Vektorinsertionen zeigte, dass 44 der Insertionen in 13 der 29 größeren dieser Inseln lagen. Für die Inseln GEI1664/1678 und GEI2016/2058 mussten die von McClelland et al. angegebenen Grenzen bei STM1673 bzw. STM2019 aufgrund neuer Erkenntnisse, welche die Annotation dieser Regionen betreffen, um einige Gene auf STM1678 bzw. STM2016 verschoben werden. Im Falle von GEI2016/2058 umfasst die Region nun alle Gene des *cob-cbi-pdu*-Genclusters. Im Falle von GEI1664/1678 wurden die Grenzen der nichtkollinearen Region in *E. coli* an den Genen *mppA* und *ynaI* ausgerichtet, zwischen denen in *S. typhimurium* die Insel GEI1664/1678 liegt.

Tabelle 6: Auswahl an genomischen Inseln in *Salmonella* mit Vektorinsertionen

Name der Insel	Anzahl Gene in der Insel	Insertionen im Bereich der Insel	Größe, SPIs
GEI0266/0307	42	4	46,8 kb, SPI-6
GEI0715/0727	13	1	12,4 kb
GEI1005/1056	52	4	45,5 kb
GEI1171/1184	14	3	11,5 kb
GEI1239/1269	31	3	24,3 kb
GEI1379/1422	44	5	39,7 kb, SPI-2, nicht weiter untersucht
GEI1528/1562	35	7	38,7 kb
GEI1664/1678	14	3	14,0 kb
GEI1911/1925	15	1	15,6 kb
GEI2016/2058	43	3	36,3 kb
GEI2584/2636	53	8	47,8 kb
GEI2741/2767	27	1	30,9 kb
GEI2770/2788	19	1	24,9 kb

IDM-Insertionen traten mit größerer Wahrscheinlichkeit innerhalb der von McClelland et al. definierten Genominseln auf, als verteilt im restlichen Genom. Diese Akkumulation kann als signifikant betrachtet werden, da die betreffenden 13 genomischen Inseln ungefähr 8,8 % aller Gene von *S. typhimurium* beinhalten und 44 im Bereich dieser Inseln identifizierte Mutanten ungefähr 19,7 % aller im *Screen* [161] gefundenen Mutanten entsprechen. Drei Gene (*flgE*, *cobS* und STM2633) wurden durch homologe Rekombination über zwei unabhängige Fragmente unterbrochen und gehen nicht in die Berechnung der Zahl der getroffenen, voneinander verschiedenen Gene ein, ebenso wie fünf Stämme mit Insertionen in den gut charakterisierten Genen des SPI-2, die nicht weiter untersucht wurden. Es verbleiben also 39 Insertionen in 36 Genen auf zwölf genomischen Inseln (siehe Tabelle 7). Der Hauptteil der Vektor-Insertionen in diesen Inseln führte zur Identifikation von bislang uncharakterisierten Genen mit lediglich putativer Funktion.

Tabelle 7: Gliederung der Insertionsmutanten nach genomischen Inseln

Die erste Spalte gibt die Nukleotidposition des Insertionsbeginns im Genom von *S. typhimurium* an. In der zweiten Spalte ist die Orientierung des *lac*-Promotors innerhalb des Insertionsorts gezeigt (0 = 5'-3'-Richtung, 1 = 3'-5'-Richtung). Die vorhergesagte Funktion (vierte Spalte) ist der Genomannotation der Washington University in St. Louis [93] entnommen. In der fünften Spalte ist ein möglicher polarer Effekt der IDM auf benachbarte Gene dargestellt.

Insertion	P _{lac}	Gen	Vorhergesagte Funktion	Eventueller polarer Effekt
GEI 0266/0307				
0312910	1	STM0272	Putative Clp-ähnliche ATPase	STM0273
0336040	0	STM0291	Putatives Protein der RHS-Familie	-
0345442	0	STM0301 (<i>safC</i>)	PapC-ähnliches Porin, beteiligt an der Fimbrien-Biogenese	<i>safD</i>
0348388	0	STM0304 (<i>sinR</i>)	Transkriptionsregulator	-
GEI 0715/0727				
0781748	1	STM0716	Putative Phagenintegrase	-
GEI 1005/1056 (Gifsy-2 Prophage)				
1118638	1	STM1031	Gifsy-2 Prophagenprotein	-
1120409	0	STM1033	Putative Clp-ähnliche Protease	-
1128556	0	STM1041	Gifsy-2 Prophagenprotein	-
1129026	1	STM1042	Vermutliches kleineres Schwanzprotein	STM1043
GEI 1171/1184				
1260074	1	STM1177 (<i>flgE</i>)	Flagellenbiosynthese	STM1178-1184 (Flagellenoperon)
1260991	1	STM1177 (<i>flgE</i>)	Flagellenbiosynthese	
1263244	1	STM1180 (<i>flgH</i>)	Flagellenbiosynthese	STM1179-1184 (Flagellenoperon)
GEI 1239/1269				
1339262	0	STM1255	Putativer ABC-Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	STM1256-1259
1340649	0	STM1256	Putativer ABC-Transporter	STM1255, STM1257-1259
1341766	0	STM1257	Putativer ABC-Transporter	STM1255-1256, STM1258-1259
GEI 1528/1562				
1610374	0	STM1534	Putatives Hydrogenaseprotein	STM1533-1531
1618194	1	STM1542	Putative zinkbindende Dehydrogenase	-
1618937	0	STM1543	Putatives Transportprotein	STM1542
1620090	0	STM1544 (<i>pqaA</i>)	PhoP/Q-reguliertes Protein	-
1632500	1	STM1555	Putativer Transkriptionsregulator	-
1634005	1	STM1556	Putativer Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	STM1557
1640082	1	STM1559	Putative Glykosylhydrolase	STM1558
GEI 1664/1678				
1758585	1	STM1664	Putativer Transkriptionsfaktor	-
1766705	0	STM1672	Putatives zytoplasmatisches Protein	Unklar
1770466	1	STM1677	Putativer Transkriptionsregulator, LysR-Familie	-

Insertion	P _{lac}	Gen	Funktion	Eventueller polarer Effekt
GEI 1911/1925				
2017282	0	STM1921 (<i>cheA</i>)	Sensor-Histidin-Proteinkinase	<i>cheW</i>
GEI 2016/2058				
2098498	0	STM2017 (<i>cobS</i>)	Cobalamin 5'-Phosphat Synthase	<i>cobT</i>
2098900	0	STM2017 (<i>cobS</i>)	Cobalamin 5'-Phosphat Synthase	<i>cobT</i>
2123344	0	STM2046 (<i>pduK</i>)	Verwandt mit dem Haupthüllprotein von Carboxysomen	-
GEI 2584/2636 (Gifsy-1 Prophage)				
2733166	0	STM2585A	Homolog zu <i>pagK</i>	-
2738611	0	STM2589	Gifsy-1 Prophagenprotein	-
2746669	1	STM2595	Ähnlich einem kleineren Schwanzprotein	-
2748604	0	STM2599 (<i>gipA</i>)	Peyer'sche Plaques-spezifischer Virulenzfaktor GipA	-
2751801	1	STM2603	Ähnlich Kopfprotein gp7 von Phage 21	-
2753573	1	STM2605	Putative periplasmatische Serinprotase	STM2604-2600
2773611	0	STM2633	Ähnlich dem Enterohämolysin 1 von <i>E. coli</i>	-
2774027	0	STM2633	Ähnlich dem Enterohämolysin 1 von <i>E. coli</i>	-
GEI 2741/2767				
2883213	0	STM2745	Putatives inneres Membranprotein	-
GEI 2770/2788				
2929158	1	STM2781 (<i>virK</i>)	Virulenzgen, homologe Sequenz zu <i>virK</i> in <i>Shigella</i>	-

Die Verwendung der Insertionsmutagenese bringt Probleme bei der Zuordnung des beobachteten Phänotyps mit sich. Der Phänotyp kann sowohl eine Folge der Mutation als auch eines Nebeneffekts sein, wie etwa der polaren terminationsinduzierten Reduktion der Genexpression eines *downstream* von der Insertionsstelle gelegenen Gens [175]. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, wurde versucht, eventuell vorhandene polare Effekte der IDM auf benachbarte Transkriptionseinheiten durch Untersuchung der chromosomalen Insertionsstelle zu erkennen. Beide Stränge der DNA-Sequenz wurden auf das Vorkommen von Promotoren und Terminatoren untersucht. Transkriptionseinheiten wurden dann als solche betrachtet, wenn sie entweder von einem starken Promotor (Score > 0,97) oder einem schwächeren Promotor (Score 0,90-0,96) und einem Terminator flankiert waren.

Die Analyse zeigte, dass 15 der in den zwölf genomischen Inseln identifizierten Gene monocistronisch transkribiert werden oder endständige Gene putativer Operons sind. Für fünf weitere Gene kann ein polarer Effekt ausgeschlossen werden, da der von der Insertionsstelle auswärts zeigende *lac*-Promotor die Transkription der *downstream* gelegenen Gene

wahrscheinlich retten kann [188-190]. 15 Fragmente wurden in nicht endständigen, eng beieinander liegenden Genen gefunden, die wahrscheinlich in Operons organisiert sind. Bei mindestens acht dieser Insertionsmutanten folgt auf das mutierte Gen ein ORF, der wahrscheinlich am selben funktionalen Stoffwechselweg beteiligt ist. Dies trifft zu für Gene der Flagellen-Biosynthese und Motilität, des Transports und der Cobalaminsynthese. In diesen Fällen wurden statt einzelner Gene, die an der intrazellulären Replikation beteiligt sind, ganze Loci definiert. Ein unklares Ergebnis wurde für ein Fragment erzielt, das die ORFs zweier benachbarter Gene überlappt, die in gegenläufige Richtungen transkribiert werden.

3.1.2 Nur fünf von 169 Mutanten zeigen eine Wachstumsdefizienz

Sämtliche 169 Insertionsmutanten, inklusive der 44 Insertionen in Gene der bereits erwähnten genomischen Inseln, wurden auf das Wachstum im Vollmedium (LB-Medium) unter Selektionsbedingungen (18 µg/ml Tetracyclin) bei 37 °C untersucht. So sollten Mutanten ausgeschlossen werden, die einen allgemeinen Wachstumsdefekt anstelle eines Defekts im intrazellulären Überleben zeigen und damit Ergebnisse der Zellkulturexperimente verfälschen könnten. Für alle Mutanten liegen Daten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen vor. Aus den Daten wurden für jeden untersuchten Stamm Wachstumskurven erstellt. In Abbildung 10 sind exemplarisch einige Kurven dargestellt.

Als Kontrolle wurde in jedem Experiment die wildtypisch wachsende, aber tetracyclinresistente Insertionsmutante in *phoN* mitgeführt. Mutationen in diesem Gen wirken nicht virulenzattenuierend [135]. Deutlich in Abbildung 10 zu sehen ist die, wahrscheinlich durch einen unspezifischen Effekt der Insertion des großen temperatursensitiven Vektors verursachte, Verschiebung der Wachstumskurve tetracyclinresistenter Mutanten im Vergleich zum 14028-Wildtyp ohne Antibiotikaresistenz. Ebenfalls beobachtet werden kann das starke Abweichen der Wachstumscharakteristik der Mutante in STM1664 aus GEI1664/1678 von der Kontrolle *phoN*. Diese wurde als wachstumsdefizient eingestuft. Insgesamt konnten von 169 untersuchten Insertionsmutanten fünf aufgrund stark vom Wildtyp abweichender Wachstumscharakteristika als wahrscheinlich wachstumsdefizient von allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Aus den in Tabelle 7 dargestellten Insertionsmutanten wurden zwei Stämme, mit Insertion in STM1534 und STM1664, als wachstumsdefizient eingestuft. Zellkulturdaten wurden für diese Stämme nicht erhoben.

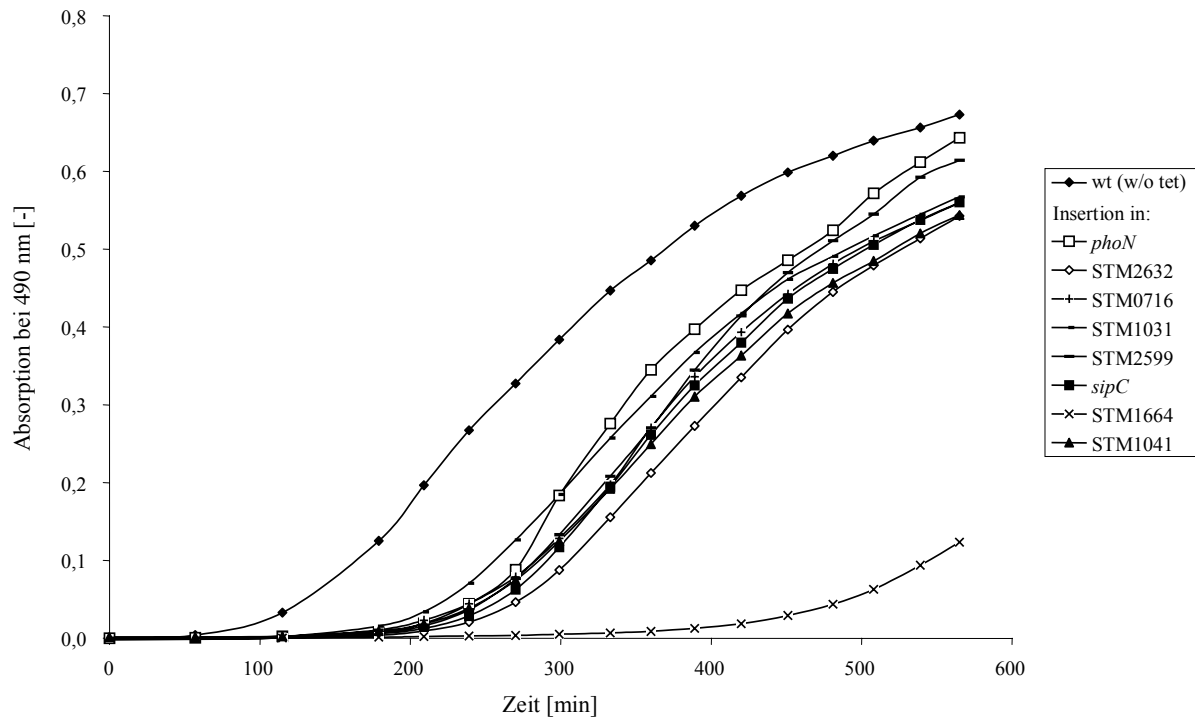


Abbildung 10: Wachstum ausgewählter Mutanten im Vollmedium

wt (w/o tet): Kontrolle des Wachstums ohne Tetracyclin im Flüssigmedium. *rhoN*: Positivkontrolle des Wachstums für die ebenfalls tetracyclinresistenten Mutanten.

3.1.3 159 Insertionsmutanten sind in der intrazellulären Überlebensfähigkeit attenuiert

Nicht wachstumsdefiziente Insertionsmutanten wurden in kultivierten J-774A.1-Mausmakrophagen zur Infektion gebracht. Die Makrophagenzellen wurden nicht chemisch aktiviert, da eine Aktivierung für die zu untersuchende intrazelluläre Replikation irrelevant scheint [191]. Zur Anzucht der Bakterien wurde das in 2.10.1.1 beschriebene Verfahren in Flüssigkultur verwendet. Pro Bakterienstamm wurden vier Ansätze der Übernachtskultur hergestellt, aus denen jeweils diejenigen ausgewählt wurden, die sich in synchroner Wachstumsphase mit den anderen Stämmen befanden. Nach der Inkubation über Nacht wuchsen die Bakterienstämme immer in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{620} \sim 0,75-0,9$ in 200 μ l LB-Medium in 96-Well-Platte), in der die Zytotoxizität noch nicht maximal ist [192]. Je Stamm und Zeitwert wurden pro Assay zwei voneinander unabhängige Infektionen mit an die optische Dichte der Kultur angepasster Infektionsdosis (siehe 2.10.1.1) angesetzt, wobei die MOI stets auf 10 eingestellt wurde.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt durch verändertes Adhäsions- oder Invasionsverhalten der untersuchten Mutanten zustande kam, wurde zusätzlich die Zahl intrazellulärer Bakterien eine Stunde nach Infektionsbeginn gemessen. Als Kontrolle wurde

hierzu der Stamm 14028*ratA*::pIDM1 mit einer Vektorinsertion in der Promotorregion von *ratA* (STM2515) benutzt, bei dem nur 0,92 % der Bakterien, verglichen mit der Wildtypkontrolle, eine Stunde nach der Infektion aus der Wirtszelle wiedergewonnen werden konnten. Diese Mutante scheint schwere Defekte im Invasionsverhalten aufzuweisen, wahrscheinlich aufgrund eines polaren Effekts auf die Transkription des benachbarten Gens *ratB*. Mutanten in *ratB* sind bekanntermaßen unfähig zur Kolonisation des Blinddarms [193]. Mit Ausnahme der Insertionen in STM1255, STM1256 und STM1257 (siehe 3.3.4) konnte in keiner anderen Mutante aus den zwölf genannten Genominseln eine auffällige Abweichung vom wildtypischen Verhalten beobachtet werden, die mit dem Verhalten von 14028*ratA*::pIDM1 vergleichbar gewesen wäre. Bei Insertionen in den Genen *cheA*, *flgE* und *flgH*, die Oberflächeneigenschaften der Bakterienzelle beeinflussen, konnte ein vermindertes intrazelluläres Wachstum festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte das Resultat einer reduzierten Invasivität sein [194, 195], die aber den Schwellenwert von 14028*ratA*::pIDM1 übersteigt.

Nach der Infektion für eine bzw. sieben Stunden wurden die Bakterien wie in 2.10.4 beschrieben lysiert, die Suspension verdünnt und ausgezählt. Der verlässlich auszählbare Bereich lag bei 5-250 Kolonien pro Auftropfspur. Stämme, die etwa aufgrund von Pipettierfehlern Abweichungen von größer als 50 % zwischen den KbE-Werten pro Zeitpunkt lieferten, wurden erneut zur Infektion gebracht.

Jeder Infektionsassay wurde mit einer Positivkontrolle, der Insertionsmutanten in *phoN* durchgeführt [135]. Da das intrazelluläre Replikationsverhalten der tetracyclinresistenten *phoN*-Mutante Abweichungen vom Verhalten des 14028-Wildtyp zeigte, welches wahrscheinlich ebenfalls auf einen unspezifischen Effekt des großen, inserierten Plasmids und dessen Tetracyclin-Resistenzgen zurückzuführen ist [196], wurde das Verhalten von 14 Mutanten mit pIDM-Insertion an unbekannter Stelle untersucht und der Mittelwert der gewonnenen Überlebenswerte als angemessene Kontrolle benutzt. Das Replikationsverhalten dieser Kontrollgruppe ist nur geringfügig unterschiedlich von dem der Wildtypkontrolle mit Insertion in *phoN* ($96,6 \pm 17,8$ % gegenüber 100 %).

Weiterhin wurde in jedem Assay als Negativkontrolle eine Insertionsmutanten in *phoP* mitgeführt. Mutanten im Gen *phoP* sind hoch virulenzattenuiert und zeigen einen starken Überlebens- und Replikationsdefekt im Makrophagen [135]. Die KbE-Werte dieser Mutante lagen im Schnitt um den Faktor fünf bis zehn unter den KbE-Werten der Positivkontrolle. Bei starken Abweichungen von diesem Verhältnis wurde das entsprechende Experiment wiederholt. Durch Normierung der KbE-Werte einer untersuchten Mutante auf die Angabe in

Prozent des K_{bE}-Werts der jeweiligen wildtypischen Kontrolle (*phoN*) konnten verschiedene Versuche untereinander verglichen werden.

Ausplattiert wurde auf LB-Agar ohne Zusatz von Antibiotika, da die durch pIDM erzeugte Mutation ohne Selektionsdruck bei 37 °C stabil ist (siehe 3.1.5 und [162]). Insgesamt liegen zu jeder der in Tabelle 7 aufgeführten Insertionsmutanten mindestens vier (STM1255, STM1256 und STM1257: zwei) unabhängige intrazelluläre Überlebensdaten für jeweils zwei Zeitwerte der Infektion (ein und sieben Stunden) vor. Tabelle 8 und Abbildung 11 zeigen die auf Prozent der Wildtypkontrolle normierten intrazellulären Überlebensdaten nach sieben Stunden Infektion für die in Tabelle 7 aufgeführten 39 Insertionsmutanten ohne die beiden bereits als wachstumsdefizient identifizierten Stämme.

Tabelle 8: Intrazelluläre Überlebensdaten der untersuchten Insertionsmutanten

Die erste Spalte gibt den Insertionsort der IDM bzw. die Stammnamen an. In der zweiten Spalte sind die intrazellulären Überlebensdaten nach sieben Stunden Infektion im prozentualen Verhältnis zum Wildtyp gezeigt, in der dritten Spalte die Standardabweichung für die Zusammenführung der Einzelerperimente je Stamm/Mutante.

Stamm/ Insertionsort	Intrazelluläre Überlebensrate in Prozent des wt	Standardabweichung der Zusammenführung
14028 Wildtyp	100,0	0,0
Kontrollgruppe	96,6	17,8
STM1231(<i>phoP</i>)	10,3	2,3
STM0272	22,0	5,4
STM0291	28,8	9,5
STM0301 (<i>safC</i>)	28,8	2,6
STM0304 (<i>sinR</i>)	33,8	15,9
STM0716	7,8	6,4
STM1031	21,3	11,3
STM1033	13,1	4,3
STM1041	13,1	2,9
STM1042	11,3	6,7
STM1177 (<i>flgE</i>)	20,6	9,6
STM1177 (<i>flgE</i>)	28,4	10,6
STM1180 (<i>flgH</i>)	17,7	5,4
STM1255	0,6	0,4
STM1256	4,7	1,4
STM1257	1,9	0,5
STM1542	32,2	15,1
STM1543	keine Bakterien detektierbar	
STM1544 (<i>pqaA</i>)	15,2	5,6
STM1555	61,8	20,5
STM1556	78,6	13,5
STM1559	44,2	12,5
STM1672	28,1	6,3

Stamm/ Insertionsort	Intrazelluläre Überlebensrate in Prozent des wt	Standardabweichung der Zusammenführung
STM1677	3,5	1,8
STM1921 (<i>cheA</i>)	17,3	8,6
STM2017 (<i>cobS</i>)	18,9	0,8
STM2017 (<i>cobS</i>)	12,6	7,4
STM2046 (<i>pduK</i>)	26,4	1,5
STM2585A	27,1	14,0
STM2589	7,4	1,6
STM2595	24,0	6,8
STM2599 (<i>gipA</i>)	8,8	1,5
STM2603	15,4	2,4
STM2605	19,3	8,9
STM2633	4,0	1,3
STM2633	54,2	10,7
STM2745	25,4	9,2
STM2781 (<i>virK</i>)	20,9	4,1

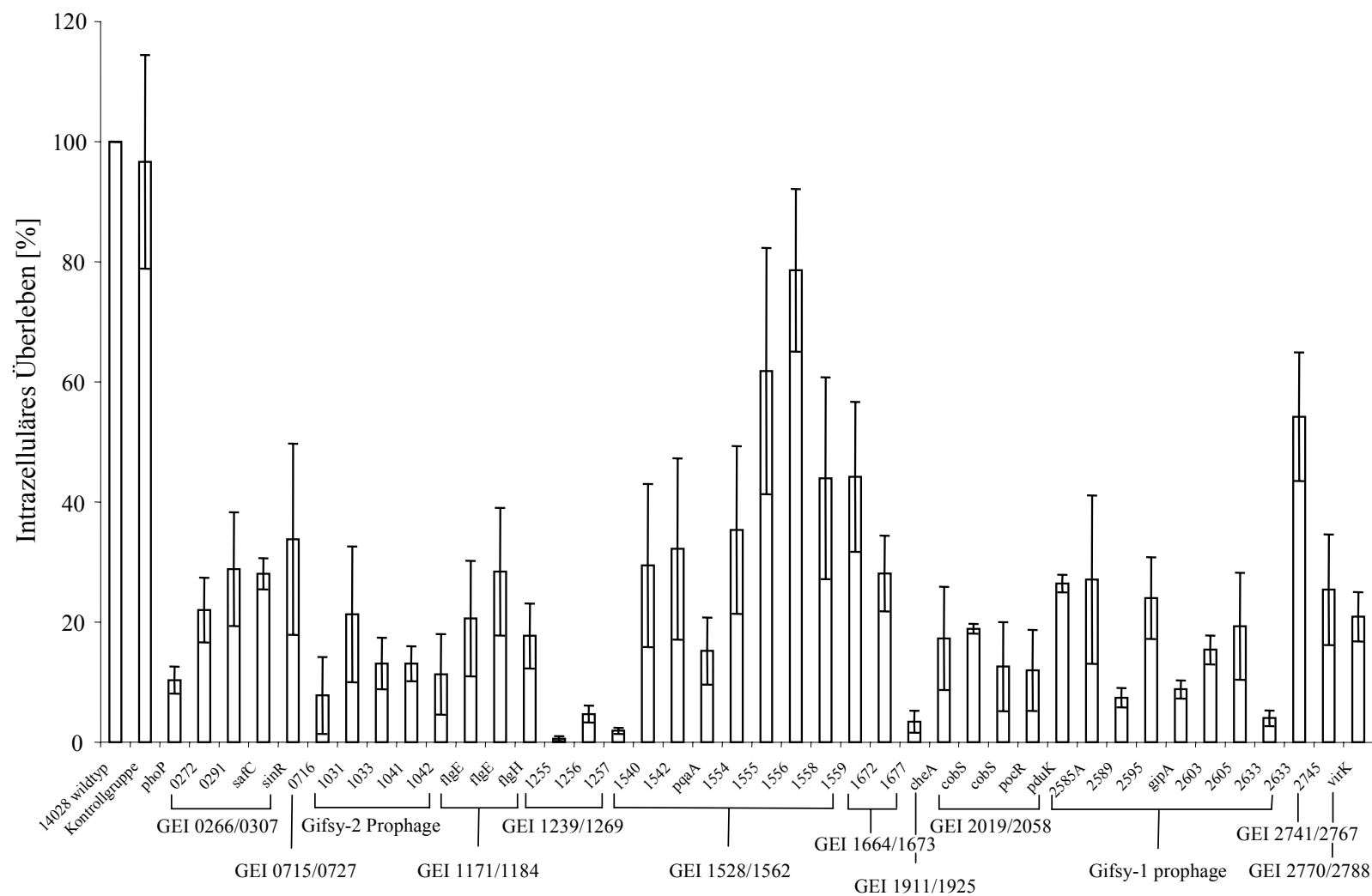


Abbildung 11: Intrazelluläre Überlebensdaten Insertionsmutanten

Auf der Abszisse sind die Insertionsloci sowie deren Gruppierung in genetische Inseln angegeben. 14028 Wildtyp, Kontrollgruppe und *phoP*: In den Assays mitgeführte Kontrollen.

Überlebensdaten für die insgesamt 164 untersuchten Insertionsmutanten sind tabellarisch aufgelistet in Anhang 6.3 zu finden. Zusammengenommen stellten sich nur fünf von 164 Stämmen mit Vektorinsertionen als nicht attenuiert in der intrazellulären Überlebensfähigkeit dar, was 0,03 % der untersuchten Mutanten entspricht. Zehn weitere Mutanten sind nur schwach attenuiert (Schwellenwert > 60 %) und 52 Stämme zeigen eine sehr starke Attenuation unterhalb des Schwellenwerts der Kontrolle 14028*phoP*(593)::pIDM1 von 10 % intrazellulärem Überleben verglichen mit dem Wildtyp.

Diese Daten illustrieren den hochvariablen Effekt der *knockout*-Mutation einzelner Gene auf das intrazelluläre Überleben von *S. typhimurium*. Die Spannbreite der Attenuationsgrade im Bereich der zwölf nichtkollinearen genomischen Inseln reicht von 3,5 % (Insertion in STM1677) bis zu 78,6 % (Insertion in STM1566) intrazelluläres Überleben bezogen auf die Positivkontrolle im selben Versuch.

Für die Insertionsmutanten in STM1555 und STM1556, deren Werte sehr nahe bei 100 % liegen, wurde die Signifikanz der Daten mit dem Student-t-Test überprüft. Der p-Wert betrug in beiden Fällen < 0,03. Die Daten können damit als signifikant betrachtet werden.

3.1.4 Wenig Übereinstimmung zwischen Überlebensdaten und Mikroarraydaten

Die in dieser Arbeit erlangten intrazellulären Überlebensdaten wurden mit dem durch Mikroarrayexperimente erstellten intrazellulären Genexpressionsprofil von *S. typhimurium* [144] verglichen. Eriksson et al. hatten J-774A.1-Makrophagen mit *S. typhimurium* infiziert und vier, acht und zwölf Stunden nach der Infektion die Gesamt-RNA der intrazellulären Salmonellen präpariert und mit einem genomabdeckenden Mikroarray [197, 198] für *S. typhimurium* hybridisiert. So konnte durch Ablesen der Stärke des Hybridisierungssignals ein Genexpressionsprofil der Bakterien während der Infektion des Makrophagen erstellt werden. Nur wenig Übereinstimmung besteht zwischen den Regulationsdaten für einzelne Gene und den in dieser Arbeit erstellten Attenuationsdaten.

Als stark hochreguliert während der intrazellulären Proliferation wurden nur das Gen *safC* sowie die Gene STM1255, STM1676 und STM2585 gefunden. Eine starke Herunterregulation während der Infektion fand nur bei *flgE/H* statt.

Tabelle 9: Mikroarraydaten zu den Insertionsmutanten

Angegeben ist der maximale Regulationsfaktor vier, acht oder zwölf Stunden nach der Infektion. Quelle: [144], Supplementtabelle mmi3313TableS2.xls

Gen	Maximaler Regulationsfaktor im Mikroarrayexperiment
<i>safC</i> , STM0301	5,10
<i>flgE</i> , STM1177	0,02
<i>flgH</i> , STM1180	0,06
STM1255	3,94
STM1672	0,47
STM1676	2,07
STM2585	4,08
STM2604	0,38
STM2599	0,48

3.1.5 Vektor pIDM ist intrazellulär stabil

Im Folgenden sollte das Potenzial der IDM untersucht werden, stabile Mutationen zu erzeugen, die während der Zellkulturuntersuchungen nicht durch Verlust des Kointegrats zum wildtypischen Genotyp revertieren und damit die Versuchsergebnisse verfälschen. Dazu wurde die Insertionsmutante 14028*phoN*(628)::pIDM1 in Zellkultur zur Infektion gebracht. In 16 unabhängigen Experimenten wurden die Wirtszellen jeweils nach sieben Stunden lysiert und die KbE-Zahl der freigewordenen Bakterien parallel auf LB-Agarplatten mit und ohne Selektionsdruck (Tetracyclin 18 µg/ml) bei 37 °C Inkubationstemperatur bestimmt.

Es konnte in diesen Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen der Zahl der tetracyclinsensitiven und der tetracyclinresistenten Bakterien festgestellt werden. Die Kointegratstruktur scheint also für mehrere Generationszyklen bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C stabil zu sein. Um einen Vergleich mit anderen Mutagenesemethoden durchführen zu können, wurde für eine Transposonmutante von *phoP* (14028*phoP*::Tn10*dtet*^R), eine Mutante mit chromosomaler Insertion einer Kanamycinkassette durch Allelaustausch [165] in Gen STM2582 (14028Δ2582(18)::*kan*^R) und einen wildtypischen Stamm von 14028 mit dem Plasmid pIDM1 *in trans* (14028/pIDM1) die beschriebene Zellkulturinfektion in je vier unabhängigen Experimenten durchgeführt. Aus der Wirtszelle befreite Bakterien wurden auf den adäquaten Antibiotikaplatten und parallel dazu auf Agarplatten ohne Antibiotika aufgefangen und inkubiert.

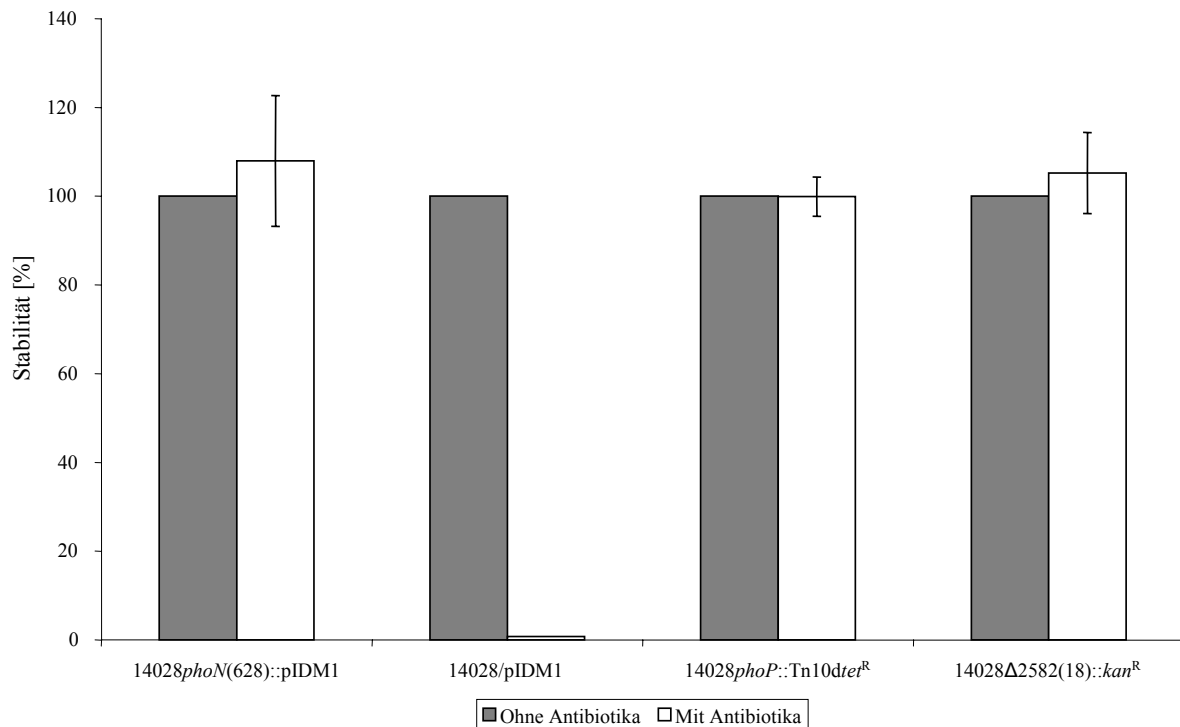


Abbildung 12: Stabilität von pIDM1 *in cis* und *in trans* im Vergleich zu anderen Mutagenesemethoden

Aufgetragen ist die Stabilität der untersuchten Mutanten in Prozent. Der KbE-Wert für die auf antibiotikafreien Agarplatten aufgefangenen Bakterien ist auf 100 % gesetzt, der KbE-Wert für die auf antibiotikahaltigen Agarplatten aufgefangenen Bakterien ist als Angabe in Prozent von den auf antibiotikafreiem Agar inkubierten Bakterien aufgetragen. Für 14028/pIDM1 ist kein Fehlerbalken sichtbar, da der Wert kleiner 0,5 % ist.

In Abbildung 12 ist deutlich zu sehen, dass eine mit pIDM erzeugte Insertionsmutante im intrazellulären Milieu ohne Selektionsdruck ähnlich stabil ist wie etwa Transposonmutanten. Liegt der Vektor *in trans* in der Zelle vor, so geht er ohne angelegten Selektionsdruck innerhalb kurzer Zeit verloren.

3.2 Nichtpolare Deletion von zehn Genen in *S. typhimurium*

Im Folgenden wurde versucht, die durch Anwendung der IDM gewonnenen Erkenntnisse mittels einer weiteren Mutagenesemethode zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden nichtpolare Deletionsmutanten von neun Genen von *S. typhimurium* nach der Methode von Datsenko und Wanner [165] in Orten erzeugt, die auch Ziel der Insertionsmutagenese waren. Die ausgewählten Zielgene repräsentieren sechs der zwölf beschriebenen genomischen Inseln. Nur für zwei der entsprechenden Insertionsmutanten kann ein polarer Effekt ausgeschlossen werden. In einem Fall wurden zwei der identifizierten Gene (STM2603 mit STM2605), die wahrscheinlich in einem Operon innerhalb des Gifsy-1 Prophagen liegen, zusammen mit dem Gen STM2604 deletiert, was in einer Dreifachdeletion resultiert.

Weiterhin wurde das Gen des Virulenzregulators *phoP* ausgeschaltet. Diese Deletionsmutante wurde aufgrund der nachgewiesenen starken Attenuation eines Genknockouts [135] als Negativkontrolle in allen Zellkulturversuchen benutzt.

3.2.1 Konstruktion der Deletionsmutanten

Unter Verwendung des in 2.7 beschriebenen Verfahrens konnten insgesamt zehn Gene in *S. typhimurium* deletiert werden. Die Effizienz der homologen Rekombination der Kanamycinkassette ist gering und liegt bei 1-20 Klonen pro Mikrogramm eingesetztes PCR-Produkt. Ebenso zeigte sich bei der FLP-vermittelten Entfernung der Antibiotikakassette aus dem Genom eine Erfolgsrate von weniger als 50 Klonen pro eingesetztem Mikrogramm pCP20. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über den Ort der Gendeletion und die vorhergesagte Funktion des ausgeschalteten Genprodukts.

Tabelle 10: Überblick über deletierte Gene in *S. typhimurium* und deren putative Funktion

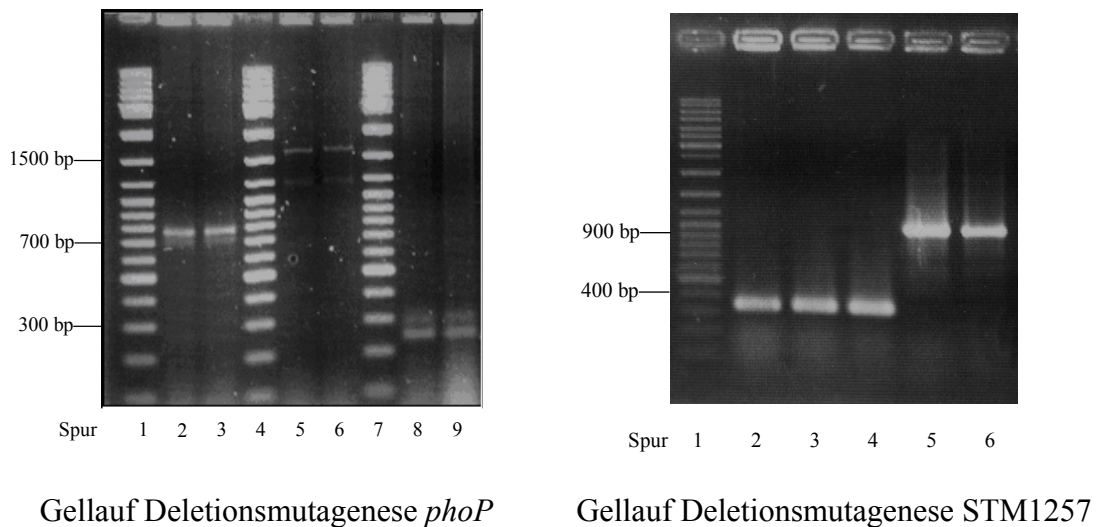
Deletionsort, Genname	Vorhergesagte Funktion
STM0301, <i>safC</i>	PapC-ähnliches Porin, beteiligt an der Fimbrienbiogenese
STM1031	Gifsy-2 Prophagenprotein
STM1033	Putative Clp-ähnliche Protease
STM1042	Vermutliches kleineres Schwanzprotein, Gifsy-2 Prophage
STM1231, <i>phoP</i>	Responseregulator des Zweikomponentensystems PhoP/Q
STM1257	Putativer ABC-Transporter
STM1555	Putativer Transkriptionsregulator
STM1677	Putativer Transkriptionsregulator, LysR-Familie
STM2017, <i>cobS</i>	Cobalamin 5'-Phosphat-Synthase
STM2603 mit STM2605	Ähnlich Kopfprotein gp7 von Phage 21 und putative periplasmatische Serinprotease

3.2.2 Bestätigung der Gendeletion

Alle Gendeletionen wurden zweifach bestätigt (siehe 2.7.5). Sämtliche Mutanten wiesen nach Abschluss der Mutagenese die beschriebene Sensitivität gegenüber Kanamycin auf. Dies wurde in Parallelausstrichen auf entsprechenden Agarplatten und Inkubation bei 37 °C getestet. Eine Sensitivität gegenüber Ampicillin und Chloramphenicol bestand ebenfalls, so dass davon auszugehen ist, dass die zur Mutagenese benutzten Vektoren pKD46 und pCP20 ebenfalls aus der Bakterienzelle eliminiert wurden.

Weiterhin wurden alle Mutanten durch Kolonie-PCR mit von den Syntheseprimern des Deletionsfragments verschiedenen Testprimern bei einer Annealingtemperatur von 52 °C auf

die erfolgte Gendeletion untersucht. Nachstehende Abbildung zeigt exemplarisch zwei Agarosegele mit PCR-Produkten aus Schritten der Mutagenese:



Gellauf Deletionsmutagenese *phoP*

Gellauf Deletionsmutagenese STM1257

Abbildung 13: Agarosegel der Deletion von *phoP* und STM1257

Links: Alle Proben wurden doppelt aufgetragen. Längenstandard: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas) (Spur 1, 4 und 7). Bei Verwendung der entsprechenden Testprimer für dieses Gen ergibt sich in der Kolonie-PCR für das intakte Gen im 14028-Wildtyp eine Länge von 772 bp (Spur 2 und 3), für die inserierte Kanamycinkassette in Mutante 14028Δ*phoP*(18)::*kan^R* eine Länge von 1626 bp (Spur 5 und 6) und für die Region um das deletierte Gen eine Länge von 233 bp (Spur 8 und 9).

Rechts: Längenstandard: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas) (Spur 1). Spur 2 mit 4: Dreifachauftragung Kolonie-PCR mit Deletionsmutante 14028ΔSTM1257. Für das deletierte Gen ergibt sich mit den Testprimern eine Länge von 304 bp. Spur 5 und 6: Kolonie-PCR von 14028 mit intaktem Gen STM1257. Es ergibt sich eine Bandenlänge von 980 bp.

Für die Mutanten in *phoP* sowie STM1677 wurde außerdem eine Sequenzierung des Deletionsorts durchgeführt. Benutzt wurden dazu die Primer 1677.Seq sowie *phoP*.Seq (siehe Primertabelle in Anhang 6.1). Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 100 pM des Primers sowie 30 ng/100 bp getrocknete DNA benutzt. Die Amplifikation des zu sequenzierenden DNA-Bereichs erfolgte mit den jeweiligen Testprimersätzen.

Die Mutagenesemethode nach Datsenko und Wanner lässt eine kurze Fremdsequenz inklusive einer der beiden FRT-Sequenzen anstelle des intakten Gens zurück. Diese Sequenz hat eine Länge von 83 bp (STM 1677) bzw. 84 bp (*phoP*). Benachbarte Genabschnitte werden nicht beeinträchtigt. Die erfolgreiche Deletion wurde durch die Sequenzierung des Deletionsorts in beiden untersuchten Mutanten klar bestätigt. Die verbleibende Fremdsequenz besteht aus einer FRT-Sequenz und der Sequenz zwischen FRT und den zum Gen homologen Sequenzabschnitten, die zur Konstruktion des Deletionsfragments benutzt wurden.


```

1  GCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT
   Teil von P1 von pKD4 ← FRT
61  AAGGAGGATATTCATATGCGTACGCGGACAAGGATATCTTTTTGAATTGCGCTAATGAAT
   Komplementär zum Zielgen (Überlappung) und zum angrenzenden Gen
121 AAATTTGCTCGCCATTTTCTGCCGCTGTGCGCT 152

```

Abbildung 14: Sequenzierungsergebnis von 14028 Δ phoP

Deutlich ist in Abbildung 14 die in der Fremdsequenz liegende FRT-Stelle zu sehen. Es wurde nur ein Teil des Homologs zur priming-site p1 auf pKD4 ansequenziert, daher ergibt sich unter Einbeziehung der fehlenden Sequenz die oben angeführte Länge der Fremdsequenz von 84 bp.

```

1  GCGCCGGCTGGCTCAGCGCCGTTTTCATATGAATATCCTCTTTAGTTCCTATTCCGAAGT
   Komplementär zum Zielgen (Überlappung) → FRT-Sequenz
61  TCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACCGCTTCCAGCT
   FRT-Sequenz →
121 TGTCCATTTTCCCCCGCCAATTATCCCATTATCAGAACAGTCTAACCCGTCTTCGGCG
   Komplementär zum Zielgen (Überlappung) und zum angrenzenden Gen
181 TCTTATCGAACGCAGATCCCTGACGTAATCTCTATCTACAGGTGAATCAACACAGAGAGG
241 CGCAAATGAAACAATCCAATAATCAGGTGGGTGAAAAAGTATTGGTGCTGGGCGCGGGA
300 CAACTGGGGGCGTCAG 316

```

Abbildung 15: Sequenzierungsergebnis von 14028 Δ STM1677

Deutlich ist in Abbildung 15 die in der Fremdsequenz liegende FRT-Stelle zu sehen. Diese Sequenz hat die oben angeführte Länge von 83 bp.

3.2.3 Alle Deletionsmutanten zeigen wildtypisches Wachstum im Vollmedium

Analog zu 3.1.2 wurde das Wachstum aller Deletionsmutanten in LB-Medium bei 37 °C untersucht, um einen eventuell vorhandenen Wachstumsdefekt, der die aufzunehmenden Zellkulturdaten verfälschen könnte, auszuschließen. Alle Stämme wurden im Spectra Classic (Tecan) Spektrometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Pro Stamm wurden vier unabhängige Messungen pro Zeitwert durchgeführt und deren arithmetischer Mittelwert gebildet.

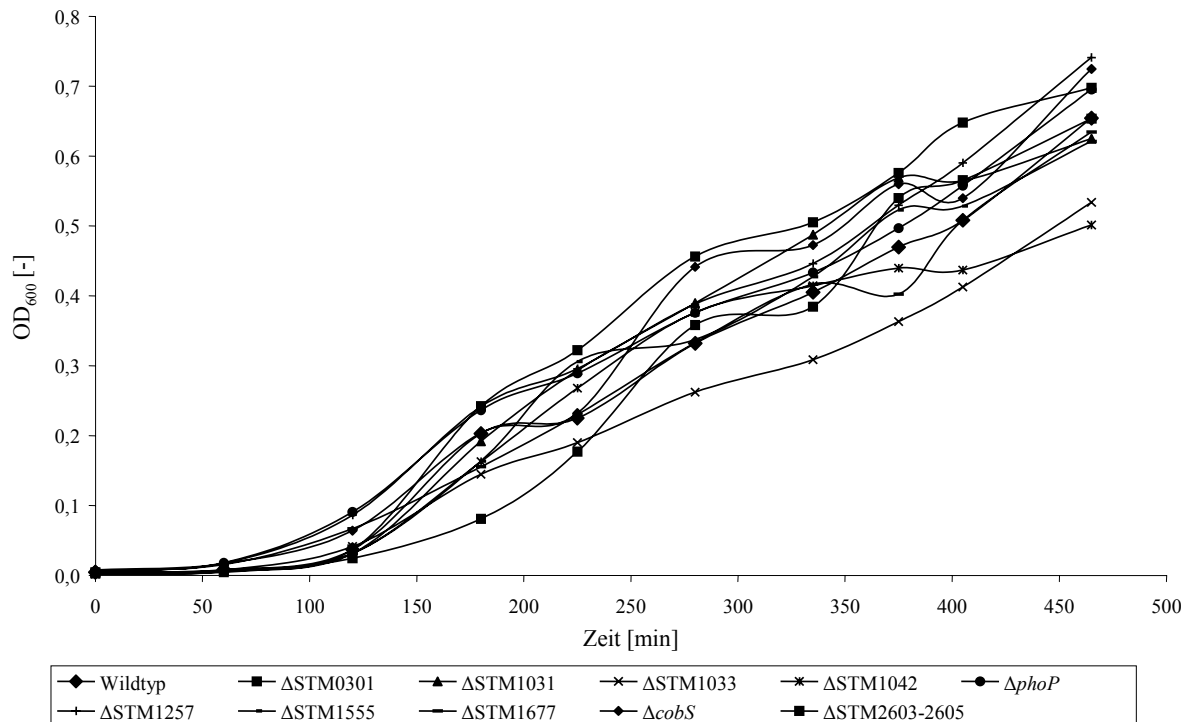


Abbildung 16: Wachstumscharakteristika der Deletionsmutanten im Vollmedium

Es ist kein signifikant von der Charakteristik des Wildtyps 1028 abweichendes Wachstum, wie es etwa bei der Mutante in STM1664 in Abbildung 10 zu sehen ist, in den zehn neu konstruierten Deletionsmutanten zu erkennen.

3.2.4 Die Deletionsmutanten sind in ihrer intrazellulären Überlebensfähigkeit eingeschränkt

Alle Deletionsmutanten wurden analog zu den Insertionsmutanten in der Zellkultur zur Infektion gebracht. Es wurde das in 2.10.1.2 beschriebene Verfahren zur Bakterienanzucht verwendet. Als Positivkontrolle wurde in jedem Assay der Wildtypstamm 14028 mitgeführt, als Negativkontrolle die beschriebene Deletionsmutante in *phoP*. Die Diskrepanz zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle lag bei einer etwa zehnfachen Reduktion der intrazellulären Replikation ($9,5 \pm 8,8$ %, aus 13 unabhängigen Experimenten ermittelt). Zeigte eine Versuchsreihe starke Abweichungen von diesem Sachverhalt, so wurde die betreffende Mutante erneut zur Infektion gebracht. Durch Normierung der Zellzahl auf den Prozentsatz des Wildtypwerts nach sieben Stunden Infektion konnten verschiedene Assays miteinander verglichen werden. Insgesamt liegen zu allen Deletionsmutanten Daten aus mindestens vier unabhängigen Experimenten vor.

Tabelle 11: Intrazelluläres Überleben der Deletionsmutanten

Die erste Spalte gibt den Ort der Deletion an, die zweite Spalte den Gennamen, falls bekannt. In der dritten Spalte ist das intrazelluläre Überleben der betreffenden Mutante prozentual bezogen auf die Wildtypkontrolle im jeweiligen Versuch angegeben, in der vierten Spalte die Standardabweichung der Zusammenführung der Einzelexperimente pro Deletionsmutante.

Deletionsort	Gename	Intrazelluläre Überlebensrate in Prozent des wt	Standardabweichung der Zusammenführung
Δ STM0301	<i>safC</i>	94,0	35,6
Δ STM1031	-	6,3	2,2
Δ STM1033	-	6,2	1,3
Δ STM1042	-	59,1	11,3
Δ STM1231	<i>phoP</i>	9,5	8,8
Δ STM1257	-	3,8	1,5
Δ STM1555	-	35,1	8,7
Δ STM1677	-	19,2	5,8
Δ STM2017	<i>cobS</i>	63,8	12,5
Δ STM2603-2605	-	30,1	3,4

Mit Ausnahme einer Mutante konnte in allen Fällen das Ergebnis der Zellkulturuntersuchungen der Deletionsmutanten bestätigen, dass die mutagenisierten Gene für den bei der Insertionsmutagenese beobachteten Phänotyp verantwortlich sind. Die Replikationsrate von *safC* konnte, vermutlich wegen eines polaren Effekts auf *safD*, die Attenuation der Insertionsmutante nicht bestätigen. Die Diskrepanz zwischen den Attenuationsdaten für Insertionsmutante und Deletionsmutante bei STM1042 und *cobS* kann durch einen polaren Effekt der Insertion auf das benachbarte Gen (STM1041 bzw. *cobT*) zustande kommen. Ein Unterschied zwischen den Daten des Insertionsmutantenassays und des Deletionsmutantenassays ist außerdem durch die generelle Variabilität der beiden Untersuchungsansätze bedingt.

Die statistische Auswertung dieser Daten mittels des Student-t-Test bestätigte für alle erzeugten Deletionsmutanten außer 14028Δ *safC* ein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert von $\leq 0,042$, das heißt die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 4,2 %.

3.3 Funktionale Charakterisierung potenzieller neuer Virulenzfaktoren

3.3.1 Das *cob-cbi-pdu*-Gencluster ist maßgeblich an der intrazellulären Überlebensfähigkeit von *Salmonella* beteiligt

Drei Vektorinsertionen wurden im *Screen* auf einen intrazellulären Replikationsdefekt im Bereich des *cob-cbi-pdu*-Genclusters gefunden. Dessen Gene kodieren für die Cobalaminsynthese sowie den cobalaminabhängigen Abbau von Propandiol. Beinahe ein Prozent des Genoms von *S. typhimurium* ist der Synthese und Aufnahme von Cobalamin (Vitamin B₁₂) gewidmet. Ein weiteres Prozent des Genoms kodiert für Proteine, die an Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind, in denen Cobalamin als Kofaktor benötigt wird [199]. Diese große Investition in den Stoffwechsel eines Kofaktors soll im Folgenden kurz beleuchtet werden.

Das *cob-cbi-pdu*-Gencluster kodiert Gene der Cobalaminsynthese (*cob-cbi*) und Gene, die der Bakterienzelle erlauben, Propandiol (*pdu*) als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen zu nutzen [199-201]. Die Gene für die Cobalaminbiosynthese sind mit den Genen für den Abbau von Propandiol koreguliert. Beide Operons werden von Propandiol über das Positivregulatorprotein PcoR induziert [200, 202, 203]. Dieser Sachverhalt basiert auf der Tatsache, dass Adenosyl-Cobalamin (Ado-B₁₂), die metabolisch aktive Form des Vitamin B₁₂, ein Kofaktor für das erste Enzym im Propandiol-Abbau ist [204, 205]. Da 1,2-Propandiol durch Fermentation gängiger Pflanzenzucker wie Rhamnose und Fukose gebildet wird, mag ein Katabolismus dieses Produkts einen Selektionsvorteil im anaeroben Milieu bedeuten [206-208]. Der vorgeschlagene Stoffwechselweg erzeugt ein Molekül ATP, eine Elektronensenke und ein 3-Kohlenstoff-Intermediat (Propionyl-CoA), das über den Methyl-Citrat-Weg in den zentralen Metabolismus eingebracht wird [208-210].

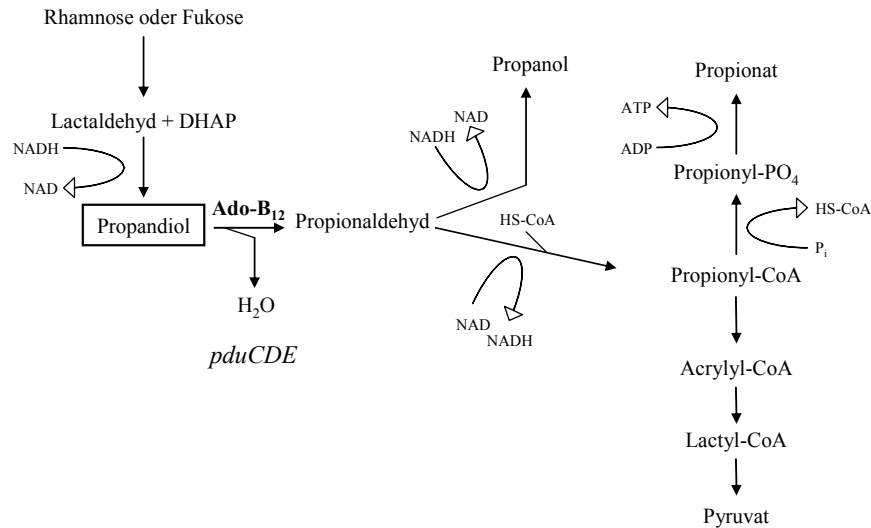


Abbildung 17: Stoffwechselweg des Propandiols

Ado-B₁₂: Adenosyl-Cobalamin. Modifiziert nach [210]

Das Genprodukt von *pocR* (STM2036) ist der Hauptregulator des cobalaminabhängigen Propandiolstoffwechsels in den meisten Salmonellen. Er reguliert dabei als DNA-bindendes Protein sowohl die Gene der *cob*- und *cbi*-Operons als auch alle Gene des *pdu*-Operons [200]. Zwei globale Regulatoren Crp/Cya und ArcA/ArcB beeinflussen wiederum die Induzierbarkeit von *pocR*, der *cob*- und *pdu*-Gene [203, 211, 212]. Auch CsrA, ein Regulator für Invasionsgene in *S. typhimurium*, reguliert, neben den Genen des SPI-1, Gene, die vom Typ-III-Sekretionssystem des SPI-1 in die Wirtszelle transloziert werden, und dem Flagellensynthese-Operon *flg* und *fli*, auch die Gene des *pdu-cob*-Regulons und des *eut*(Ethanolamin-Katabolismus)-Operons [213].

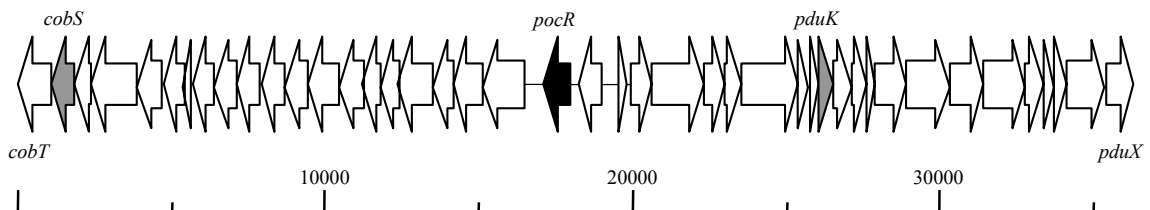


Abbildung 18: Struktur der von *pocR* regulierten Operons

Das gesamte Regulon umfasst 36,3 kb im Chromosom von *S. typhimurium*. Downstream von *pocR* sind die *cob*- und *cbi*-Gene des Cobalaminbaus lokalisiert, upstream von *pocR* die *pdu*-Gene des Propandiolabbaus. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte oder erstellte Mutanten sind grau bzw. schwarz hinterlegt, die endständigen Gene sind mit Namen angegeben. Die Skala am unteren Rand zeigt die Länge der Region in Basenpaaren.

Das *pdu*-Operon und das *cob*-Operon wurden wahrscheinlich durch einen einzelnen horizontalen Gentransfer erworben. Anscheinend wurden die Gene im gemeinsamen

Vorfahren von *E. coli* und *Salmonella* ssp. verloren und später als zusammenhängendes Fragment wieder in die Salmonellenlinie eingeführt [214, 215].

Die drei Vektorinsertionen in diesem Gencluster zeigen eine Attenuation im intrazellulären Überleben (*cobS* (12,6±7,4 % und 18,9±0,8 %) und *pduK* (26,4±1,5 %)). Da sich aus der Mutagenese dieser drei Gene kein klares Bild von der Rolle des Genclusters bei der intrazellulären Replikation ergab, sollte das Hauptregulatorgen *pocR* ebenfalls inaktiviert werden. Mittels IDM (siehe 2.6) wurde die Mutante 14028*pocR*(385)::pIDM4 erzeugt. Zur Generierung des Insertionsfragments (Insert) wurden die Primer *pocR.F1* und *pocR.R1* in der PCR-Reaktion verwendet. Die PCR erzeugt artifizielle *Bgl*III-Schnittstellen an beiden Enden des Amplifikats. Über diese wurde das Insert in den mit *Bgl*III linearisierten Vektor pIDM4 ligiert und der entstandene rekombinante Vektor nach Amplifikation in *E. coli* EC101 chromosomal in *S. typhimurium* integriert.

Die so erzeugte Mutante wurde, nach Ausschluss eines Wachstumsdefekts, analog zur Validierung der bereits bestehenden Insertionsmutanten (siehe 3.1.2) im Zellkulturassay untersucht. Sie stellte sich im Vergleich zur Wildtypkontrolle *phoN* als 8,3fach (12,0±6,7 %, Daten aus sechs Einzelversuchen) in der intrazellulären Überlebensfähigkeit attenuiert dar.

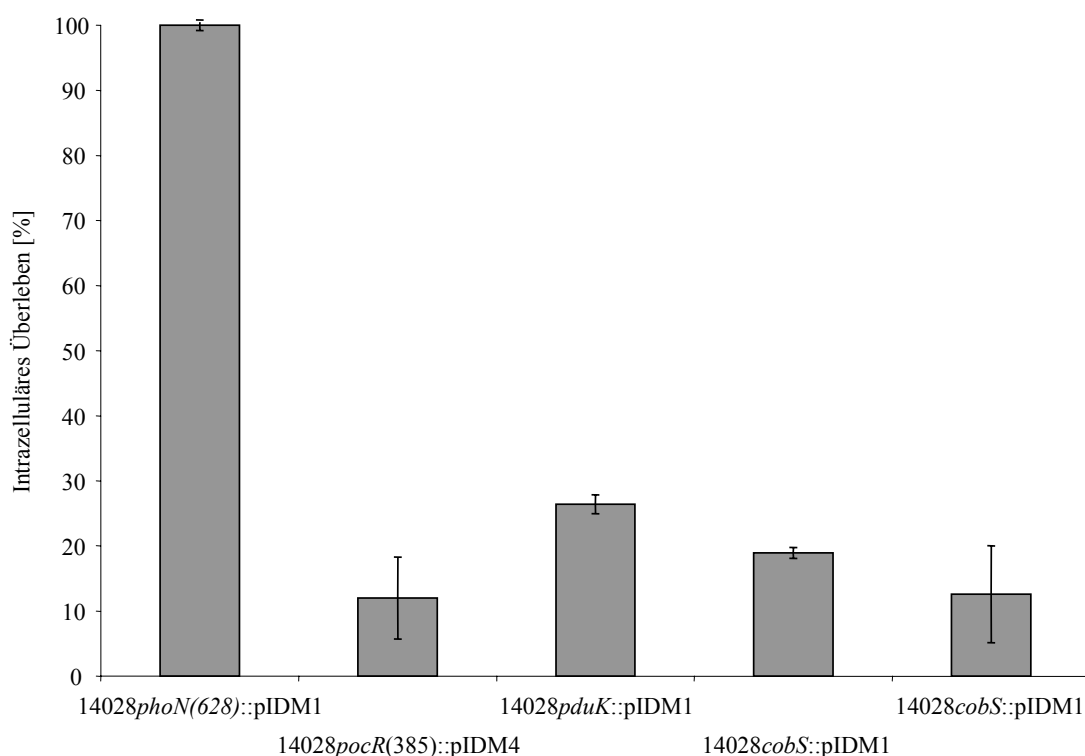


Abbildung 19: Intrazelluläres Überleben von 14028*pocR*(385)::pIDM4

Dargestellt ist der Prozentsatz intrazelluläres Überleben der Mutante von *pocR* (14028*pocR*(385)::pIDM4) verglichen mit dem Prozentsatz von überlebenden Bakterien der Insertionsmutanten in *pduK* und *cobS* und der wildtypischen Positivkontrolle *phoN*. Die Grafik repräsentiert Daten aus sechs (14028*pocR*(385)::pIDM4) bzw. vier unabhängigen Einzelexperimenten.

3.3.2 Drei neu konstruierte Insertionsmutanten in GEI1528/1562 sind attenuiert

Eine ähnliche Strategie wie bei der Untersuchung des *cob-cbi-pdu*-Genclusters wurde auch für die Genominsel GEI1528/1562 angewandt. Für die 35 Gene dieser Insel sind lediglich putative Genfunktionen verfügbar und die meisten dieser Gene scheinen in bislang unbekannte Stoffwechselwege von *S. typhimurium* involviert zu sein.

Die *in silico*-Annotation führte zur Identifikation von 14 putativen Transkriptionseinheiten. Sieben Insertionsmutanten in sechs unabhängigen Operons wurden im *Screen* auf attenuierte Mutanten identifiziert. Um die Relevanz dieser genomischen Insel weiterzuanalysieren, wurden zielgerichtete Mutationen in den Genen STM1540, STM1554 und STM1558 konstruiert. Diese Mutationen unterbrechen die Transkription jeweils mindestens eines Gens zweier bislang nicht mutagenisierter Operons der Insel (STM 1540 und STM1554) sowie des endständigen Gens (STM1558) eines putativen Operons. Dazu wurde das in 2.6 beschriebene Verfahren zur IDM benutzt. Das Insert wurde mit den Primerpaaren 1540ins.5prime und 1540ins.3prime für STM1540, 1554ins.5prime und 1554ins.3prime für STM1554, 1558ins5.prime und 1558ins.3prime für STM1558 in PCR-Reaktionen hergestellt. Dabei erzeugte der Primer eine artifizielle *Bg/III*-Erkennungsstelle an beiden Enden des Amplifikats, über die im Anschluss das Insert in den mit *Bg/III* linearisierten Vektor pIDM4 ligiert wurde. Die erfolgte Ligation wurde durch PCR, mit einem der auch zur Fragmenterzeugung benutzten Primerpaare, sowie einem vektorständigen Primer bestätigt. Die erfolgreiche Integration des rekombinanten Vektors in das Chromosom von *S. typhimurium* konnte durch die bei 37 °C Inkubationstemperatur ausgebildete Tetracyclinresistenz nachgewiesen werden. Diese drei Mutanten wurden im Zellkulturmodell wie in 2.10 beschrieben auf ihre intrazelluläre Replikationsfähigkeit untersucht. Dabei wurde ein Ansatz aus Flüssigkultur (vgl. 2.10.1.1) verwendet.

Tabelle 12: Intrazelluläres Überleben neu konstruierter Mutanten in GEI1528/1562

Jede Datenreihe repräsentiert den Mittelwert aus vier unabhängigen Einzelversuchen. Die Standardabweichung der Zusammenführung der vier Einzelmessungen ist in der dritten Spalte angegeben.

Stammbezeichnung	Prozent intrazelluläres Überleben verglichen mit <i>phoN</i> -Kontrolle	Standardabweichung der Einzelmessungen
14028STM1540(687)::pIDM4	29,5	13,6
14028STM1554(743)::pIDM4	35,4	14,0
14028STM1558(879)::pIDM4	44,0	16,8

Es zeigt sich also eine 3,4fache, 2,8fache bzw. 2,3fache Erniedrigung der Replikationsrate im Vergleich zur Wildtypkontrolle (*phoN*), was darauf hinweist, dass mindestens neun der Transkriptionseinheiten von GEI1528/1562 signifikant zum intrazellulären Replikationsverhalten von *S. typhimurium* beitragen. Eine Charakterisierung des *in vitro*-Wachstums, analog zu 3.1.2, zeigte keine Wachstumsdefizienz bei diesen drei Mutantensstämmen.

3.3.3 Zehn Mutanten haben eine mit 14028*phoP*(593)::pIDM vergleichbare intrazelluläre Überlebensrate

Interessanterweise zeigen zehn der untersuchten Insertionsmutanten eine intrazelluläre Überlebensrate ($\leq 13,1\%$), die ähnlich oder geringer als die des Negativ-Kontrollstamms 14028*phoP*(593)::pIDM1 ist ($10,3\pm 2,3\%$). Unter diesen stark attenuierenden Mutationen befinden sich Insertionen in drei Genen des Gifsy-2 Prophagen, in STM1677, welches einen putativen Transkriptionsregulator kodiert, in zwei Genen des *cob-cbi-pdu*-Genclusters, in einer putativen Integrase und in drei Genen des Gifsy-1 Prophagen. Eines dieser Gene (*gipA*) wurde bereits als die Virulenz von *S. typhimurium* beeinflussend beschrieben [216].

Tabelle 13: Insertionsmutanten mit Überlebensfähigkeit auf dem Niveau von 14028*phoP*(593)::pIDM

Inseriertes Gen	Prozent intrazelluläres Überleben
STM0716	7,8±6,4
STM1033	13,1±4,3
STM1041	13,1±2,9
STM1042	11,3±6,7
STM1677	3,5±1,8
STM2017 (<i>cobS</i>)	12,6±7,4
STM2036 (<i>pocR</i>)	12,0±6,7
STM2589	7,4±1,6
STM2599 (<i>gipA</i>)	8,8±1,5
STM2633	4,0±1,3

Die Insertionsmutanten in STM1255, STM1256 und STM1257 zeigen zwar einen Attenuationsgrad von weniger als 5 %, werden aber nicht zu den hier aufgeführten zehn Genen gerechnet, da anscheinend ein Adhäsionsdefekt vorliegt. Diese Mutanten werden in den nachfolgenden Kapiteln explizit vorgestellt.

3.3.4 Starker Adhäsionsdefekt in einer Mutante eines putativen ABC-Transportsystems

Die Gendeletion in STM1257 (14028 Δ STM1257) zeigt eine sehr starke intrazelluläre Attenuation, verglichen mit anderen Stämmen von $3,8 \pm 1,5$ % bezogen auf die Positivkontrolle im Experiment. Die Insertionsmutanten im selben Gen sowie in den beiden *upstream* davon gelegenen Genen (STM1256 und STM1255) zeigen ebenfalls hohe Attenuationswerte von $0,6 \pm 0,4$ %, $4,7 \pm 1,4$ % und $1,9 \pm 0,5$ % des Wildtypwerts.

Die Region von Gen STM1255 bis STM1259 umfasst 4785 Basenpaare, liegt in der genomischen Insel GEI1239/1269 und hat aufgrund der Anordnung der Promotoren und Terminatoren in dieser genetischen Insel wahrscheinlich eine Operonstruktur. Die Gene des Operons scheinen für Komponenten eines putativen ABC(*ATP-binding cassette*)-Transportsystems zu kodieren [93]. Dabei handelt es sich um Transportsysteme, in denen der Energiegewinn durch ATP-Hydrolyse an die Aufnahme oder den Efflux von löslichen Substraten durch die Zellmembran gekoppelt ist [217]. Solche Transportsysteme bestehen aus vier Proteindomänen oder Untereinheiten: Zwei hydrophobe, membrandurchspannende Domänen und zwei hydrophile Nukleotid-Bindedomänen, die an der Zytoplasmamembran interagieren und die Energie für den Transport bereitstellen. Viele bakterielle ABC-Transportsysteme nutzen außerdem ein hochaffines Substratbindeprotein, das bei Gram-negativen Bakterien im Periplasma lokalisiert und entweder an die Zelloberfläche oder an den Transporter angebunden ist. Die Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter nehmen eine Vielzahl von Substraten, wie Nährstoffe, Zucker, Aminosäuren, kleine Peptide, Anionen, Metallchelatoren (Siderophore) und Vitamin B₁₂ auf [217, 218]. Diese Systeme scheinen unter Bakterien weit verbreitet zu sein. Alleine in *E. coli* konnten bislang etwa 80 ABC-Transportsysteme identifiziert werden [217, 219].

Die Annotation der Gene des putativen Operons [93] benennt folgende putative Funktionen, die genau den fünf Proteindomänen eines solchen Transportsystems entsprechen:

Tabelle 14: Genannotation Operon STM1255-STM1259

Genname	Funktionsbeschreibung
STM1255	Putativer ABC-Transporter, periplasmatisches Bindepotein
STM1256	Putativer ABC-Transporter
STM1257	Putativer ABC-Transporter
STM1258	Putative ATPase-Komponente eines ABC-Transportsystems, enthält duplizierte ATPase-Domäne
STM1259	Putative ATPase-Komponente eines ABC-Transportsystems, enthält duplizierte ATPase-Domäne

Die wahrscheinliche Lokalisation des Genprodukts innerhalb der Bakterienzelle wird mit „innere Membran“ für STM1255 mit STM1257 angegeben; STM1258 und STM1259 scheinen im Zytoplasma lokalisiert zu sein (bestehender Abgleich [93] mit der Datenbank PSORT [220]). Für einen Teil von STM1255 sowie die Gene STM1256 und STM1257 konnte mittels *blastp* [221] eine 73%ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit Proteinen der Organismen *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* gefunden werden (e-Wert = 0,0). Für die Übereinstimmung mit STM1255, dem putativen periplasmatischen Bindeprotein, wird bei *Y. pseudotuberculosis* die Funktion „periplasmatisch, Nickel/Oligopeptid bindendes Protein“ angegeben. Weiterhin konnte eine 97-99%ige Übereinstimmung mit Proteinen von *S. choleraesuis*, *S. typhi* und *S. paratyphi* gefunden werden (e-Wert = 0,0). Eine Suche mit *NCBI Conserved Domain Search* [222] erbrachte 24 signifikante Proteindomänen (e-Wert $\leq 10^{-14}$), die allesamt als ABC-Transporter annotiert waren. Bei zehn der gefundenen Domänen wurde „Dipeptid/Oligopeptid/Nickel-Transporter“ als putative Funktion angegeben, bei jeweils dreien „Zuckertransportsystem“ und „Transportsystem für antimikrobielle Peptide“.

Die Funktionszuweisung des GSC [93] wurde mittels Abfrage der Datenbank Interpro [185, 186] überprüft. Dabei wurden Proteindomänen identifiziert, die Hinweise auf die Funktion der Gene des Operons geben.

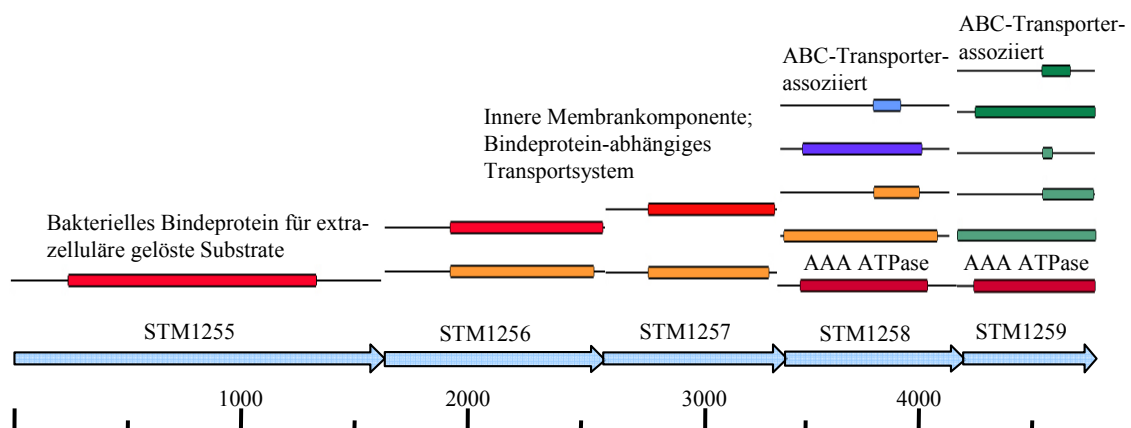


Abbildung 20: Proteindomänen im Operon STM1255-STM1259

Gezeigt sind identifizierte Proteindomänen, der Teilbereich des Gens, der für diese Domäne kodiert, sowie der Typ der Proteindomäne. Die Skala am unteren Rand gibt die Länge der Region in Basenpaaren an. Quelle: InterproScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>)

Deutlich in Abbildung 20 zu sehen ist die durch Interpro-Abfrage bestätigte putative Funktionszuweisung der Genomannotation [93]. Eine Abfrage der Datenbank TransportDB [223, 224] erbrachte auf Basis von Sequenzvergleichen als wahrscheinlich ermitteltes Substrat

des Transportsystems Dipeptide. Für die Genprodukte von STM1256 und STM1257 konnten durch das Vorhersageprogramm TMHMM [225, 226] jeweils vier Transmembrandomänen vorhergesagt werden, für das Genprodukt von STM1255 eine Transmembrandomäne [227]. Da bei den drei Insertionsmutanten in STM1255, STM1256 und STM1257 sowie bei der Deletionsmutante von STM1257 im Zellkultorexperiment der KbE-Wert eine Stunde nach Infektion im Vergleich zur Wildtypkontrolle deutlich erniedrigt war, wurde zur Abklärung eines eventuellen Adhäsionsdefekts der Deletionsmutante der in 2.10.3 beschriebene Ansatz für Infektionsexperimente folgendermaßen modifiziert: Statt einer Inkubationszeit von einer bzw. sieben Stunden nach 30 Minuten Infektionszeit wurde diese auf insgesamt 35 Minuten ohne Zentrifugation verkürzt, um den Bakterien das Anheften an die Wirtszelle zu gestatten, ein Eindringen in selbige aber nicht zu begünstigen. Dabei konnten sich bei Mutante 14028 Δ STM1257 im Vergleich zum Wildtyp $7,6 \pm 0,3$ % der Bakterien an die Wirtszelle anheften und überstanden die nachfolgenden Waschschrte mit PBS (Daten aus zwei unabhängigen Versuchen, jeweils im Dreifachansatz).

3.3.5 Die Transportermutante ist bei der Infektion extrazellulär lokalisiert

Um die Lokalisation der Deletionsmutante in Gen STM 1257 während der Infektion von eukaryotischen Zellen abzuklären, wurden Studien mit DAPI-angefärbten Bakterien durchgeführt (siehe 2.10.5). Fluoreszenzgefärbte Bakterien wurden während der Infektion von Makrophagen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, fotografiert und die Lokalisation der Deletionsmutanten von STM1257 mit der Lokalisation der wildtypischen Bakterien und der komplementierten Deletionsmutante (Beschreibung siehe 3.4) verglichen.

Zu bemerken ist die große Menge an adhärirten und intrazellulären Bakterien bei Infektion mit dem wildtypischen Stamm 14028-pBR322. 14028 Δ STM1257-pBR322 zeigt eine deutlich geringere Zahl an markierten Bakterien, die zudem alle extrazellulär adhärirt scheinen. Die Komplementation der Deletion von STM1257 zeigt wieder beinahe wildtypische Mengen an Bakterien. In diesem Versuch wurde kein Abstoppen der Infektion und Abtöten extrazellulärer Bakterien mit Gentamycin durchgeführt, sondern mehrfaches Waschen mit PBS gefolgt von einer Methanol-Eisessig- bzw. Formaldehyd-Fixierung mit mehreren Waschschrten (vgl. 2.10.5). Daher bleiben adhärirte, aber invasionsdefekte Bakterien an der eukaryotischen Zellmembran sichtbar, adhäsionsdefekte Bakterien werden jedoch abgewaschen. Intrazelluläre Bakterien sind von den Waschschrten nicht betroffen, werden aber ebenfalls fixiert.

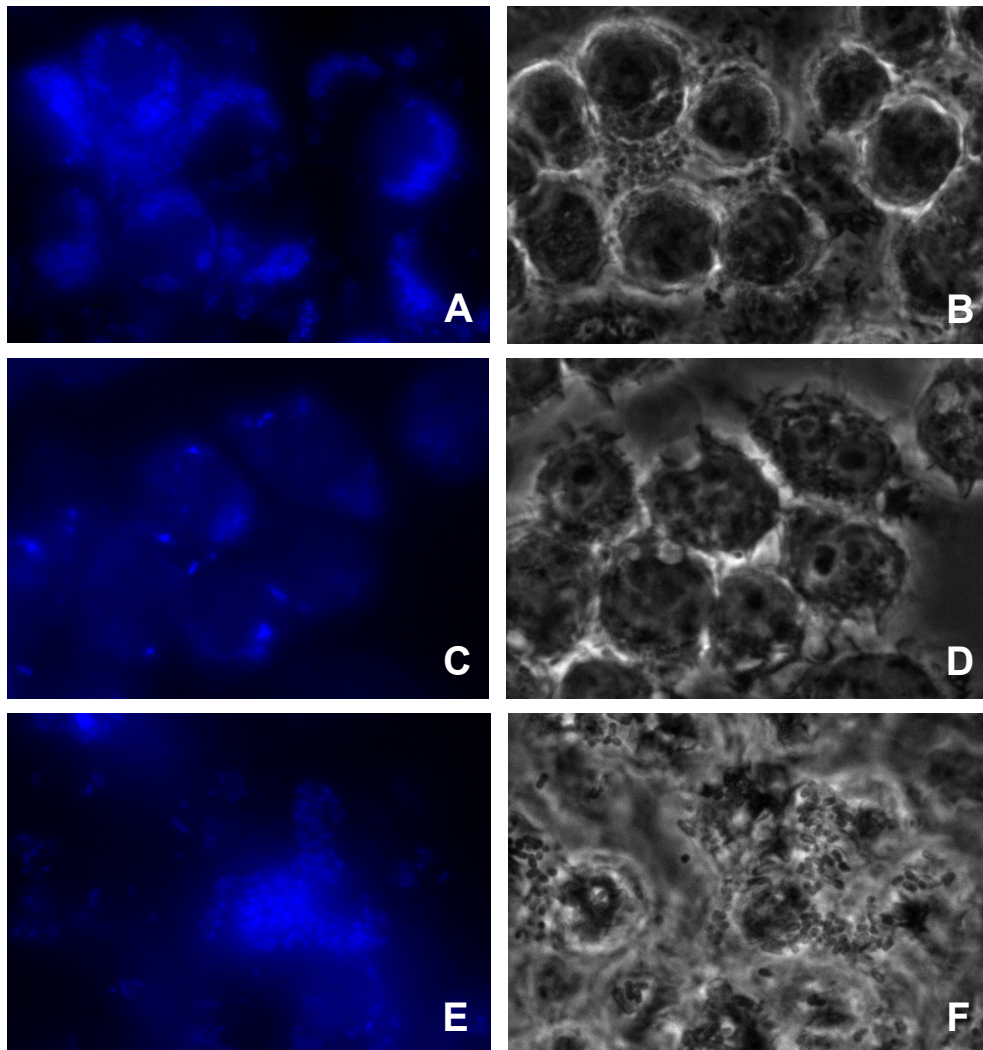


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien mit 14028ΔSTM1257

Infektionszeit: 35 Minuten ohne Zentrifugation. Es sind jeweils Fluoreszenzaufnahmen und Durchlichtaufnahmen infizierter Makrophagen mit jedem Stamm gegenübergestellt. A und B: 14028-pBR322 (Wildtypkontrolle). C und D: 14028ΔSTM1257-pBR322 (Deletionsmutante). E und F: 14028ΔSTM1257-pBR322::STM1257 (komplementierte Deletionsmutante). Alle Aufnahmen: 100fache Vergrößerung, Durchlicht oder bei 358 nm Wellenlänge angeregtes UV-Licht.

3.3.6 Der Promotor von STM1255 zeigt keine spezifische Induktion

Mit dem Konstrukt 14028-pDEW::P_{STM1255} wurden Induktionsstudien für den Promotor des Operons STM1255 mit STM1259 durchgeführt. In den Vektor pDEW201 war der intakte Promotor des ersten Gens des Operons, STM1255, vor die *lux*-Gene kloniert worden [168, 179]. Durch Anlegen verschiedener Einflussfaktoren bei verschiedenen Inkubationstemperaturen im definierten Minimalmedium sollte der Promotor auf die induzierende Bedingung hin untersucht werden. Es wurden folgende Faktoren untersucht (Medienzusammensetzung siehe Anhang 6.2):

Tabelle 15: Untersuchte Induktionsbedingungen Promotorstudien

CAA = Casein-Hydrolysat, ein Mix aus Aminosäuren, Di- und Polypeptiden.

Medium	Variabler Faktor	Temperatur
Vollmedium (LB)	Keiner	37 °C
Minimalmedium	Keiner	37 °C und 30 °C
Minimalmedium	pH-Wert = 4,5	37 °C und 30 °C
Minimalmedium	pH-Wert = 7,5	37 °C und 30 °C
Minimalmedium	pH-Wert = 8,5	37 °C und 30 °C
Minimalmedium	Keine Zugabe von Mg ²⁺	37 °C
Minimalmedium	Keine Zugabe von CAA	37 °C

Jeder der genannten Faktoren wurde für alle drei Stämme 14028, 14028-pDEW und 14028-pDEW::P_{STM1255} jeweils im achtfachen Ansatz untersucht. Durch keine der angelegten Bedingungen konnte eine signifikante Induktion der Expression des Promotors von STM1255 über einen Zeitraum von acht Stunden beobachtet werden. Die RLU-Werte erhöhten sich im Vollmedium bei allen untersuchten Stämmen von 30-40 RLU auf etwa 120-200 RLU nach acht Stunden. Im Minimalmedium trat eine Erhöhung von 60 RLU auf 150 RLU in den Kontrollstämmen und von 80 RLU auf 380 RLU in 14028-pDEW::P_{STM1255} auf, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung der Einzelversuche nicht signifikant war.

Dabei konnte jedoch ein Wachstumsoptimum der Bakterien in Minimalmedium bei einem pH-Wert von 8,5 bei 30 °C und 37 °C Inkubationstemperatur gezeigt werden. Eine geringe, jedoch nicht signifikante Erhöhung der RLU konnte bei dieser Bedingung ebenfalls gefunden werden. Zusätzlich wurde die Untersuchung der Induktionsstärke des Promotorkonstrukts während der Infektion von J-774A.1-Zellen für die Dauer von insgesamt neun Stunden vorgenommen. Die eukaryotischen Zellen wurden dazu im 96-Well-Format mit Bakterien aus Flüssigkultur und einer MOI von 10 infiziert und nach dem Protokoll aus 2.10 behandelt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte im Abstand von 30 Minuten bzw. einer Stunde.

In Abbildung 22 ist anhand des Kurvenverlaufs und der Fehlerbalken pro Messpunkt zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Lumineszenz der Kontrolle 14028-pDEW und des zu untersuchenden Stamms 14028-pDEW::P_{STM1257} gibt. Es erfolgt also keine Expression der Luziferasegene über das Hintergrundniveau von 14028-pDEW hinaus.

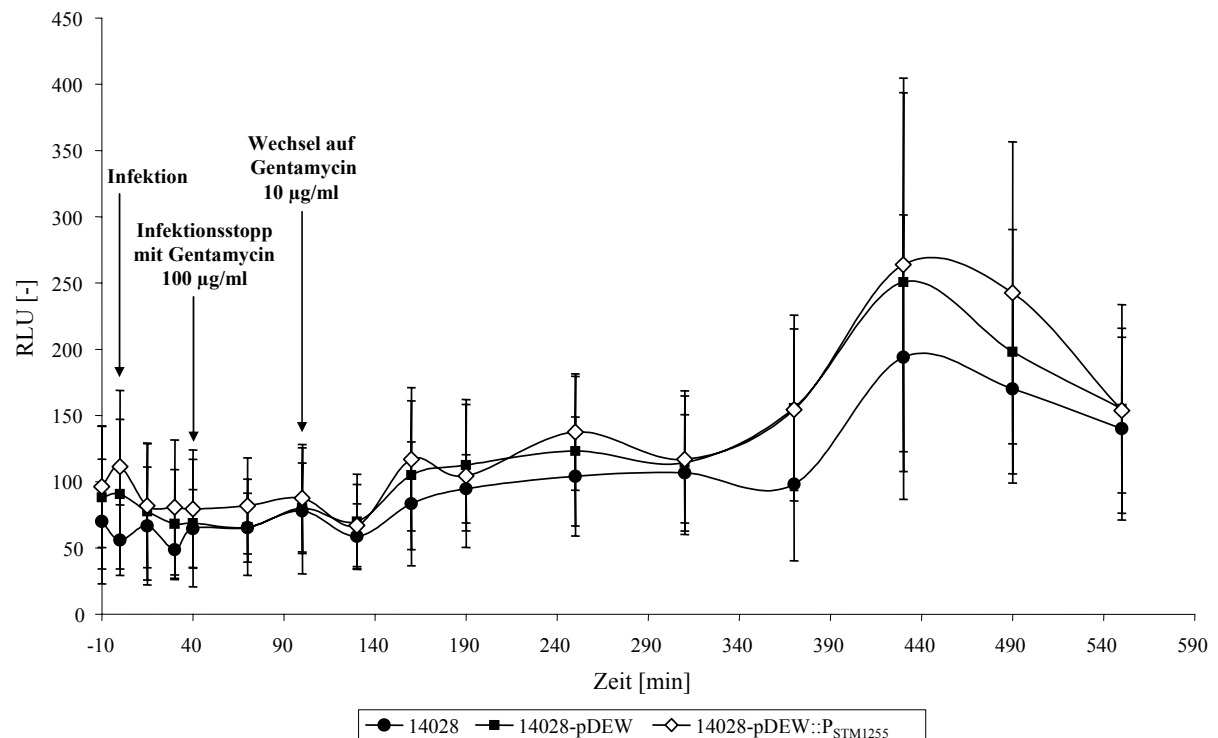


Abbildung 22: Promotorinduktion von STM1255 während der *in vitro*-Infektion

3.4 In ausgewählten Mutanten konnte die Virulenz durch Komplementation wiederhergestellt werden

Bei der Genkomplementation handelt es sich um ein Verfahren, in dem ein einzelnes im Chromosom ausgeschaltetes Gen durch Einbringen desselben Gens *in trans* in seiner Funktion ersetzt werden soll. Ist dies erfolgreich, dann kann ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen Genotyp (hier: ausgeschaltetes Gen) und beobachtetem Phänotyp angenommen werden.

3.4.1 Erzeugung der Komplementationsklone

In zwei Deletionsmutanten (14028 Δ STM1257 und 14028 Δ STM1555) sollte mit je einem rekombinanten Plasmid, ausgehend vom Vektor pBR322 [169], die Mutation komplementiert werden.

Mittels PCR und den Primerpaaren C1257.fw und C1257.re, sowie 1555Komp.F und 1555Komp.R wurde jeweils das betreffende Gen, wie in 2.8 beschrieben, amplifiziert und Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme an die Enden der Amplifikate angehängt. Nach Aufreinigung und Spaltung mit dem für die erzeugte Erkennungssequenz am Ende des Amplifikats spezifischen Restriktionsenzym und erneuter Reinigung wurde das Amplifikat mit dem ebenfalls gespaltenen und gereinigten Vektor pBR322 ligiert. Anschließend wurde

das Konstrukt, nach einer Amplifikation in *E. coli* DH5 α bzw. XL-1 blue, in *S. typhimurium* transformiert. Die Länge des Inserts betrug 4018 bp (STM1257) bzw. 1302 bp (STM1555). Durch Restriktion mit Restriktionsendonukleasen, die eine charakteristische Fragmentlänge hinterlassen, bzw. durch Kolonie-PCR mit je einem fragment- und einem vektorständigen Primer konnten alle Konstrukte bestätigt werden.

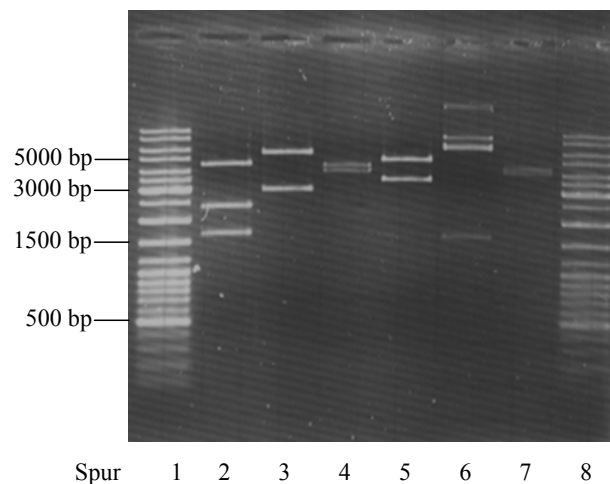


Abbildung 23: Bestätigung der Klonierung von pBR322::STM1257

Gezeigt ist die mit sechs verschiedenen Restriktionsenzymen verdaute DNA des rekombinanten Plasmids pBR322::STM1257 (Gesamtlänge: 8381 bp). Spur 1 und 8: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas). Spur 2: Verdau mit *NdeI*. Spur 3: Verdau mit *ClaI*. Spur 4: Verdau mit *ScaI*. Spur 5: Verdau mit *VspI*. Spur 6: Verdau mit *PvuI*. Spur 7: Verdau mit *EcoRI* (Klonierungsenzym).

In Abbildung 23 ist exemplarisch die Bestätigung der Klonierung des Genfragments vom STM1257 inklusive des Promotors des Operons, der *upstream* von STM1255 liegt, in den Vektor pBR322 zu sehen. Erwartet und erzielt wurden folgende Fragmentlängen im Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen:

Tabelle 16: Bestätigung der Genkomplementation- Fragmentlängen im Restriktionsverdau

Verwendetes Enzym	Erwartete Genfragmente
<i>NdeI</i>	4394 bp, 2340 bp, 1647 bp
<i>ClaI</i>	5348 bp, 2921 bp, 112 bp
<i>ScaI</i>	4386 bp, 3995 bp
<i>VspI</i>	4902 bp, 3479 bp
<i>PvuI</i>	6747 bp, 1634 bp
<i>EcoRI</i>	4363 bp, 4018 bp

Die Aufnahme des gefärbten Agarosegels (Abbildung 23) zeigt die erwarteten Fragmentlängen, mit Ausnahme von Spur 6 (*PvuI*). Hier scheint ein unspezifisches Schneiden eingetreten zu sein, so dass zusätzlich zu den beiden erwarteten Banden noch zwei weitere

Banden sichtbar sind. Die Doppelbanden in Spur 4 und 7 werden durch zwei sehr nahe beieinander liegende Fragmente im Gel erzeugt.

3.4.2 Vektor pBR322 ist ohne Selektionsdruck stabil

Um mit Mutanten, die durch den Vektor pBR322 komplementiert wurden, zuverlässig Versuche durchführen zu können, wurde der Vektor auf seine Stabilität im Flüssigmedium untersucht. Dazu wurde LB-Medium ohne Antibiotikazusatz mit 14028 Δ STM1257-pBR322::STM1257 inokuliert und für sieben Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend parallel auf LB-Agarplatten mit und ohne Ampicillin aufgefangan und bei 37 °C inkubiert. Folgendes Ergebnis konnte erzielt werden:

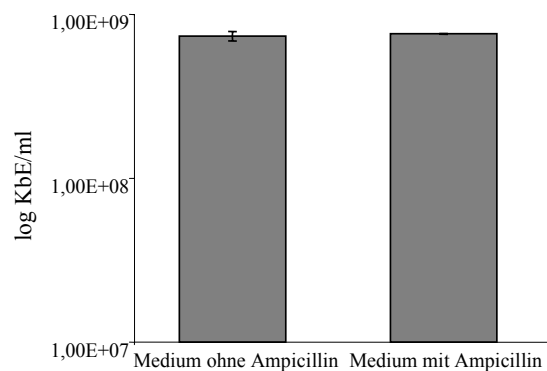


Abbildung 24: Stabilität von Vektor pBR322 in Flüssigkultur

Aufgetragen ist der Logarithmus der KbE pro Milliliter für die Kultivierung mit und ohne Selektionsdruck. Jeder Balken des Diagramms stellt eine Zusammenführung aus sechs unabhängigen Einzelexperimenten dar.

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen der Zahl der ampicillinsensitiven und der ampicillinresistenten Bakterien festgestellt werden. Folglich lässt sich schließen, dass pBR322 über einen Zeitraum von mindestens sieben Stunden unter idealen Wachstumsbedingungen stabil in der Bakterienzelle verbleibt. Der Vektor ist also hinreichend stabil, um Zellkulturversuche mit der Mutante 14028 Δ STM1257-pBR322::STM1257 durchführen zu können. Die Stabilität von pBR322 in Kulturmedium wurde auch von Abromaitis et al. gezeigt und stützt diese Feststellung [196].

3.4.3 80%ige Wiederherstellung der Virulenz in STM1257

Da bei Mutante 14028 Δ STM1257 anscheinend ein Adhäsionsdefekt vorliegt (siehe 3.3.4), wurden alle Zellkulturversuche zur Komplementation mit dem dort beschriebenen, auf 35 Minuten Inkubationszeit modifizierten Versuchsansatz durchgeführt. Da kürzlich gezeigt wurde, dass die Tetracyclin-Resistenzkassette eines in der Bakterienzelle vorhandenen

Klonierungsvektors Einfluss auf die intrazelluläre Replikation nehmen kann [196] und in den bisherigen Experimenten in vorliegender Arbeit ebenfalls eine leichte Diskrepanz zwischen resistenten und sensitiven Stämmen in Zellkulturexperimenten festgestellt wurde (siehe 3.1.3), wurden als Kontrollen wildtypische Salmonellen mit dem Plasmid pBR322 (Positivkontrolle) sowie 14028 Δ STM1257, ebenfalls mit pBR322 (Negativkontrolle) benutzt. Es zeigte sich, dass sich im Vergleich zur Positivkontrolle 14028-pBR322 (100 %) nur $18,0 \pm 3,0$ % der Deletionsmutanten 14028 Δ STM1257-pBR322 an die Wirtszellen anheften konnten. Durch Komplementation der Gendeletion konnte dieser Wert in der Mutante 14028 Δ STM1257-pBR322::STM1257 auf $80,4 \pm 9,2$ % des Wildtypniveaus angehoben werden (Daten aus sechs (14028-pBR322) bzw. neun unabhängigen Versuchen). Der gegenüber der unbehandelten Deletionsmutante erhöhte Anheftungswert des Stamms 14028 Δ STM1257-pBR322 lässt sich wahrscheinlich auf einen bereits erwähnten unspezifischen Effekt des 4363 bp großen Plasmids pBR322 zurückzuführen.

3.4.4 67%ige Wiederherstellung der Virulenz in 14028 Δ STM1555

Analog zur Komplementation von 14028 Δ STM1257, wurden auch bei den Experimenten zur Komplementation von 14028 Δ STM1555 sowohl der wildtypische Stamm 14208 mit dem Vektor pBR322 als auch die Deletionsmutante mit pBR322 mitgeführt. Folgende Ergebnisse konnten im Infektionsassay mit sieben Stunden Infektionsdauer erzielt werden: Im Vergleich zum wildtypischen Stamm 14028-pBR322 zeigt Mutante 14028 Δ STM1555-pBR322 eine intrazelluläre Überlebensrate von $14,4 \pm 3,0$ % und die komplementierte Deletionsmutante 14028 Δ STM1555-pBR322::STM1555 eine Wiederherstellung der intrazellulären Überlebensrate auf $67,2 \pm 12,4$ % des Wildtypniveaus. Alle Daten repräsentieren die Zusammenfassung von jeweils vier Einzelexperimenten.

3.5 Doppelmutanten zeigen einen additiven Effekt

Mehrere uncharakterisierte Gene, die auf genomischen Inseln liegen, wurden in dieser Arbeit als wichtig für die intrazelluläre Replikation und das intrazelluläre Überleben gezeigt. Die errechnete Attenuationsrate der meisten dieser Mutanten, insbesondere in GEI0266/0307, GEI1528/1562 und im *cob-cbi-pdu*-Gencluster (GEI2016/2058), liegen wenig über dem kritischen Schwellenwert einer fünffachen Attenuation, der mit detektierbarer *in vivo*-Attenuation korrelieren könnte. Additive Effekte können erwartet werden, wenn mehr als eine zelluläre Funktion, die auf einer genomischen Insel kodiert ist, eliminiert wird. Aus diesem

Grund wurde in fünf bereits bestehende Deletionsmutanten eine Insertion in derselben genomischen Insel eingeführt, in der auch die Deletion liegt. So entstanden Mutanten, die Mutationen in zwei transkriptionell unabhängigen Genen derselben genomischen Insel tragen.

3.5.1 Erzeugung von Doppelmutanten

Durch zehnmalige wechselweise Passage der ausgewählten Insertionsmutanten bei nichtpermissiver Temperatur von 37 °C, auf LB-Agar ohne Antibiotika und auf Selektivagar mit 18 µg/ml Tetracyclin, wurde das rekombinante Plasmid pIDM1 *in trans* gebracht und konnte mittels Plasmidpräparation aus der Bakterienzelle extrahiert werden.

Durch das in 2.6 beschriebene Verfahren wurde mit dem gewonnenen rekombinanten Plasmid eine Insertions-Duplikations-Mutation in der Zielzelle erzeugt. Die chromosomale Integration in *S. typhimurium* wurde durch Wachstum bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C unter Selektionsdruck überprüft. Somit konnten in fünf Deletionsmutanten zusätzliche Gene ausgeschaltet werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich beide Mutationen in verschiedenen Transkriptionseinheiten der betroffenen Region befinden.

Tabelle 17: Übersicht über die erzeugten Doppelmutanten

Orientierung des *lac*-Promotors: sense = 5'-3'-Richtung, antisense = 3'-5'-Richtung relativ zum Bakteriengenom.

Deletionsort (Genname)	Insertionsposition im Genom bei Base	Orientierung des <i>lac</i> -Promotors	Lage in genetischer Insel
STM1555	1634005	antisense	GEI1528/1562
STM1677	1766705	sense	GEI1664/1678
STM2017 (<i>cobS</i>)	2123344	sense	GEI2016/2058
STM2603-2605	2733166	sense	GEI2584/2636 (<i>Gifsy-1</i>)
STM2603-2605	2746669	antisense	GEI2584/2636 (<i>Gifsy-1</i>)

3.5.2 Zellkulturergebnisse der Doppelmutanten

Alle Doppelmutanten wurden, wie in Kapitel 2.10 beschrieben, aus der Flüssigkultur in LB-Medium mit Tetracyclin zur Infektion in der Zellkultur mit J-774A.1-Makrophagen gebracht. Als Positivkontrolle fungierte 14028*phoN*(628)::pIDM1, als Negativkontrolle 14028*phoP*(593)::pIDM1. In nachfolgender Tabelle sind die intrazellulären Überlebensraten der Doppelmutanten bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle dargestellt, sowie die Überlebensraten der jeweiligen Deletions- und Insertions-Einzelmutanten zum Vergleich.

Tabelle 18: Intrazelluläre Überlebensrate der Doppelmutanten

In der ersten Spalte ist die Bezeichnung der Doppelmutanten aufgeführt. Die intrazellulären Überlebensdaten für die jeweilige Deletionsmutante alleine sind in der dritten Spalte zu finden, die Daten für die Einzel-Insertionsmutante in der vierten Spalte. Die zweite Spalte stellt dem die intrazellulären Überlebenswerte für die Doppelmutante gegenüber. Alle Daten repräsentieren vierfache (für 14028Δ1677/1672::pIDM1: achtfache) Experimente. In Klammern ist jeweils die Standardabweichung der Zusammenführung dieser Einzelexperimente angegeben.

Bezeichnung Doppelmutante	Überlebensrate Doppelmutante	Überlebensrate Deletionsmutante	Überlebensrate Insertionsmutante
14028Δ1555/1556::pIDM1	26,4±3,2 %	35,1±8,7 %	78,6±13,5 %
14028Δ1677/1672::pIDM1	18,2±2,0 %	19,2±5,8 %	28,1±6,3 %
14028ΔcobS/pduK::pIDM1	20,6±3,6 %	63,8±12,5 %	26,4±1,5 %
14028Δ2603-2605/2585A::pIDM1	23,1±1,3 %	30,1±3,3 %	27,1±14,0 %
14028Δ2603-2605/2595::pIDM1	19,0±1,0 %	30,1±3,3 %	24,0±6,8 %

Da die intrazellulären Überlebensdaten für Insertionsmutante bzw. Deletionsmutante und die korrespondierende Doppelmutante teilweise sehr eng zusammen liegen, wurde eine statistische Signifikanzberechnung durchgeführt. Dazu wurde der Student-t-Test für zwei Stichproben benutzt. Der Test liefert einen p-Wert (*probability*-Wert), der über die Irrtumswahrscheinlichkeit Auskunft gibt. Als Schwellenwert für signifikante Ergebnisse wurde $P \leq 0,05$ angesetzt, d.h. die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als fünf Prozent.

Tabelle 19: Statistische Auswertung der Zellkulturdaten der Doppelmutanten

Doppelmutante	P gegen Deletion	P gegen Insertion
14028Δ1555/1556::pIDM1	0,0076	0,0010
14028Δ1677/1672::pIDM1	0,3572	0,0001
14028ΔcobS/pduK::pIDM1	0,0011	0,0337
14028Δ2603-2605/2585A::pIDM1	0,0021	0,0064
14028Δ2603-2605/2595::pIDM1	0,0011	0,0021

Deutlich zu erkennen ist, dass bis auf die Doppelmutante 14028Δ1677/1672::pIDM1 alle erzeugte Mutanten signifikant stärker attenuiert sind als die jeweils korrespondierenden Insertions- bzw. Deletionsmutanten alleine.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 164 durch IDM konstruierte Insertionsmutanten auf ihre Rolle bei der Virulenz des Bakteriums *S. typhimurium* untersucht. Durch sorgfältige *in silico*-Validierung, Charakterisierung des *in vitro*-Wachstums und Bestimmung des intrazellulären Proliferationsverhaltens konnten 159 Mutanten als attenuiert in ihrer Überlebensfähigkeit im murinen Makrophagen beschrieben werden. Im Folgenden wurden 37 Mutantenstämme aus diesem Fundus, sowie vier zielgerichtet erzeugte Mutanten näher untersucht, die in zwölf der größeren nichtklinearen genomischen Inseln [16] von *Salmonella* liegen. Zehn dieser Mutationen zeigen sogar einen ähnlich stark attenuierenden Effekt wie die Insertionsmutation in *phoP*, die als Negativkontrolle benutzt wurde. An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, im Anschluss an einen Vergleich der Insertions-Duplikations-Mutagenese mit den in 1.2 vorgestellten Methoden zur Virulenzgenidentifikation, ausführlich diskutiert werden.

4.1 Vergleich der IDM mit anderen Methoden zur Identifikation virulenzrelevanter Gene in Bakterien

Die Virulenz bakterieller Pathogene ist ein komplexer Vorgang, der eine Vielzahl von Faktoren beinhaltet. Dabei wird die koordinierte Expression vieler Gene des Bakteriums benötigt [152]. Um sich dieser Thematik anzunähern, wurde in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von Techniken entwickelt. Dazu zählen die bereits in 1.2 dargestellten Methoden Reporterfusion, Transposonmutagenese, IVET und signaturmarkierte Mutagenese sowie die Verwendung von DNA-Mikroarrays.

In dieser Arbeit wurde sowohl eine mittels Insertions-Duplikations-Mutagenese erstellte Mutantenbank untersucht als auch zielgerichtete Mutationen mit dieser Technik erstellt. Im Folgenden soll die IDM anderen Ansätzen zur Suche nach virulenzassoziierten Genen gegenübergestellt werden.

4.1.1 Reporterfusion und Transposonmutagenese

Sowohl die Reporterfusion als auch die Transposonmutagenese, zwei bereits seit langem eingesetzte Techniken, haben einen entscheidenden Nachteil. Die Erzeugung der Mutanten und die Identifikation von attenuierten Mutanten nach der Wirtspassage sind sehr arbeits- und zeitintensiv, so etwa die von Klarsfeld et al. durchgeführte Untersuchung von 2550 *Listeria*

Tn917-*lac* Mutanten auf Gene, die im Makrophagen höher exprimiert werden als im Kulturmedium unter Laborbedingungen. Fünf im Makrophagen mehr als 100fach induzierte Gene konnten in dieser Untersuchung identifiziert werden [228]. Insbesondere die Identifikation und Separation der avirulenten Mutanten aus dem Zusammenschluss der Transposonmutanten ist zeitaufwändig und oft impraktikabel [229]. Auch scheint es bevorzugte Stellen der Transposoninsertion im Chromosom zu geben, sog. *Hotspots*, so dass nicht von einer gleichmäßigen Abdeckung des Bakteriengenoms bei systematischer Transposonmutagenese ausgegangen werden kann [230-232]. Diese nicht vollständige Genomsättigung kann zur Fehlidentifikation von vermeintlichen Virulenzgenen führen, weshalb Gene in weniger bevorzugten Bereichen ausgelassen werden könnten. Im IDM-*Screen* konnte jedoch eine Zufälligkeit des erzeugten PCR-Fragments und damit der chromosomalen Insertion nachgewiesen werden. Dies wurde durch die Sequenzierung von 60 Klonen der von Knuth et al. angelegten Bibliothek von pIDM-Genfragement-Fusionen bestätigt. Bis auf neun Klone trugen alle individuell verschiedene Fragmente. Drei Klone trugen kein Insert und sechs Sequenzen wurden doppelt identifiziert, was einer Redundanz von zehn Prozent entspricht [160].

Die Transposonmutagenese an sich ist nicht für die Identifikation essenzieller Gene nutzbar, da die Insertion in ein essenzielles Gen eine letalen Phänotyp hervorbringen würde [147]. Dieselbe Problematik stellt sich auch bei Verwendung der IDM zur Identifikation essenzieller Gene. Hier kann jedoch durch Umschalten zwischen permissiven und nichtpermissiven Bedingungen zwischen letalen und nichtletalen Insertionen diskriminiert werden, was wiederum die effiziente Identifikation von Genen ermöglicht, die für die gegebenen Kulturbedingungen essenziell sind [160]. Das Ausschneiden des integrierten Vektors stellt dabei mit 98%iger Verlässlichkeit den wildtypischen Genotyp wieder her [162]. Mittels der Transposonmutagenese ist aber eine ähnliche Diskriminierung, etwa durch Entwicklung von GAMBIT (*genomic analysis and mapping by in vitro transposition*) möglich [233, 234]. GAMBIT ist jedoch bislang nur für natürlich kompetente Bakterienarten verwendet worden und beinhaltet sehr zeit- und arbeitsaufwändige Untersuchungsschritte.

4.1.2 IVET

Seit den frühen 90er-Jahren wurde eine Reihe von neuen Techniken entwickelt, um die Expression von Genen im Wirtsorganismus des Pathogens zu untersuchen. Diese wurden allgemein als *in vivo*-Expressionstechnologie (IVET) bezeichnet. Man macht sich eine positive Selektion auf die Promotoraktivität im Wirt zunutze. Allerdings ist einer der

Nachteile des IVET-Systems, dass bei der Integration der Promotorfusion in das Chromosom des Pathogens eine Duplikation erzeugt wird, die unter Umständen mit einer Exzisionsfrequenz von etwa 10^{-5} - 10^{-6} in einem instabilen genetischen System resultieren kann. Daraus kann der Verlust des Kointegrats oder die Anhäufung von Artefakten entstehen. Aufgrund des angelegten Selektionsdrucks *in vivo*, etwa durch Antibiotika, wurde der Verlust des Kointegrats aber nicht beobachtet [147]. Auch bei der Verwendung der IDM entsteht eine Duplikation der Zielregion, es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Kointegratstruktur auch ohne angelegten Selektionsdruck stabil bleibt [162] (vgl. 3.1.5).

Für die IVET-Methode ist das effiziente Einbringen des rekombinanten Materials in die Bakterienzelle bedeutsam. Methoden wie Konjugation oder Elektroporation sind aber nicht in allen Bakterienarten gleich gut anwendbar [147]. Ähnliches gilt für die IDM. Hier ist ein verfügbarer temperatursensitiver Vektor, spezifisch für die zu untersuchende Bakterienart, Voraussetzung für die erfolgreiche Mutagenese. Weiterhin vonnöten sind eine ausreichende Transformationsrate des Vektors sowie ein effizientes Rekombinationssystem [160].

Die Komplementation der ursprünglich bei IVET verwendeten Auxotrophie setzt im Tiermodell eine starke Aktivierung der Genexpression, verglichen mit dem Wachstum im Labormedium, voraus [150, 151, 153]. Stark hochregulierte Gene werden im *Screen* vorrangig gefunden. Gene, die nur in einem bestimmten Schritt exprimiert werden bzw. transient oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden, sind in dieser Untersuchung unterrepräsentiert, ebenso wie regulatorische Gene [151, 152]. Diese Problematik konnte durch die Entwicklung der Resolvase-basierten IVET (RIVET) umgangen werden [154, 155]. Bei Verwendung der IDM stellt sich diese Problematik nicht, da eingeführte Mutationen eine definitive Ausschaltung der Genfunktion bedingen. Hier wird nicht die Expressionsstärke des untersuchten Gens gemessen und von dieser aus Rückschlüsse auf eine eventuelle Virulenzassoziation gezogen, sondern es wird der Effekt der direkten Inaktivierung des betreffenden Gens auf das Überleben der Mutante im Wirt bzw. in eukaryotischen Zellen untersucht. Die Sicherstellung der Zufälligkeit der generierten chromosomalen Genfragmente ermöglicht eine gleichmäßige Mutagenese des Genoms und verhindert eine Unterrepräsentation schwach aktivierter oder reprimierter Gene [160].

Ein weiterer Nachteil der IVET ist, dass die Isolierung von *in vivo* induzierten Genen auf der transkriptionellen Regulation beruht. So sind Gene, die durch posttranslationale Modifikationen aktiviert oder reguliert werden, nicht detektierbar [147]. Dieses Problem stellt sich bei Verwendung der IDM ebenfalls nicht, da hier der Effekt des Fehlens eines

Genprodukts gemessen wird, nicht der Effekt seiner Aktivierung/Repression. Allerdings kann die IDM nicht quantitativ die Aktivierungs-/Reprimierungsstärke eines Gens messen, sondern nur den Effekt des ausgeschalteten Gens auf die Fitness des Pathogens durch Angabe der Attenuationsrate quantifizieren.

Problematisch bei IVET ist ebenfalls, dass die ursprünglich in den Untersuchungen verwendete Auxotrophie durch nichtauxotrophe Bakterien *in vivo* transkomplementiert werden kann [152]. Bei Verwendung der IDM kann eine Reversion zum wildtypischen Phänotyp nur durch Exzision des integrierten Vektors zustande kommen, was jedoch unter Selektionsdruck bei nichtpermissiver Temperatur während der Infektion von kultivierten Zellen nicht beobachtet werden konnte [162].

Die Wahl geeigneter *in vitro*-Bedingungen für die zweite Selektion der aus dem Wirt zurückgewonnenen Bakterien ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der IVET. So könnten etwa essenzielle biosynthetische Gene von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen werden, wenn *in vitro* auf Minimalmedium selektiert wird, wo diese Gene ebenfalls induziert werden [152]. Dagegen kann, wie bereits bei der Diskussion der Transposonmutagenese erläutert, mittels IDM sehr effizient zwischen essenziellen und nicht essenziellen Genen diskriminiert werden. Allerdings kann mit dieser Methode der Effekt einer Geninaktivierung in der Wirtszelle nicht untersucht werden, da die Integration einen letalen Phänotyp hervorbringt [160]. Mit IVET kann dagegen ein Eindruck von der Rolle essenzieller Gene bei der Infektion des Wirtsorganismus erlangt werden, wenn solche Gene gezielt untersucht werden.

Nur ein Teil der durch IVET als im Wirt induziert identifizierten Gene zeigt eine substantielle Rolle in der Virulenz des Pathogens *in vivo*, die durch LD₅₀-Studien und kompetitive Assays gezeigt werden kann [152, 155, 235]. In *S. typhimurium* wurden mit IVET bereits bekannte Virulenzgene wie *phoP* identifiziert und einige neuartige Gene, welche jedoch keinen nennenswerten Virulenzdefekt in LD₅₀-Assays zeigten [236]. Diese geringe Relevanz der identifizierten Gene für die Virulenz des Organismus stellt die Schwachstelle der IVET-Methode dar.

Auch ethische Aspekte spielen sicherlich eine Rolle. Bei der Verwendung der IDM kann eine effektive Vorauswahl eventuell virulenzrelevanter Gene durch *in silico*-Analyse, *in vitro*-Wachstumscharakterisierung und Infektion kultivierter Zellen getroffen werden, was in einer deutlich reduzierten Anzahl von Tierversuchen resultiert. So konnten aus ursprünglich über 10000 Klonen 164 Klone mit Mutationen in Genen selektiert werden, die als wichtig für das Überleben und die Replikation im Makrophagen in Frage kommen ([160] und diese Arbeit).

4.1.3 Signaturmarkierte Mutagenese

Signaturmarkierte Mutagenese ist eine vergleichende Hybridisierungstechnik, die eine Sammlung sequenzmarkierter Transposons nutzt. Ein Faktor in der signaturmarkierten Mutagenesemethode schränkt die Komplexität des Zusammenschlusses unterschiedlicher Mutanten für die Infektionsstudie ein: Wenn die Komplexität des selbigen steigt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine virulenzattenuierte Mutante nicht in ausreichender Menge präsent ist, um genug markierte Sonde für die Hybridisierungsanalyse zu produzieren [147, 152]. Außerdem ist die Hybridisierung sehr zeitaufwändig und arbeitsintensiv- mittlerweile ist jedoch eine Modifikation verfügbar, bei der die Hybridisierung durch PCR ersetzbar ist [237, 238].

Wie auch RIVET und DFI ist die signaturmarkierte Mutagenese nicht von Selektionsparametern abhängig. Schwach und/oder transient exprimierte Gene können ebenfalls identifiziert werden [151], dennoch erfolgt eine Anreicherung hin zu stärker attenuierten Genen im *Screen* [152]. Die signaturmarkierte Mutagenese basiert auf der Fähigkeit des fraglichen Pathogens, *in vivo* als gemischte Population zu replizieren. Daher ist die Identifikation von Virulenzgenen, deren Mutanten-Phänotyp durch andere, virulente Stämme desselben Inokulums transkomplementiert werden kann, schwierig [152]. Auch wachstumsdefiziente Stämme und Bakterien mit Mutationen in redundanten Genen können im *Screen* unterrepräsentiert sein [151].

Die Problematik der wachstumsdefizienten Mutanten wird bei den in dieser Arbeit verwendeten Mutanten dadurch umgangen, dass vor den Zellkulturexperimenten eine Untersuchung auf das *in vitro*-Wachstum vorgenommen wurde. Wie bereits erwähnt, findet beim IDM-basierten Ansatz auch keine Unterrepräsentation bestimmter Gene im *Screen* statt, da durch die zufällige Generierung der in den Vektor klonierten Genfragmente eine gleichmäßige Mutagenese des Genoms erzeugt wird. Eine Transkomplementation ist ebenfalls unwahrscheinlich, weil bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht in Konkurrenz mit anderen Stämmen infiziert wird, sondern nur mit klonal expandierten Einzelmutanten.

Eine weitere Bedingung zur erfolgreichen Durchführung von Untersuchungen auf virulenzassoziierte Gene mittels der signaturmarkierten Mutagenese ist die richtige Dosierung des Inokulums. Wird diese zu gering gewählt, könnten zu wenige Zellen eines virulenten Stamms darin vorhanden sein, um eine Infektion zu initiieren. Andere, eventuell virulenzattenuierte Stämme werden dann im Infektionsprozess stochastisch erfasst und wachsen im Verlauf überproportional. Damit verändert sich die Aussage der Untersuchung

grundlegend, da virulenzattenuierte Mutanten nicht mehr zwangsläufig negativ selektiert werden. Wird die Infektionsdosis zu hoch gewählt, kann das Immunsystem des Wirts überfordert werden, was in der Proliferation eigentlich attenuierter Mutanten resultiert [152]. Diese Problematik ist für die Verwendung der IDM völlig irrelevant, da hier nicht kompetitiv infiziert wird.

Auch die Identifizierung des mutierten Gens, welches für den beobachtete Effekt verantwortlich ist, gestaltet sich bei der signaturmarkierten Mutagenese deutlich schwieriger als bei der IDM. Um die Gensequenz zu erhalten, welche die Transposoninsertionsstelle flankiert, muss die genomische DNA präpariert, gespalten und religiert werden. Dann kann meist, aber nicht in allen Fällen, eine inverse PCR ein Produkt amplifizieren, das sequenziert werden kann. Bei der IDM hingegen genügt der PCR-Schritt gefolgt von der Sequenzierung, da das Genfragment auf einem Plasmid vorliegt.

Obwohl das *Screening* von bislang mehr als 20000 Mutanten in mehr als 15 Bakterienspezies mittels signaturmarkierter Mutagenese mehr als 1000 *in vivo* attenuierte Mutanten aufgefunden hat, sind nur einige wenige Gene darunter, die für bekannte Virulenzfaktoren kodieren [239, 240]. Dazu gehören oft bakterielle Faktoren, die mit der Zellwand oder Zellmembran assoziiert sind, wie Gene der Polysaccharidbiosynthese in *Yersinia pseudotuberculosis* und *Streptococcus agalactiae* [241, 242] sowie Gene des Typ-III-Sekretionssystems von SPI-2 in *Salmonella* [119]. Diese geringe *in vivo*-Relevanz spiegelt die Problematik der Transposonmutagenese, wie polare Effekte und Genduplikationen wieder [240].

Wie bei der Transposonmutagenese im Allgemeinen kann auch von der signaturmarkierten Mutagenese die Identifikation essenzieller Gene nicht erwartet werden, da eine Transposoninsertion in diese Gene einen letalen Phänotyp erzeugt [152]. Mit IDM ist dies jedoch durchaus möglich [160]. Allerdings konnten in *Helicobacter pylori* kürzlich Untersuchungen auf essenzielle Gene durch Nutzung der Mikroarraytechnik zur Identifikation der signaturmarkierten Transposons durchgeführt werden [243]. Generell scheint eine Kombination aus signaturmarkierter Mutagenese und Mikroarraytechnik zur Virulenzgenidentifikation interessante Ergebnisse zu liefern und den Arbeitsaufwand beim *Screening* deutlich zu verringern [159].

Die signaturmarkierte Mutagenese ist leicht an verschiedene Wirt-Pathogen-Systeme anpassbar [151], was, wie bereits diskutiert, für die IDM nicht ohne weiteres zutrifft, da bestimmte Voraussetzungen, wie etwa die Verfügbarkeit eines temperatursensitiven Vektors, erfüllt sein müssen [160].

4.1.4 Genexpressionsprofil (Mikroarraytechnik)

Eriksson et al. hatten 2003 das Expressionsprofil von *S. typhimurium* während der Infektion des Makrophagen publiziert. Dabei war nach vier, acht und zwölf Stunden nach der Infektion die Gesamt-RNA der Bakterien präpariert worden [144].

Wie bereits in 3.1.4 gezeigt, gibt es kaum Übereinstimmungen zwischen dem von Eriksson et al. erzeugten Datensatz und den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen intrazellulären Überlebensdaten. Neben den Genen STM1255, STM1676 und STM2585 konnte lediglich für das Gen *safC* eine signifikante Hochregulation während der Infektion gefunden werden. Diese schwankt zwischen dem Faktor 5,1 und 4,6 vier bzw. zwölf Stunden nach der Infektion. Die Insertionsmutantendaten für *safC* zeigen eine Reduktion des intrazellulären Überlebensvermögens auf etwa ein Drittel, die Deletionsmutante in *safC* ist nicht attenuiert. Für die Gene *flgE* und *flgH* konnte eine maximale Herunterregulation während der Infektion um den Faktor 0,02 bzw. 0,06 festgestellt werden. Hier liegen Zellkulturdaten vor, die eine Attenuation der intrazellulären Replikation von 17,7 % bis 28,4 % zeigen. Für die Gene *cobS* und *pduK* des in dieser Arbeit als wichtig für das intrazelluläre Überleben eingestuftes *cob-cbi-pdu*-Genclusters sowie für das Virulenzgen *virK* [69] und das Adhäsionsdefekt-vermittelnde Gen *ratA* (siehe 3.1.3) konnten Eriksson et al. keine signifikanten Regulationsdaten erzielen. Verwunderlicherweise erfolgt für das Virulenzregulationssystem *phoP/Q* [135] ebenfalls keine signifikante Regulation der Genexpression im Makrophagen. Beide Gene werden während der Infektion schwach herunterreguliert [144]. Für das in 3.3.4 beschriebene Operon STM1255 mit STM1257 zeigte ein Vergleich mit den Mikroarraydaten von Eriksson et al. [144] eine signifikante Hochregulation des Gens STM1255 vier, acht und zwölf Stunden nach der Infektion. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit erstellten Attenuationsdaten für dieses Operon. Der Transporter scheint während des Zelleintritts der Bakterien aktiviert zu werden und spielt eine Rolle bei der intrazellulären Replikation von *S. typhimurium*.

Ein Kritikpunkt an der Arbeit von Eriksson et al. ist die problematische Durchführung einer RNA-Präparation aus den Makrophagen. Dabei spielen sowohl Verunreinigungen durch mitgeführte eukaryotische RNA der Wirtszelle [244] als auch die schlechte Stabilität isolierter RNA eine Rolle. So wurden die Makrophagenzellen zur Lyse 30 Minuten auf Eis inkubiert. Trotz Zugabe eines stabilisierenden Reagenz findet in dieser Zeit wahrscheinlich eine Degeneration der mRNA statt, da die Halbwertszeit eines Großteils der bakteriellen RNA bei wenigen Minuten liegt [245, 246]. Dies wiederum beeinflusst signifikant die anschließend bestimmte Stärke des Hybridisierungssignals.

Auch die Wahl der Kontrolle hat eine essenzielle Bedeutung für die Interpretation der aus den Mikroarrayexperimenten gewonnenen Daten [244]. Eriksson et al. bestimmten die intrazelluläre Regulation der bakteriellen Gene anhand von Bakterien, die in Zellkulturmedium wachsen. Dabei bleibt jedoch zu beachten, dass solche Kontrollen nur ansatzweise mit den intrazellulären Bakterien hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit vergleichbar sind. Durch die Verwendung der IDM kann hingegen der direkte Effekt eines Genknockouts auf das intrazelluläre Überleben gemessen werden. Hier stellt sich die Frage der adäquaten Behandlung der Kontrollen insofern nicht, als Positivkontrolle und Negativkontrolle im selben Assay unter den exakt gleichen Bedingungen wie die Mutanten inkubiert werden.

Interessanterweise ist gerade die Kombination der Mikroarraytechnik mit anderen Techniken zur Virulenzgenidentifikation ein viel versprechender Ansatz. So wurde etwa von Badarinarayana et al. der Beitrag von Genen zum Wachstum von *E. coli* in Voll- und Minimalmedium mit einer Kombination aus Transposonmutagenese und Mikroarray untersucht [247]. Sassetti et al. entwickelten auf dieser Basis die TraSH(*transposon site hybridisation*)-Technik, bei der ebenfalls Transposonmutanten an einem Mikroarray hybridisiert werden [248]. Wie bereits in 4.1.3 beschrieben, stellte sich eine Kombination von signaturmarkierter Mutagenese und Mikroarraytechnik ebenfalls als Erfolg versprechend heraus. Jedoch konnten mit einem Ansatz einer 50000-KbE-Transposonbibliothek und einem *Screening* von 1152 Klonen lediglich 43 attenuierte Mutanten, davon 19 bislang uncharakterisiert, identifiziert werden. Letztendlich wurden 37 % der attenuierten Mutanten dem SPI-2 zugeordnet [159]. Im vorläufigen IDM-*Screen* konnten in Vergleich dazu 223 attenuierte Mutanten gefunden werden, von denen etwa 50 % uncharakterisiert waren [160].

4.2 Genominseln in Salmonella

Wie bereits in 1.1.4 dargelegt, wurden über 60 nichtkollineare Genominseln in *S. typhimurium* identifiziert [16], die als potenzielle Kandidaten für neue Pathogenitätsinseln benannt werden. Lediglich ein kleiner Teil der Gene dieser Inseln ist bereits charakterisiert. Dies reflektiert die generelle Problematik genomweiter *Screening*-Methoden für Virulenzgene. Oft handelt es sich dabei um hypothetische Gene oder Homologe zu schlecht charakterisierten Genen, so dass eine Funktionszuordnung auf Basis von Sequenzvergleichen nicht möglich ist. Und auch wenn für das betreffende Gen eine Funktionszuordnung verfügbar ist, ist dessen Rolle bei der Infektion meist abhängig vom Wirtskompartiment, in dem es exprimiert wird [249]. Zumindest Letzteres ist für die vorliegende Arbeit nicht relevant, da hier gezielt die Rolle von Genen in der Proliferation von *S. typhimurium* im intrazellulären Milieu des Makrophagen, also kompartimentspezifisch, untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Folgenden unterteilt nach genomischen Inseln diskutiert werden.

4.2.1 Gifsy-1 und -2 Prophagen

Wie bereits erwähnt, verfügt *S. typhimurium* über mindestens fünf funktionsfähige Prophagen sowie die Überreste einiger weiterer Bakteriophagen im Genom.

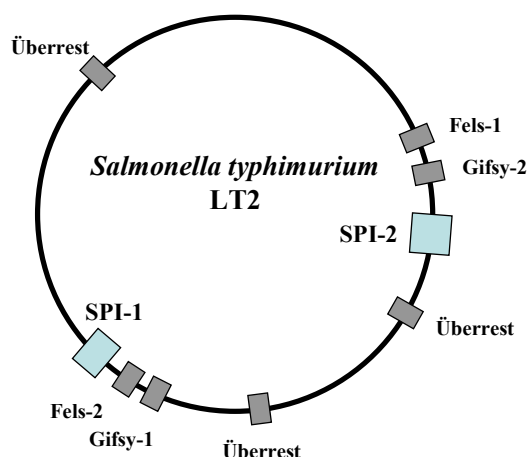


Abbildung 25: Anordnung der Phagengene auf dem Chromosom von *S. typhimurium*

Gezeigt ist die Anordnung der Gene der Prophagen Gifsy-1 und Gifsy-2, Fels-1 und Fels-2, der Überreste weiterer Prophagen und der Pathogenitätsinseln SPI-1 und SPI-2 im Chromosom von *S. typhimurium*. Entnommen aus [250], modifiziert nach [16].

Es wird vermutet, dass diese Phagengene eine Rolle bei der Virulenz des Organismus spielen [94]. Bei phagenvermittelter Virulenz gilt es, eine grundsätzliche Unterscheidung zwischen

zwei Mechanismen der Virulenzbeeinflussung zu treffen. Zum einen existieren Phagen, die ein bakterielles Toxin kodieren, wie etwa die *stx*-Phagen des Lebensmittelpathogens *E. coli* O157:H7 [251, 252] oder die Phagen von *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae* oder *Clostridium botulinum* [253-255]. Zum anderen sind eine Vielzahl von Prophagen im Genom von Organismen wie *Streptococcus* [256, 257] und *Salmonella* vorhanden, die einen Beitrag zur Virulenz des Bakteriums durch kodierte Virulenzfaktoren leisten können [258]. Die lysogene Umwandlung durch den temperenten Phagen scheint einen Beitrag zum horizontalen Gentransfer zu leisten, der als einer der Hauptmechanismen der Evolution von *Salmonella* angesehen wird [94, 259].

Elf Vektorinsertionen im Bereich der lambdoiden Gifsy-1 und Gifsy-2 Prophagen erzeugten im Zellkulturmodell einen attenuierten Phänotyp. Vier Gendeletionen bestätigen diesen Befund. Die ersichtliche Diskrepanz der Resultate für Insertionsmutante und Deletionsmutante bei Gen STM1042 (11,3 % Attenuationsgrad für die Insertionsmutante, 59,1 % für die Deletionsmutante) kann durch einen polaren Effekt der Insertion auf das Gen STM1041 (das ebenfalls in diesem *Screen* identifiziert wurde) sowie durch eine generelle Variabilität der Versuchsansätze zustande kommen.

Es wurde bereits gezeigt, dass funktionsfähige Gifsy-2 Prophagen eine Rolle bei der bakteriellen Virulenz spielen. Die Entfernung dieses Prophagen reduziert die Fähigkeit von *Salmonella*, eine systemische Infektion zu erzeugen, signifikant um etwa das Hundertfache. Eine Entfernung des Gifsy-1 Prophagen resultierte allerdings nur in einer leichten Virulenzreduktion. Gifsy-1 scheint nicht virulenzwichtig zu sein, solange Gifsy-2 im Genom vorhanden ist. Entfernt man aber Gifsy-2, so trägt Gifsy-1 anscheinend ausgeprägt zur Virulenz bei [94, 260]. Der Prophage Gifsy-2 trägt das Superoxid-Dismutase kodierende Gen *sodC* [261], welches kürzlich als wichtig für die bakterielle Abwehr des oxidativen *Burst* im Makrophagen beschrieben wurde [262-264]. Dieses Gen alleine vermochte die Virulenz des vom Prophagen befreiten Stamms nicht wiederherzustellen [260]. Kürzlich wurde ein weiteres Gen des Gifsy-2 Prophagen als virulenzwichtig eingestuft, das Gen *gtgE* (STM1055). Interessanterweise wird dieser neuer Virulenzfaktor von SlyA aktiviert, einem Genprodukt, das auch in die Regulation der Virulenzgene *pagC*, *mig-14* und *virK* involviert ist [265, 266].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mindestens vier Gifsy-2 Prophagengene zum Replikationsverhalten von *S. typhimurium* beitragen. Darunter auch das Gen STM1033, welches eine putative Clp-ähnliche Protease kodiert, sowie das Gen STM1042, welches für

ein kleineres Schwanzprotein des Phagen kodiert [93]. Für die beiden anderen identifizierten Gene des Gifsy-2 Prophagen ist bislang keine Funktionszuordnung möglich.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verschiedene Faktoren, die vom Gifsy-1 Prophagen kodiert werden, darunter das Genprodukt GipA, das zu PagK homolog ist, sowie ein putatives Enterohämolysin, das ein funktionales Äquivalent in der Gensequenz von Gifsy-2 hat, eine wichtige Rolle beim intrazellulären Überleben im Makrophagen spielen. *pagK* wird anscheinend sowohl von SlyA als auch vom PhoP/Q-System reguliert [266]. *gipA* (STM2599) wurde als transkriptional induziert im IVET-Screen gefunden, wenn *Salmonella* den Dünndarm der Maus kolonisiert. Allerdings wurde nur ein geringer Effekt einer *gipA*-Mutante im oralen kompetitiven Assay beobachtet. Anscheinend wird das Gen spezifisch nur in der frühen Phase der Infektion induziert [216]. Im Zellkulturassay zeigt sich ein attenuierender Effekt der Insertion in *gipA* der mehr als zehnfach unter dem Wildtypniveau liegt ($8,8 \pm 1,5$ %).

Es scheint also, dass, entgegen dem von Figueroa-Bossi et al. [260] publizierten geringen Beitrag von Gifsy-1 zur Virulenz von *S. typhimurium* in Gegenwart von Gifsy-2, die Gene dieses Prophagen sehr wohl eine Rolle bei der Virulenz des Bakteriums spielen. Dieser widersprüchliche Sachverhalt könnte durch die Tatsache aufgeklärt werden, dass Figueroa-Bossi et al. im Mausmodell arbeiten, während in dieser Arbeit das Proliferationsverhalten rein intrazellulär in Makrophagen-Zellkultur untersucht wurde. In diesem Artikel mutmaßen die Autoren auch über die Existenz eines oder mehrerer Virulenzgene von Gifsy-1, die ein funktionales Homolog in Gifsy-2 haben. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Gen STM2633, das ein Homolog mit sehr hoher Übereinstimmung (e-Wert = 0,0) in STM1008, im Bereich von Gifsy-2 hat, wichtig für die intrazelluläre Replikation von *Salmonella* ist. Damit könnte dieses Gen die beiden gestellten Kriterien erfüllen.

STM2633 kodiert für ein Genprodukt, das homolog zu Enterohämolysin 1 von *E. coli* ist. *S. typhimurium* besitzt zytotoxische Aktivität, vermittelt durch die *stn*-Gene, deren Virulenzwichtigkeit im Mausmodell gezeigt werden konnte [267, 268]. Über ein eventuell vorhandenes phagenkodiertes Enterohämolysin ist jedoch nichts bekannt. Lediglich die Regulation der Toxinproduktion scheint bislang durch die Identifikation des Proteins SlyA geklärt. SlyA hat Homologe in *Shigella* und enteropathogenen *E. coli*, aber nicht in anderen Enterobakterien. Bakterien mit einer Mutation in *slyA* zeigen eine 1000-10000fach erhöhte LD₅₀ im Mausmodell [269, 270]. Die Diskrepanz zwischen den Werten für die beiden Insertionen in Gen STM2633 von Gifsy-1 ist bedingt durch eine unklare Annotation dieser Genbereiche. Die Insertion bei Position 2773611 überlappt teilweise den vorhergesagten

ORF von Gen STM2632. Beide Insertionen in STM2633 sind überdies etwa 400 Nukleotide voneinander versetzt. In einem Fall bleibt also mehr des ursprünglichen Gens intakt und damit werden auch mehr Aminosäuren des Genprodukts transkribiert und translatiert. So kann es zur Translation in ein teilweise funktionelles Protein trotz Insertion in diesem Gen kommen, was sich in einem verminderten Attenuationsgrad niederschlägt.

Die Rolle, die phagenkodierte Gene in der Virulenz von Salmonellen spielen, zeigt sich nicht zuletzt auch dadurch, dass Effektoren des Typ-III-Sekretionssystems der beiden SPIs 1 und 2, nämlich SopE, SspH1, SseI und SopE2, phagenkodiert sind. Diese Effektoren scheinen zusätzlich zwischen verschiedenen Salmonellen transferierbar zu sein. Bisher identifizierte phagenkodierte Virulenzgene, wie die *sod*-Gene oder die genannten Typ-III-Effektorproteine, beeinflussen also maßgeblich die Interaktion des Bakteriums mit dem Wirt [250].

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass beide Gifsy-Prophagen von *S. typhimurium* eindeutig eine signifikante Rolle bei der intrazellulären Replikation des Bakteriums spielen.

4.2.2 Genomische Insel GEI1239/1269 (Transporteroperon)

Innerhalb der 31 Gene umfassenden genomischen Insel GEI1239/1269 [16] konnten drei Insertionsmutanten in STM1255, STM1256 und STM1257 mit einem sehr hohen Attenuationsgrad von 0,6-4,7 % identifiziert werden. Diese Gene bilden zusammen mit STM1258 und STM1259 ein putatives Operon. Eine im Gen STM1257 erstellte nichtpolare Deletionsmutante bestätigte diese Befunde durch einen ebenfalls auffallend hohen Attenuationsgrad von $3,8 \pm 1,5$ %. Dieses Operon scheint für die Komponenten eines ABC-Transportsystems zu kodieren. Allerdings basiert diese Vermutung alleine auf Gensequenzvergleichen, da es sich um ein bisher völlig uncharakterisiertes Transportsystem handelt. Jedoch stützen die durch verschiedene Programme wie BLAST, TransportDB, InterproScan und TMHMM [183, 186, 224-226] gewonnenen Befunde (siehe 3.3.4) diese Hypothese. Das putative Transportsystem verfügt demnach über zwei membranständige Domänen, die von STM1256 und STM1257 kodiert werden, zwei ATPase-Komponenten zur Energieumwandlung, kodiert von STM1258 und STM1259, sowie ein periplasmatisches Bindeprotein, kodiert von STM1255.

Im IDM-Screen konnten zuverlässig die drei Kernkomponenten des Transportsystems als wichtig für das intrazelluläre Überleben identifiziert werden, jedoch nicht die beiden ATPase-Komponenten STM1258 und STM1259. Die gefundene Sequenzübereinstimmung auf Aminosäureebene mit den Pathogenen *Yersinia pestis* und *Y. pseudotuberculosis* weist

ebenfalls auf eine eventuelle Virulenzassoziation der Kernkomponenten des Transportsystems hin. Das Fehlen einer signifikanten Homologie zwischen *S. typhimurium* und diesen beiden Organismen im Bereich der Gene STM1258 und STM1259 sowie das Auslassen dieser Gene im IDM-Screen könnte ein Hinweis auf eine nicht mit dem übrigen Transporteroperon assoziierte Akquisition der ATPase-Komponenten während der Evolution des Systems sein.

Das Substrat des Transportsystems konnte durch die gewonnenen Erkenntnisse aus der Anwendung von *ConservedDomainSearch* und TransportDB nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Deshalb wurden Studien mit dem *lux*-Gene tragenden Vektor pDEW201, in den der vermutliche Promotor des Transporteroperons ($P_{STM1255}$) kloniert wurde, durchgeführt. Es konnte im Rahmen dieser Untersuchungen keine spezifische Induktion in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur, Mg^{2+} -Konzentration oder Aminosäuregehalt gezeigt werden. Eine Induktionsstudie während der Infektion von Makrophagenzellen zeigte ebenfalls keine signifikante Induktion des Promotors während der Infektion für mehr als neun Stunden. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte es sich um eine Blockierung der Luziferasereaktion handeln, da eventuell das Redoxpotenzial in der Vakuole des Makrophagen nicht ausreichend für eine Elektronenübertragung ist. Chan et al. [159] konnten jedoch zeigen, dass prinzipiell eine Messung der Luziferaseaktivität in infizierten Makrophagen möglich ist. Eine weitere Erklärung für die nicht detektierbare Induktion ist, dass eben keine solche Induktion während der Infektion von J-774A.1 stattfindet. Der Transporter scheint konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert zu werden. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den von Eriksson et al. [144] publizierten Daten, die eine maximal vierfache Hochregulation der Genexpression STM1255 während der Infektion des Makrophagen zeigen. Weiterhin könnte das Ausbleiben einer detektierbaren Induktion des Promotors von STM1255 auch an einer Unzulänglichkeit des Systems pDEW:: $P_{STM1257}$ liegen, etwa durch fehlerhafte Klonierung aufgrund unzureichender Annotation der Promotorregion oder durch inkorrekte Restriktion bei der Klonierung. So kann keine Induktion stattfinden, selbst wenn der Promotor im Bakterium bei der angelegten Bedingung induziert werden würde.

Alle eingeführten Mutationen wirkten sich massiv auf die Fähigkeit des Bakteriums aus, intrazellulär zu proliferieren. Durch Modifikation der Zellkulturexperimente auf 35 Minuten Infektionszeit konnte jedoch für die Deletionsmutanten in STM1257 der Nachweis erbracht werden, dass ein Defekt in diesem System bereits das Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle massiv stört, was sich im Zellkulturassay sowohl nach einer als auch nach sieben Stunden Infektionszeit durch eine verminderte KbE-Zahl bemerkbar machte. Es handelt sich folglich um ein adhäsions- und/oder invasionsvermittelndes Transportsystem. Auf den zur

Bestätigung angefertigter fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen DAPI-markierter Bakterien während der Infektion der Wirtszellen (siehe Abbildung 21) ist deutlich die Lokalisierung der wildtypischen Mutanten 35 Minuten nach der Infektion an bzw. in der Wirtszelle in membrangebundenen Vakuolen zu erkennen, während bei Infektion mit der Deletionsmutante deutlich weniger Bakterien an der Wirtszelle zu beobachten sind. Eventuell adhäsionsdefekte Bakterien werden in diesem Assay durch die Waschschriffe mit PBS von der Zelle abgespült. Es scheint also bereits ein Adhäsionsdefekt in dieser Deletionsmutante vorzuliegen. In der mit pBR322::STM1257 *in trans* komplementierten Mutante sind wieder ähnlich viele an bzw. in der eukaryotischen Zelle lokalisierte Mutanten zu erkennen wie bei der wildtypischen Kontrolle. Auch kann so eine 80%ige Wiederherstellung der Invasionsfähigkeit der Bakterien im Zellkulturassay erreicht werden, womit der kausale Zusammenhang zwischen der eingeführten singulären Mutation in diesem Gen und dem beobachteten Phänotyp bewiesen werden konnte.

Auffällig ist außerdem, dass mutagenisierte Bakterien, die einmal in die Wirtszelle eindringen konnten, sich wildtypisch vermehren. Dieser Befund stützt die These, dass es sich hier um adhäsionsdefekte Mutanten handelt. Sind einige Bakterien trotz des Defekts in die eukaryotische Zelle eingedrungen, etwa durch die normale Phagozytose des Makrophagen, so vermehren sie sich wildtypisch.

In *S. typhimurium* wurden bislang 76 Proteine identifiziert, die an ABC-Transportsystemen beteiligt sind. Dies entspricht etwa 22 % der am Substrattransport beteiligten Proteine des Organismus [223]. Diese ABC-Transportsysteme spielen bekanntermaßen auch eine Rolle bei der Virulenz von Bakterien [217]. Systeme, die an der Adhäsion oder Invasion von pathogenen Bakterien in Zellen des Wirts beteiligt sind, konnten jedoch bislang nicht identifiziert werden. Lediglich bei enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) wurde ein ABC-Transportsystem identifiziert, welches das Protein Dispersin exportiert, das die Verteilung der Bakterien auf der intestinalen Schleimhaut begünstigt [271].

Kürzlich wurde über eine Abhängigkeit des Gens STM1257 vom Zweikomponenten-Regulationssystem PmrA-PmrB spekuliert, das auch bei der Virulenz des Bakteriums eine Rolle spielt [272]. Tamayo et al. hatten einen DNA-Mikroarray verwendet, um die Genregulation in PrmA-Nullmutanten zu untersuchen. 40 signifikant regulierte Gene, darunter STM1257, wurden identifiziert, eine Validierung mit *lacZ*-Transkriptionsfusionen konnte die Regulation dieses Gens durch PmrA jedoch nicht bestätigen.

In dieser Arbeit konnte erstmalig der Beweis erbracht werden, dass die Gene des Operons STM1255 mit STM1259, welche für einen putativen ABC-Transporter kodieren, wichtig für die Adhäsion von *S. typhimurium* an kultivierte eukaryotische Zellen sind.

4.2.3 Genomische Insel GEI2016/2058 (*cob-cbi-pdu*-Gencluster)

Gene, die für Enzyme des Kohlenhydrat-, Nukleotid- oder Aminosäuremetabolismus kodieren, oft auch Haushaltsgene genannt, werden häufig in Anwendungen der signaturmarkierten Mutagenese identifiziert [141, 142] und spielen bekanntermaßen eine Rolle bei der Virulenz. Ergebnisse aus der in dieser Arbeit durchgeführten Studie, welche die wichtige Rolle der Nährstoffaufnahme für das intrazelluläre Überleben und Wachstum zeigen, liegen sowohl für Insertionen in Gene der Cobalaminsynthese als auch für die Insertion in ein Gen aus dem *pdu*-Operon (*pduK*) vor. Das *pdu*-Operon befähigt die Bakterienzelle, Propandiol als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen. Dieser Stoffwechselweg sowie der Abbau von Ethanolamin als Kohlenstoffquelle benötigt Cobalamin (Vitamin B₁₂) als Kofaktor [199, 204, 273-276]. Der Abbau von 1,2-Propandiol könnte eine Rolle bei der Interaktion von *Salmonella* mit dem Wirtsorganismus spielen. Für Gene des *pdu*-Operons konnte bereits in IVET-Studien gezeigt werden, dass die kodierten Genprodukte wichtig für das Wachstum im Wirtsgewebe sind [277]. Studien mit kompetitivem Index in Mäusen zeigten außerdem, dass *pdu*-Mutationen für einen Virulenzdefekt verantwortlich sind [278]. Mutationen in den *cob*-Genen zeigen keinen identifizierbaren Wachstumsphänotyp unter Laborbedingungen [199]. Eine von Sampson und Gotschlich [279] publizierte Erhöhung der Virulenz in *S. typhimurium*-Stämmen ohne funktionelles *cob*-Operon konnte allerdings widerlegt werden [280]. Die von Sampson und Gotschlich vermutete Hypervirulenz kommt durch eine uncharakterisierte Mutation im verwendeten nichtisogenischen „Wildtyp“ zustande, nicht durch den Defekt in den *cob*-Genen [280]. Eine Mutante im für den globalen Regulator CsrA kodierenden Gen zeigt eine zehnfache Reduktion der Expression der Gene *cbiACDFGHLKMPO* und *cobSTU*. Auch die Gene des *pdu*-Operons werden in der CsrA-Mutante nur schwach exprimiert. Die Gene des *cob-cbi-pdu*-Genclusters werden also anscheinend vom Protein CsrA reguliert, welches auch als Invasionsgenregulator die Gene des SPI-1 beeinflusst [213, 281]. Im Gegensatz zum nahen Verwandten *E. coli* kann *Salmonella* Cobalamin *de novo* synthetisieren [199, 213], was durch den nichtkollinearen Charakter dieser Genominsel deutlich wird.

Vier Vektorinsertionen in drei Genen des *cob-cbi-pdu*-Genclusters der Genominsel GEI2016/2058 erzeugen einen attenuierten Phänotyp bei der Infektion der eukaryotischen

Wirtszelle. Der attenuierende Effekt auf *cobS* konnte durch eine in diesem Gen eingeführte Deletion bestätigt werden. Die starke Diskrepanz zwischen den Attenuationsgraden der Insertionsmutanten in *cobS* ($12,6 \pm 7,4$ % bzw. $18,9 \pm 0,8$ % des Wildtypwertes) und der Deletionsmutante in diesem Gen ($68,3 \pm 12,5$ % des Wildtypwertes) kann durch einen polaren Effekt der Insertionsmutante auf *cobT* sowie eine generelle Variabilität beider Untersuchungsmethoden erklärt werden. Die Relevanz der genomischen Insel GEI1528/1562 für das intrazelluläre Überleben von *S. typhimurium* wird durch den Befund gestärkt, dass eine Mutation im Hauptregulatorgen *pocR* die Replikationsrate im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 8,3 herabsetzt ($12,0 \pm 6,7$ %). Die Mutation in *pocR* betrifft sowohl die Cobalaminsynthese als auch den Propandiolabbau [200] (siehe 3.3.1).

Die Mechanismen der Cobalaminsynthese und des cobalaminabhängigen Propandiolkatabolismus in *S. typhimurium* sind gut untersucht und größtenteils aufgeklärt. Bislang konnten allerdings wenige konkrete Hinweise auf eine Rolle dieses Genclusters bei der intrazellulären Replikation und/oder Virulenz des Organismus gefunden werden [277, 278]. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen zu zeigen, dass sowohl einzelne Gene des *cob*- und des *pdu*-Operons eine, wenn auch teilweise subtile, Rolle bei der intrazellulären Proliferation von *Salmonella* spielen als auch, dass ein Ausschalten des zentralen Regulators beider Operons die intrazelluläre Überlebensfähigkeit des Bakteriums massiv beeinträchtigt.

4.2.4 Genomische Inseln GEI0266/0307 (SPI-6) und GEI1664/1678

Bei der Genominsel GEI0266/0307 handelt es sich um das kürzlich identifizierte *Salmonella pathogenicity island 6* (SPI-6), auch SCI (*Salmonella enterica centrisome 7 genomic island*) genannt [129]. Vier pIDM1-Insertionen in diesem Bereich des Genoms führten zu einer signifikanten Reduktion der Replikation von *S. typhimurium* im murinen Makrophagen J-774A1.

Eine von Folkesson et al. durchgeführte Deletion der gesamten Region von SPI-6 führte nicht zu einem Effekt auf die systemische Pathogenität von *Salmonella*, hatte aber Einfluss auf die Invasivität in kultivierten eukaryotischen Zellen [129]. Verschiedene, durch Gene der genomischen Insel GEI0266/0307 kodierte Faktoren, wie etwa SirA, eine Shiga-ähnliche Toxin-Untereinheit, oder ein Homolog des putativen Invasionsgens *pagN* [129, 282], könnten zu diesem Phänotyp beitragen. Das Vorhandensein von Genen, die Homologe zu putativen virulenzassoziierten Faktoren kodieren, zeigten, dass diese Region genauerer Studien bedarf.

Nach den in dieser Arbeit ermittelten Zellkulturdaten spielen unter anderem ein Transkriptionsregulator, das Protein SinR und eine putative Clp-ähnliche Protease eine Rolle

in der intrazellulären Replikation. Da Salmonellen die Expression virulenzassoziierter Gene in Bezug auf die jeweilige Umgebung regulieren müssen, stellen Regulatoren eine wichtige Klasse von Faktoren für das intrazelluläre Überleben und Wachstum dar. Die Mutante in *SinR* konnte in dieser Arbeit als attenuiert identifiziert werden ($33,8 \pm 15,9$ % Überlebensrate verglichen mit der Wildtypkontrolle). Die von Folkesson et al. [129] beschriebene Rolle von SPI-6 bei der Invasivität des Pathogens könnte auch durch die Gene des *safABCD*-Clusters vermittelt sein, die wahrscheinlich an der Biogenese der Fimbrien beteiligt sind [282, 283], jedoch zeigen *safA*-Mutanten keinen Effekt im Mausmodell. In dieser Arbeit wurde ein unklares Ergebnis für die Rolle von *SafC* bei der intrazellulären Replikation von *S. typhimurium* erzielt. Obwohl die Insertionsmutante eine Attenuation von $28,8 \pm 2,6$ % zeigt, ist die Deletionsmutante nicht attenuiert. Dies ist wahrscheinlich, wie bereits diskutiert, auf einen polaren Effekt der *safC*-Insertion auf *safD* zurückzuführen.

Zusätzlich zum putativen Transkriptionsregulator *sinR* wurde noch eine Mutante in einem bislang unbekanntem Gen (STM1677) als attenuiert identifiziert ($3,5 \pm 1,8$ % als Insertionsmutante und $19,2 \pm 5,8$ % als Deletionsmutante), dessen Genprodukt anscheinend eine Aktivität als Transkriptionsregulator der LysR-Familie besitzt (Annotation [93]). Transkriptionsregulatoren vom LysR-Typ (LTTR) kommen in einer großen Zahl von Bakterienspezies vor und stellen die größte Familie prokaryotischer Transkriptionsregulatoren dar [284, 285]. Sie regulieren ein weites Feld von zellulären Prozessen und auch die Virulenz der Organismen [286-288]. So ist etwa der Virulenzregulator SpvR in *Salmonella* ein LTTR [289]. Nukleotidsequenzvergleiche zeigten zwar eine 98%ige Übereinstimmung der Gensequenz mit den Sequenzen von *S. typhi*, *S. choleraesuis* und *S. paratyphi*, eine genaue Funktionszuordnung konnte aber auf Basis dessen nicht getroffen werden.

Weiterhin interessant ist die Tatsache, dass das in dieser Arbeit nicht mutagenisierte Gen STM1676 innerhalb der zu *E. coli* nichtkollinearen Insel GEI1664/1678 eine starke Homologie (e-Wert = 10^{-57}) zu einem Genabschnitt des Lebensmittelpathogens *E. coli* O157:H7 hat. Dieselbe Homologie findet sich auch zu *Shigella sonnei* (e-Wert = 10^{-53}), einem ebenfalls pathogenen Organismus. Dies weist auf eine mögliche Rolle von GEI1664/1678 in der Pathogenität dieser drei nahe verwandten Spezies hin. Selbiges Gen wird auch im von Eriksson et al. erstellten Expressionsprofil als 2,1fach hochreguliert während der Infektion des Makrophagen beschrieben [144].

Da die Attenuation der intrazellulären Überlebensrate von 14028STM1677::pIDM1 weit unter dem von 14028*phoP*(593)::pIDM gesetzten Schwellenwert von 10 % liegt und die Gruppe der

LTTR-Regulatoren bekannte Virulenzfaktoren enthält, kann man davon ausgehen, dass GEI1664/1678 mit großer Wahrscheinlichkeit neue Virulenzfaktoren für das intrazelluläre Überleben von *S. typhimurium* kodiert. Insbesondere, da ein weiteres Gen der Insel eine starke Homologie zu anderen pathogenen Organismen besitzt.

4.2.5 Genomische Insel GEI1528/1562

Zehn pIDM-Insertionen liegen in dieser 39512 Basenpaare langen Genominsel, die hauptsächlich noch uncharakterisierte Proteine kodiert. Der beobachtete Attenuationsgrad dieser Mutanten ist relativ gering und schwankt zwischen $15,2 \pm 5,6$ % und $78,6 \pm 13,5$ %. Drei dieser Insertionen wurden durch zielgerichtete Mutagenese von STM1540, STM1554 und STM1558 im Rahmen dieser Arbeit erzeugt. Die Deletionsmutante in STM1555 hat einen Attenuationsgrad von $35,1 \pm 8,7$ %. Durch Komplementation der Gendeletion in STM1555 *in trans* konnte die intrazelluläre Überlebensfähigkeit auf $67,2 \pm 12,4$ % des Wildtypniveaus wiederhergestellt werden, was den kausalen Zusammenhang zwischen Gendeletion und beobachtetem Phänotyp bestätigt.

Zwei der identifizierten Gene, STM1558 und STM1559, zeigen Domänen, die ähnlich zu GlgB, einem 1,4- α -Glukan-verzweigenden Enzym der Glykogenbiosynthese [290], und zu α -Amylasen (e-Werte: 6×10^{-34} und 2×10^{-17}) sind. Ein hypothetischer Na^+/H^+ -Antiporter (STM1556), der eine Rolle bei der Energieproduktion und Energiekonversion spielt, sowie sein putativer Transkriptionsregulator (STM1555) wurden ebenfalls als wichtig für die intrazelluläre Replikation von *S. typhimurium* befunden.

Das Gen STM1543 zeigt Ähnlichkeit mit *uhpC* (e-Wert: 10^{-26}), einem membrangebundenen Sensor für externes Glukose-6-Phosphat, welches regulatorisch am Zuckerphosphattransport von *Salmonella* und *E. coli* beteiligt ist [291, 292]. *uhpC*-Gene kommen auch in *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* und *Chlamydia pneumoniae* vor [291, 293]. STM1542 kodiert wahrscheinlich für eine zinkbindende Alkohol-Dehydrogenase.

Zwei weitere mutagenisierte Gene dieser Insel spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Biogenese der Zellhülle (STM1540) und beim Aufbau einer Hydrogenase (STM1534). Letzteres bestätigt die kürzlich von Maier [294] publizierte Beobachtung, dass respiratorischer Wasserstoffverbrauch durch *S. typhimurium* essenziell für die Virulenz im Mausmodell ist. Die Mutante in STM1543 stellte sich jedoch als wachstumsdefizient dar, weshalb für sie keine Zellkulturdaten erhoben wurden. Dennoch wurde das Gen STM1543 im vorläufigen *Screen* [187] als Kandidat für virulenzwichtige Gene eingestuft. Dieser

Sachverhalt validiert die getroffene Vorauswahl an zu untersuchenden Mutanten für Zellkulturexperimente.

Tabelle 20: Putative Funktion der Gene von GEI1528/1562

Gene die Vektorinsertionen tragen sind grau hinterlegt. Quelle: [93]

Gen	Vorhergesagte Funktion
STM1528	Putatives äußeres Membranprotein
STM1529	Putatives inneres Membranprotein
STM1530	Putatives äußeres Membranprotein
STM1531	Putative Hydrogenase
STM1532	Putatives Dehydrogenaseprotein
STM1533	Putative Hydrogenase
STM1534	Putative Hydrogenase
STM1535	Putatives Hydrogenaseprotein
STM1536	Putative Hydrogenasereifungs-Protease
STM1537	Putative Ni/Fe-Hydrogenase 1 b-Typ Zytochromuntereinheit
STM1538	Putative Hydrogenase-1, große Untereinheit
STM1539	Putative Hydrogenase-1, kleine Untereinheit
STM1540	Putative Hydrolase
STM1541	Putatives regulatorisches Protein, gntR-Familie
STM1542	Putative zinkbindende Dehydrogenase
STM1543	Putatives Transportprotein
STM1544	PhoP/Q-reguliertes Protein <i>pqaA</i>
STM1545	Putatives Multidrug-Effluxprotein
STM1546	Putative Monooxygenase
STM1547	Putativer <i>marR</i> -Familie-Transkriptionsregulator
STM1548	Putative S-Adenosylmethionin:tRNA- Ribosyltransferase-Isomerase
STM1549	Putativer Translationsinitiierungsinhibitor
STM1550	Putatives zytoplasmatisches Protein
STM1551	Putatives zytoplasmatisches Protein
STM1552	Putatives zytoplasmatisches Protein
STM1553	Pseudogen, Leserasterverschiebung
STM1554	Putatives <i>coiled-coil</i> -Protein
STM1555	Putativer Transkriptionsregulator
STM1556	Putativer Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
STM1557	Putative Aminotransferase
STM1558	Putative Glykosylhydrolase
STM1559	Putative Glykosylhydrolase
STM1560	Putative α -Amylase
STM1561	Putatives äußeres Membranprotein oder sekretiertes Lipoprotein
STM1562	Putatives periplasmatisches Transportprotein

Ein SlyA-reprimiertes Gen und *pqaA* [295], das von PhoP/Q reguliert wird, liegen ebenfalls auf dieser Insel, was den virulenzassoziierten Charakter dieser Gene unterstreicht.

Interessanterweise ist eines der gefundenen Gene, STM1555, in *S. typhi* nicht vorhanden und keine zu STM1554 homologen Regionen konnten in *S. paratyphi* gefunden werden. Es konnten keine Homologien der gesamten genetischen Insel über mehr als 20 kb Länge innerhalb des Genus *Salmonella* bzw. keine Homologien länger als 550 Nukleotide zu anderen Spezies identifiziert werden. Homologien beschränken sich in der Regel auf kurze Teilstücke von etwa 200-300 Nukleotiden. Dies zeigt zum einen die Salmonellenspezifität dieser Insel, zum anderen erschwert es natürlich eine Zuordnung von, wenn auch lediglich putativen, Funktionen zu den Genen dieser Insel.

Zusammengenommen sind die Gene der GEI1528/1562 wahrscheinlich an Energieumwandlung, Zucker- und Kohlenhydrattransport und Aminosäurestoffwechsel beteiligt, was zu leichten Wachstumsvorteilen im intrazellulären Milieu führt.

4.2.6 Genomische Inseln GEI1171/1184 und GEI1911/1925 (Flagellenoperon und Chemotaxisgene)

Drei Insertionen in zwei Genen *flgE* und *flgH* zeigen eine attenuierende Wirkung von $20,6 \pm 9,6$ %, $28,4 \pm 10,6$ % bzw. $17,7 \pm 5,4$ % intrazellulärem Wachstum der Stämme verglichen mit der Wildtypkontrolle nach sieben Stunden Infektion. Die betroffenen Gene liegen in einem aus zwei Operons bestehenden Bereich von STM1171 bis STM1184 (GEI1171/1184), der die *flg*-Gene für die Biosynthese der Flagellen von *S. typhimurium* kodiert (*flgA-M*). Die Flagellen sind die wichtigsten Organellen der Motilität von Bakterien und spielen eine große Rolle im Lebenszyklus und der Virulenz der Bakterien [296-298]. Die Synthese der Flagellen wird durch eine kaskadenartige Anordnung mehrerer Klassen von Genen reguliert, wobei die Expression einer Klasse Voraussetzung für die Transkription der nachfolgenden Klassen ist [299, 300]. *flgE* codiert für den aus 120 Kopien eines einzigen Proteins (FlgE) bestehenden hohlröhrenähnlichen Flagellenhaken [301, 302]. *flgH* codiert für ein Genprodukt, aus dem der äußere Membran-L-Ring des Basalkörpers der Flagelle konstruiert wird [303-305].

Über die Assoziation der Flagellengene von *S. typhimurium* mit der Virulenz des Organismus ist bislang wenig und teilweise widersprüchliche Information verfügbar. Die Rolle der Flagellengene bei der Virulenz von *Salmonella* konnte am Beispiel der *flg*-Gene in kultivierten Makrophagen und in der Maus gezeigt werden [306]. *flgE*-Mutanten in *Vibrio vulnificus* sind ebenfalls in der Maus virulenzattenuiert und die Adhärenz an eukaryotische Zellen ist deutlich verringert [307]. Lockman und Curtiss zeigten jedoch bereits 1990, dass flagellenlose *S. typhimurium* zwar reduziert invasiv in kultivierten Zellen sind, jedoch im Mausmodell nicht virulenzattenuiert sind [308]. Untersuchungen einer *flhD*-Mutante, dem

Hauptregulator der Flagellengene, zeigten eine erhöhte Virulenz in der Maus und eine etwas stärkere intrazelluläre Wachstumsrate in kultivierten Makrophagen, jedoch eine erniedrigte Invasivität in humanen und murinen intestinalen Epithelzellen in Kultur [195], verglichen mit dem wildtypischen Bakterium, und bestätigen damit die von Lockman und Curtiss gemachten Beobachtungen hinsichtlich der reduzierten Invasivität, nicht jedoch hinsichtlich der Virulenz im Mausmodell. Die Komplexität der Thematik zeigt die Tatsache, dass die *flg*-Gene unter Kontrolle des globalen Regulators der Invasionsgene in *Salmonella*, CsrA, stehen, was auf eine Rolle bei der Virulenz des Bakteriums hinweist [213]. Gleichzeitig besitzt *flgDC* einen positiven regulatorischen Effekt auf *hilA*, welches wiederum ein Positivregulator für die Invasionsgene von SPI-1 ist [112, 309, 310]. Das Gen *fliZ*, welches einen Positivregulator für Flagellen in *Salmonella* kodiert, wirkt ebenfalls auf *hilA* ein [311]. Während Eriksson et al. eine Herunterregulation der Gene *flgE* und *flgH* um den Faktor 50 bzw. 16,7 im Mikroarrayexperiment gefunden haben [144], zeigen diese Gene in Zellkultur Attenuationswerte von $17,7 \pm 5,4$ % bis $28,4 \pm 10,6$ %. Anscheinend sind die Produkte der Flagellengene für die frühe Phase der Infektion des Makrophagen notwendig, werden aber für den Ablauf der intrazellulären Replikation des Pathogens nicht mehr in diesem Ausmaß benötigt, so dass eine Herunterregulation der Genexpression stattfinden kann. Die besprochene reduzierte Invasivität von *flg*-Mutanten in kultivierten Wirtszellen könnte teilweise in den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten zum Tragen gekommen sein. Jedoch wurde, wie bereits in 3.1.3 beschreiben, zwar ein vermindertes intrazelluläres Wachstum der Stämme mit Insertionen in *flgE* und *flgH* festgestellt. Es wurde aber anhand des KbE-Werts eine Stunde nach der Infektion kein massiver Invasionsdefekt verglichen mit der wildtypischen Kontrolle beobachtet, der dem Schwellenwert des Kontrollstamms 14028*ratA*::pIDM1 nahe käme.

Die enge Verzahnung von Regulationswegen und die wechselseitige Abhängigkeit der Expression bestimmter Gene voneinander wird besonders am Beispiel der Flagellensynthese in *Salmonella* deutlich. Es ist nicht sicher davon auszugehen, dass ein singulärer *Knockout* eines Gens der Flagellenbiosynthese tatsächlich einen direkt kausal korrelierten Phänotyp erzeugt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit teilweise nur am intrazellulären Überleben beteiligte Gengruppen statt einzelner Gene definiert, so auch im Fall der Flagellengene.

Bei der Insertion in das Gen STM1921 (*cheA*) der Insel GEI1911/1925, mit einem Attenuationswert von $17,3 \pm 8,6$ %, handelt es sich um eine Histidin-Proteinkinase, die als

Sensorkinase eines Zweikomponentensystems fungiert, welches die Chemotaxis in *Salmonella* reguliert. Mutanten in Chemotaxisgenen zeigen voll funktionsfähige Flagellen, können aber nicht zielgerichtet auf chemotaktische Reize reagieren und schwimmen daher gleichmäßig in Flüssigkeiten [194, 312, 313].

Im Gegensatz zu Mutanten in den Flagellengenenen zeigte sich bei Mutanten des Chemotaxissystems in *Salmonella* eine erhöhte Invasivität für kultivierte Säugerzellen und für Zellen der Peyer'schen Plaques im Mausmodell [194]. Mutanten in *cheY*, dem Responseregulator der bakteriellen Chemotaxis [314], zeigen keine signifikante Kolonisierung der Leber und Milz im Mausmodell sowie eine stark verminderte inflammatorische Reaktion. Anscheinend ist eine chemotaktische Bewegung durch die Schleimschicht des Darms Voraussetzung für die Induktion einer Kolitis im Mausmodell [312]. *cheA* wird, ebenso wie die Gene der Flagellensynthese, von CsrA reguliert. Im *csrA-Knockout* werden sie 3-5fach herunterreguliert [213].

Eine erhöhte Invasivität der *cheA*-Mutante konnte im Zellkulturexperiment auch nach vierfacher Reproduktion nicht beobachtet werden. Die Mutante verhält sich ebenso wie ein Großteil der untersuchten Stämme nach einer Stunde post Infektion. Dies widerspricht der von Jones et al. [194] gemachten Beobachtung, eine Ursache hierfür konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden.

4.2.7 Doppelmutanten in vier genomischen Inseln

Es wurden fünf Doppelmutanten in vier genomischen Inseln konstruiert, bei denen zusätzlich zu einer Gendeletion eine Vektorinsertion in einem Gen derselben genomischen Insel, jedoch in verschiedenen Transkriptionseinheiten eingeführt wurde. Es konnte in vier von fünf Fällen gezeigt werden, dass ein additiver Effekt auf die Attenuation der intrazellulären Überlebens- und Proliferationsfähigkeit durch die Einführung mehrerer Mutationen in Gene derselben genomischen Insel entsteht. In Stamm 14028 Δ 1677/1672::pIDM1 konnte kein solcher Effekt gezeigt werden, was wahrscheinlich durch die vorhergesagte regulatorische Funktion von STM1677 oder einen nicht identifizierten polaren Effekt der Vektorinsertion in STM1672 erklärt werden kann. Einen signifikant gegenüber den jeweiligen Einzelmutanten abgesenkten Attenuationsgrad zeigen die Doppelmutanten in GEI1528/1562, GEI2016/2058 (*cob-cbi-pdu*-Gencluster) und GEI2584/2626 (Gifsy-1 Prophage). Gerade bei den Genen des GEI1528/1562 und GEI2016/2058 ist meist nur eine schwache Attenuation des intrazellulären Überlebens der jeweiligen Einzelmutanten zu beobachten. Durch die Einführung von zwei Mutationen in diesen Inseln konnte aber gezeigt werden, dass diese geringen Beiträge zusammengenommen

einen additiven Effekt ergeben, der signifikant zur intrazellulären Fitness der Bakterien beiträgt. Auch im Fall von Gifsy-1, dessen *Knockout* als schwach attenuierend beschrieben wurde [94, 260], zeigt der Attenuationsgrad der beiden Doppelmutanten dieser Insel, dass ein Zusammenspiel mehrerer Gene, die für sich betrachtet nur schwach am intrazellulären Überleben beteiligt sind, einen erheblichen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit des Bakteriums hat. Diese Befunde bestätigen die vermutete Assoziation der gesamten Inseln mit der intrazellulären Replikation von *Salmonella* spp..

4.3 Zusammenfassende Betrachtung

An dieser Stelle soll abschließend eine resümierende Betrachtung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stattfinden.

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Insertions-Duplikations-Mutagenesemethode eine effiziente Technik zur Identifikation potenzieller Virulenzfaktoren von *S. typhimurium* ist. Aus einem *Screen* mit etwa 60 % Genomabdeckung [160, 161] konnten durch sorgfältige *in silico*-Analyse und *in vitro*-Untersuchung der Wachstumscharakteristika 164 Stämme mit Vektorinsertionen in Genen ausgewählt werden, die eine vermutete Rolle beim intrazellulären Überleben des Bakteriums spielen könnten. Von diesen liegen mindestens 41 auf nichtkollinearen genomischen Inseln. Die Stämme wurden auf ihre Replikationsfähigkeit im murinen Makrophagen J-774A.1 untersucht. Durch Konstruktion zielgerichteter Insertionsmutanten und Deletionsmutanten in ausgewählten Genen konnten die Resultate der Zellkulturversuche untermauert werden. Lediglich im Fall von *safC* gelang dies nicht, da wahrscheinlich ein polarer Effekt der Insertion auf *safD* den hohen Attenuationswert erzeugt hatte.

Die sehr heterogenen und teilweise großen Standardabweichungen der Zellkulturdaten kommen durch mehrere Faktoren zustande. Zum einen sind Versuche in lebendem Zellgewebe nicht absolut reproduzierbar, da trotz kontrollierter Bedingungen die Wachstumscharakteristika der Wirtszellen von Versuchstag zu Versuchstag leicht schwanken. Zum anderen spielt die Wachstumsphase der zur Infektion gebrachten Bakterien eine entscheidende Rolle. Diese wurde zwar so konstant wie möglich eingestellt, geringe Abweichungen durch Verdünnungsfehler und Chargenschwankungen in den verwendeten Kulturmedien und Antibiotikallösungen sowie Messfehler des verwendeten Spektrometers sind jedoch nicht auszuschließen. Außerdem spielen Pipettier-, Verdünnungs- und Auszählfehler bei der Durchführung des Assays eine Rolle bei der Verlässlichkeit der Daten. Es wurde bei allen Versuchen in dieser Arbeit auf ein Höchstmaß an Standardisierung bei den

Versuchsabläufen und verwendeten Materialien geachtet, dennoch treten Abweichungen zwischen den Einzelexperimenten auf. Um deren Effekt zu minimieren, wurden stets Kontrollstämme mitgeführt. Eine Normierung der errechneten KbE-Werte auf die jeweilige versuchsinterne Kontrolle sowie Signifikanzberechnungen mittels des Student-t-Tests, garantieren vergleichbare Ergebnisse. Auszählfehler konnten durch die Berechnung des gewichteten Mittelwerts anstelle des arithmetischen Mittelwerts deutlich verringert werden. Generell stellt sich bei der Diskussion der Reproduzierbarkeit von Daten die Frage, auf welcher Ebene man diese ansetzt. In einem konsekutiven Versuchsaufbau müssten alle Experimente an verschiedenen Tagen, mit voneinander verschiedenen Chargen eukaryotischer Zellen und verschiedenen angelegten Bakterienkulturen reproduziert werden. Dies wäre jedoch bei der breit angelegten Untersuchung auf intrazelluläre Überlebensdefekte in dieser Arbeit aus Zeit- und Materialgründen nicht möglich gewesen. Ein anderer, wenn auch umstrittener Ansatz ist die parallele Durchführung mehrerer Reproduktionen desselben Versuchs in einem großen Ansatz. Hier ist aber keine absolute Unabhängigkeit der erhobenen Daten voneinander gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Versuche so unabhängig wie möglich, aber im Rahmen der Durchführbarkeit zu halten, etwa durch verschiedene Übernachtkulturen eines Stamms, die am Infektionstag zum Inokulieren der Wirtszellen benutzt wurden. Außerdem wurden diese beiden Versuche mindestens ein weiteres Mal an einem anderen Versuchstag reproduziert. Ein Teil der beobachteten Abweichungen kann sicherlich auch durch diese Vorgehensweise in Verbindung mit den bereits erläuterten Schwankungen der Wirtszell- und Bakterienkulturen erklärt werden.

Die bereits erwähnten Abweichungen der Wachstumscharakteristika und des intrazellulären Proliferationsverhaltens tetracyclinresistenter Mutanten vom 14028-Wildtyp ohne Resistenzen kann durch die Präsenz der Plasmide pIDM1/pIDM4 bzw. pBR322 erklärt werden. Wie von Abromaitis et al. publiziert, nimmt das *tet*-Gen der Klonierungsvektoren Einfluss auf das intrazelluläre Überleben im Makrophagen. Für eines der von Abromaitis et al. untersuchten Plasmide konnte außerdem eine Verschiebung der Wachstumskurve der Bakterien im Kulturmedium festgestellt werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die Präsenz des *tet*-Gens die untersuchten Bakterienstämme empfänglicher für die Abtötung mit Gentamycin macht [196]. Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie, für Versuche mit Insertionsmutanten ebenfalls tetracyclinresistente Kontrollen, nämlich Insertionsmutanten in *phoN* und *phoP*, und bei Komplementationsversuchen Kontrollstämme mit dem zur Klonierung verwendeten Plasmid pBR322 mitzuführen, hat sich folglich als richtig

herausgestellt. Es wurde so vermieden, dass eine Verfälschung der erhobenen Daten durch die Verwendung nicht adäquater Kontrollstämme eintrat.

Es stellt sich nun die Frage der Übertragbarkeit der *in vitro*-Zellkulturdaten auf *in vivo*-Modelle, etwa das Maus- oder das Kälbermodell. Es hat sich gezeigt, dass Daten aus Zellkulturexperimenten nicht vorbehaltlos auf das Tiermodell übertragbar sind. In der Zellkultur kann unter gut kontrollierbaren Bedingungen die Reaktion eines bestimmten Zelltyps auf den bakteriellen Organismus untersucht werden. *In vivo* besteht die Reaktion auf das eindringende Pathogen aber im Regelfall aus einer komplexen Interaktion mehrerer verschiedener Zelltypen, Regelmechanismen und Signalkaskaden. Diese Bedingungen sind nicht nur komplexer als *in vitro*, sondern ändern sich im Verlauf der Infektion, etwa in Antwort auf Inflammation, Gewebeerstörung und Migration der Bakterien [315, 316]. Auch die Wahl der Zelllinie für *in vitro*-Versuche beeinflusst maßgeblich die Ergebnisse von Studien. So wurden in dieser Arbeit murine Makrophagen der Linie J-774A.1 gewählt, weil diese eine Abtötungskapazität ähnlich BALB/c-Mausmakrophagen aus dem Bauchfell (peritoneale Makrophagen) zeigen, aber weniger effizient die intrazelluläre Replikation limitieren. *Salmonella* repliziert in diesen Zellen nachweislich am besten. Peritoneale Makrophagen hingegen sind wenig permissiv für die intrazelluläre Replikation [317, 318]. Ebenso wichtig ist die Wahl eines geeigneten Tiermodells für *in vivo*-Versuche. Wie bereits in 1.1.2 dargelegt, ist das Mausmodell für die Untersuchung nichttyphoider Salmonellen bedingt geeignet-hier hat sich etwa das bovine Modell besser bewährt [36, 38].

Obwohl in den letzten Jahren viel Arbeit in die Entwicklung komplexerer *in vitro*-Modelle investiert wurde, die die Situation *in vivo* besser nachstellen sollen, bringt der Übergang von *in vitro* zu *in vivo*-Modellen dennoch eine Vielzahl an kaum beeinflussbaren Faktoren mit sich, die eine Interpretation extrem schwierig machen [316]. Die unterschiedlichen Bedingungen *in vitro* und *in vivo* haben laut Smith [315] drei bedeutsame Implikationen. Erstens: Putative Virulenzfaktoren, die *in vitro* gefunden wurden, müssen nicht zwangsläufig *in vivo* produziert werden. Zweitens: Einige der Virulenzdeterminanten, die *in vivo* produziert werden, müssen nicht unbedingt auch *in vitro* produziert werden. Und drittens: Die gegenseitige Ergänzung der Virulenzdeterminanten kann sich über den Zeitverlauf und die anatomische Lage der Bakterien im Wirt verändern. Letzteres gilt beispielsweise für Typ-III-Sekretionssysteme, die erst in bestimmten Phasen der Infektion benötigt werden, wie etwa das Typ-III-System des SPI-2, das für das intrazelluläre Überleben im Makrophagen benötigt wird [120, 121].

Für die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vitro*-Daten soll Folgendes postuliert werden: Da die Durchführung der Untersuchungen auf attenuierende Wirkung der eingeführten Mutationen im murinen Makrophagen mit großer Gründlichkeit, vierfacher Redundanz, unter Ausschluss einer möglichen Wachstumsdefizienz und unter Mitführung geeigneter Kontrollen durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass Mutationen in Genen, die in etwa auf dem Niveau des Virulenzregulators *phoP* [130, 135, 136] liegen (siehe 3.3.3), auch *in vivo* relevant für die Virulenz von *S. typhimurium* sind. Dazu zählen Gene der beiden lysogenen Prophagen Gifsy-1 und Gifsy-2, ein putativer Transkriptionsregulator, eine putative Integrase und Gene des *cob-cbi-pdu*-Genclusters. Für das Gen (*gipA*) wurden bereits im IVET-Screen und im kompetitiven Assay im Mausmodell gezeigt, dass es die Virulenz von *S. typhimurium* beeinflusst [216]. Auch Mutanten in Genen des *pdu*-Operons zeigen, wie bereits diskutiert, eine Attenuation im Mausmodell [278]. Diese Befunde validieren die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Sicherlich gehören in diese Gruppe auch die Gene des putativen ABC-Transporters STM1255 mit STM1259, da hier jedoch statt eines intrazellulären Überlebensdefekts ein Adhäsionsdefekt vorliegt, werden diese Gene nicht der besprochenen Gruppe zugeordnet.

Für neun weitere Gene, die im Insertionsmutanten-Screen gefunden wurden, kann eine eventuelle Rolle bei der Virulenz von *Salmonella* postuliert werden, da in allen Fällen eine Attenuation der Virulenz um etwa das Vier- bis Fünffache verglichen mit der Wildtypkontrolle eintrat (Schwellenwert 22 %). Diese Gruppe setzt sich aus einem Gen des SPI-6, Genen der beiden Prophagen Gifsy-1 und Gifsy-2, Genen der Flagellen-Biosynthese, der Chemotaxis-Histidinkinase *cheA*, *cobS*, einem Gen aus der kaum charakterisierten genomischen Insel GEI1528/1562 sowie *virK* (STM2781) zusammen. Leitgen dieser Gruppe ist *virK*, für das bereits eine Relevanz für die *in vivo*-Virulenz im Mausmodell demonstriert werden konnte [69]. Dabei wurden im kompetitiven Assay die *virK*-Mutanten um den Faktor zehn in der Leber und um den Faktor fünf in der Milz vom Wildtyp überwachsen. Auch für Mutanten in Chemotaxisgenen konnte bereits eine Virulenzassoziation demonstriert werden [194, 312].

Errechnet man, ausgehend von diesen 19 Genen, die eventuell eine Rolle bei der *in vivo*-Infektion von *S. typhimurium* spielen, und aus der 60%igen Genomabdeckung mit Insertionsmutanten sowie der Tatsache, dass weniger als 20 % dieser Mutanten im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, die Gesamtzahl von wahrscheinlich *in vivo* relevanten Genen, so liegt diese Zahl mit 182 Genen sehr nahe an den von Bowe et al. postulierten

mindestens 180 Genen, die für eine tödlich verlaufende Infektion in der Maus nötig sind [319].

Sicher muss allerdings auch davon ausgegangen werden, dass einige der als attenuiert gefundenen Insertionsmutanten aus dieser Arbeit sich im Tiermodell als avirulent herausstellen, insbesondere solche, die nur eine schwache Attenuation *in vitro* zeigten.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit ermittelten Zellkulturdaten für insgesamt 164 Insertionsmutanten in *S. typhimurium* bilden eine solide Basis für die Untersuchung weiterer, am intrazellulären Überleben des Bakteriums im murinen Makrophagen beteiligter Gene und Gencluster. Etwa ein Viertel dieser Mutanten zeigt sogar eine Attenuation, die stärker als die des Negativ-Kontrollstamms 14028*phoP*(593)::pIDM1 ist. Für einen Großteil der replikationswichtig gefundenen Gene ist keine oder lediglich eine putative Funktionszuordnung verfügbar.

Einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Studien bietet beispielsweise das Operon mit den Genen STM1255 bis STM1259. In dieser Arbeit konnte zwar eine Rolle beim intrazellulären Überleben festgestellt sowie durch Lokalisationsstudien und modifizierte Zellkulturexperimente dargelegt werden, dass dieses Operon an der Adhäsionsphase der Replikation des Bakteriums im Makrophagen beteiligt ist. Die genaue Funktion der Genprodukte sowie, sollte sich die putative Zuordnung als Transportermolekül bestätigen, dessen Substrat, liegt jedoch weiterhin im Dunkeln. Hier könnten ausführliche Funktionsstudien unternommen werden. Solche Daten könnten zu einem tieferen Verständnis der Adaption von *Salmonella* an die spezifischen Mikroumgebungen des Wirtsorganismus dienen, die noch weitestgehend unerforscht ist.

In Zukunft sollten Mutanten mit *Knockouts* größerer Teile der genannten genomischen Inseln konstruiert werden, um den additiven Einfluss des Ausschaltens mehrerer Gene zu untersuchen. Wie bereits vermutet, vermitteln viele der Gene dieser Inseln für sich genommen nur einen subtilen Wachstumsvorteil, die Summe dieser Effekte leistet aber anscheinend einen signifikanten Beitrag zum intrazellulären Überleben und zur Proliferation von *S. typhimurium* im Makrophagenmodell.

Ein weiterer wichtiger Schritt wäre die Erhebung von *in vivo*-Daten für solche Stämme, die eine Attenuation der intrazellulären Überlebensfähigkeit auf dem Niveau der Insertion in *phoP* zeigen, etwa im Mausmodell.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten können nach sorgfältiger Analyse und weiterführender Studien sicherlich zur Identifikation neuer Virulenzfaktoren des Pathogens beitragen.

Immerhin ist bislang erst ein kleiner Teil der vermuteten 180 oder mehr Virulenzfaktoren [319] charakterisiert worden. Bekannte Virulenzfaktoren wiederum stellen potenzielle Ziele für die Entwicklung neuartiger antimikrobieller Substanzen in der Medizin dar. Auch ist der Einsatz von sicher virulenzattenuierten Salmonellen mit Mutationen in mehr als einem bekannten Virulenzgen als Impfstoffträger möglich. *Salmonella* löst eine geeignete Immunstimulation aus und ist in der Lage, rekombinante Antigene zu exprimieren [320]. Dies konnte unter anderem bereits für Antigene von *Toxoplasma gondii* [321], *Schistosomas* [322], *Helicobacter pylori* [323] und das Tetanustoxin [324] im Mausmodell gezeigt werden. Vielfach ist jedoch eine verminderte Stimulation des Immunsystems, einhergehend mit geringen Antikörpertitern, durch die attenuierten Stämme problematisch [139]. Geeignete Mutationsorte, die einerseits die Salmonellen sicher attenuieren, aber andererseits eine gute Immunstimulanz auslösen, sind Voraussetzung für die Entwicklung von Vakzinen.

Ein anderes, viel versprechendes Anwendungsgebiet solcher virulenzattenuierter *S. typhimurium*-Stämme ist die Tumorthherapie. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Salmonellen präferenziell in bestimmten Tumorgeweben proliferieren und so in der Immuntherapie genutzt werden könnten, um lokal therapeutische Proteine in das Tumorgewebe abzugeben [325]. Auch werden befallene Tumorzellen, im Gegensatz zu nicht befallenen, vom körpereigenen Immunsystem als Ziel erkannt und durch T-Zellen eliminiert [326]. Durch die inhärente Anti-Tumor-Aktivität des Bakteriums wird außerdem das krankhafte Gewebe teilweise zerstört [327].

Abschließend bleibt festzustellen, dass in dieser Arbeit neue Gencluster identifiziert werden konnten, die zum intrazellulären Überleben von *S. typhimurium in vitro* und eventuell auch *in vivo* beitragen. Jedoch bleibt eine Reihe an offenen Fragen, insbesondere hinsichtlich der funktionalen Charakterisierung der identifizierten Genominseln, die im Rahmen dieser Arbeit nur begonnen werden konnte. Auch stellen die über 160 *in silico* und *in vitro* charakterisierten Insertionsmutanten einen reichhaltigen Fundus an Genen dar, die potenziell virulenzwichtige Faktoren von *S. typhimurium* kodieren könnten, deren Charakterisierung aber größtenteils noch aussteht.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Cohen, M.L., *Changing patterns of infectious disease*. Nature, 2000. **406**(6797): S. 762-767.
2. World Health Organisation, *Infectious disease report*, 1999. <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/textonly.html>, gefunden: 25.09.2005.
3. Ohl, M.E. und Miller, S.I., *Salmonella: a model for bacterial pathogenesis*. Annu Rev Med, 2001. **52**: S. 259-274.
4. Kayser, F.H., et al., *Medizinische Mikrobiologie*. 9te Auflage 1998, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
5. Schlegel, H.G., *Allgemeine Mikrobiologie*. 7te Auflage 1992, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
6. Salyers, A.A. und Whitt, D.D., *Bacterial Pathogenesis- A molecular Approach*. 2nd ed. 2002, Washington D.C.: ASM Press.
7. Darwin, K.H. und Miller, V.L., *Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(3): S. 405-428.
8. Burrows, W., *Textbook of Microbiology*. 7th ed. 1959, Philadelphia, Pa.: The W. B. Saunders Co.
9. Selbitz, H.-J., Sinell, H.-J. und Sziegoleit, A., *Das Salmonellen-Problem*. 1995, Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
10. Ochman, H. und Wilson, A.C., *Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes*. J Mol Evol, 1987. **26**(1-2): S. 74-86.
11. Cotter, P.A. und DiRita, V.J., *Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: S. 519-565.
12. Reeves, M.W., et al., *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov.* J Clin Microbiol, 1989. **27**(2): S. 313-320.
13. Groisman, E.A. und Ochman, H., *How Salmonella became a pathogen*. Trends Microbiol, 1997. **5**(9): S. 343-349.
14. Bäumler, A.J., *The record of horizontal gene transfer in Salmonella*. Trends Microbiol, 1997. **5**(8): S. 318-322.
15. Boyd, E.F., et al., *Molecular genetic relationships of the salmonellae*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(3): S. 804-808.
16. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(6858): S. 852-856.
17. Tindall, B.J., et al., *Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 1): S. 521-524.
18. Robert Koch Institut, *SurvStat*, 2005. <http://www3.rki.de/SurvStat/>, gefunden: 02.09.2005.
19. Bundesamt für Risikobewertung, *Salmonellen und ihre Bedeutung als Krankheitserreger*, 2005. <http://www.bfr.bund.de/cd/537>, gefunden: 03.09.2005.
20. Kennedy, M., et al., *Hospitalizations and deaths due to Salmonella infections, FoodNet, 1996-1999*. Clin Infect Dis, 2004. **38** Suppl 3: S. S142-148.
21. Economic Research Service, *E.r.s. Foodreview*, 1999. <http://www.ers.usda.gov/publications/foodreview/may1999/>, gefunden: 25.09.2005.
22. WHO, *Fact Sheet 1997*. 1997, World Health Organisation.
23. Chalker, R.B. und Blaser, M.J., *A review of human salmonellosis: III. Magnitude of Salmonella infection in the United States*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(1): S. 111-124.

24. Akkina, J.E., et al., *Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistant Salmonella Typhimurium DT104 in the United States*. J Am Vet Med Assoc, 1999. **214**(6): S. 790-798.
25. Threlfall, E.J., *Epidemic Salmonella typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone*. J. Antimicrob. Chemother., 2000. **46**(1): S. 7-10.
26. Helms, M., Ethelberg, S. und Molbak, K., *International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992-2001*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(6): S. 859-867.
27. Boyd, D., et al., *Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona*. J Bacteriol, 2001. **183**(19): S. 5725-5732.
28. Ament, A.J., et al., *Cost-benefit analysis of a screening strategy for Salmonella enteritidis in poultry*. Vet Q, 1993. **15**(1): S. 33-37.
29. Hald, T., et al., *The occurrence and epidemiology of Salmonella in European pig slaughterhouses*. Epidemiol Infect, 2003. **131**(3): S. 1187-1203.
30. Madigan, M.T., Martiko, J.M. und Parker, J., *Brock- Microbiology*. 9th ed. 2001, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
31. Sadeyen, J.R., et al., *Salmonella carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals*. Microbes Infect, 2004. **6**(14): S. 1278-1286.
32. Hume, M.E., et al., *Salmonella genotype diversity in nonlactating and lactating dairy cows*. J Food Prot, 2004. **67**(10): S. 2280-2283.
33. Haddock, R.L., *Asymptomatic salmonellosis in a swine herd*. Am J Public Health Nations Health, 1970. **60**(12): S. 2345-2353.
34. Monack, D.M., Bouley, D.M. und Falkow, S., *Salmonella typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization*. J Exp Med, 2004. **199**(2): S. 231-241.
35. Finlay, B.B., *Molecular and cellular mechanisms of Salmonella pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **192**: S. 163-185.
36. Wallis, T.S. und Galyov, E.E., *Molecular basis of Salmonella-induced enteritis*. Mol Microbiol, 2000. **36**(5): S. 997-1005.
37. Santos, R.L., et al., *Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(1): S. 3-12.
38. Santos, R.L., et al., *Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever*. Microbes Infect, 2001. **3**(14-15): S. 1335-1344.
39. Tsolis, R.M., et al., *Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other Salmonella infections*. Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: S. 261-274.
40. Barthel, M., et al., *Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host*. Infect Immun, 2003. **71**(5): S. 2839-2858.
41. Kotova, A.L., Kondratskaya, S.A. und Yasutis, I.M., *Salmonella carrier state and biological characteristics of the infectious agent*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1988. **32**(1): S. 71-78.
42. Foster, J.W. und Spector, M.P., *How Salmonella survive against the odds*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: S. 145-174.
43. Jones, B.D. und Falkow, S., *Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: S. 533-561.
44. House, D., et al., *Typhoid fever: pathogenesis and disease*. Curr Opin Infect Dis, 2001. **14**(5): S. 573-578.

45. Richter-Dahlfors, A., Buchan, A.M. und Finlay, B.B., *Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo.* J Exp Med, 1997. **186**(4): S. 569-580.
46. Ginocchio, C., Pace, J. und Galan, J.E., *Identification and molecular characterization of a Salmonella typhimurium gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): S. 5976-5980.
47. Finlay, B.B., Ruschkowski, S. und Dedhar, S., *Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells.* J Cell Sci, 1991. **99** (Pt 2): S. 283-296.
48. Francis, C.L., et al., *Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria.* Nature, 1993. **364**(6438): S. 639-642.
49. Alpuche-Aranda, C.M., et al., *Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes.* J Exp Med, 1994. **179**(2): S. 601-608.
50. Jones, B.D., Ghorri, N. und Falkow, S., *Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches.* J Exp Med, 1994. **180**(1): S. 15-23.
51. Gebert, A., *The role of M cells in the protection of mucosal membranes.* Histochem Cell Biol, 1997. **108**(6): S. 455-470.
52. Clark, M.A., Hirst, B.H. und Jepson, M.A., *Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles.* Adv Drug Deliv Rev, 2000. **43**(2-3): S. 207-223.
53. Kraehenbuhl, J.P. und Neutra, M.R., *Epithelial M cells: differentiation and function.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: S. 301-332.
54. Clark, M.A., Jepson, M.A. und Hirst, B.H., *Exploiting M cells for drug and vaccine delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **50**(1-2): S. 81-106.
55. Penheiter, K.L., et al., *Non-invasive Salmonella typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches.* Mol Microbiol, 1997. **24**(4): S. 697-709.
56. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.* Nat Immunol, 2001. **2**(4): S. 361-367.
57. Bueno, S.M., et al., *Molecular interactions between dendritic cells and salmonella: escape from adaptive immunity and implications on pathogenesis.* Crit Rev Immunol, 2005. **25**(5): S. 389-403.
58. Finlay, B.B. und Falkow, S., *Salmonella interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells.* J Infect Dis, 1990. **162**(5): S. 1096-1106.
59. Jones, B., Pascopella, L. und Falkow, S., *Entry of microbes into the host: using M cells to break the mucosal barrier.* Curr Opin Immunol, 1995. **7**(4): S. 474-478.
60. Cossart, P. und Sansonetti, P.J., *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens.* Science, 2004. **304**(5668): S. 242-248.
61. Steele-Mortimer, O., et al., *Vacuole acidification is not required for survival of Salmonella enterica serovar typhimurium within cultured macrophages and epithelial cells.* Infect Immun, 2000. **68**(9): S. 5401-5404.
62. Rathman, M., Sjaastad, M.D. und Falkow, S., *Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages.* Infect Immun, 1996. **64**(7): S. 2765-2773.
63. Schwan, W.R., et al., *Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of Salmonella serovars within human and murine macrophages.* Infect Immun, 2000. **68**(3): S. 1005-1013.
64. Leung, K.Y. und Finlay, B.B., *Intracellular replication is essential for the virulence of Salmonella typhimurium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): S. 11470-11474.

65. Fields, P.I., et al., *Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(14): S. 5189-5193.
66. Crouch, M.L., et al., *The alternative sigma factor sigma is required for resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium to anti-microbial peptides*. Mol Microbiol, 2005. **56**(3): S. 789-799.
67. Brodsky, I.E., et al., *Mig-14 is an inner membrane-associated protein that promotes Salmonella typhimurium resistance to CRAMP, survival within activated macrophages and persistent infection*. Mol Microbiol, 2005. **55**(3): S. 954-972.
68. Nishio, M., et al., *Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in Salmonella enterica serovar Choleraesuis*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 3): S. 863-873.
69. Detweiler, C.S., et al., *virK, somA and rcsC are important for systemic Salmonella enterica serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance*. Mol Microbiol, 2003. **48**(2): S. 385-400.
70. Bäumlner, A.J., et al., *Salmonella typhimurium loci involved in survival within macrophages*. Infect Immun, 1994. **62**(5): S. 1623-1630.
71. Buchmeier, N.A. und Heffron, F., *Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages*. Science, 1990. **248**(4956): S. 730-732.
72. Holden, D.W., *Trafficking of the Salmonella Vacuole in Macrophages*. Traffic, 2002. **3**(3): S. 161-169.
73. Garcia-del Portillo, F. und Finlay, B.B., *Targeting of Salmonella typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors*. J Cell Biol, 1995. **129**(1): S. 81-97.
74. Meresse, S., et al., *The rab7 GTPase controls the maturation of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells*. Embo J, 1999. **18**(16): S. 4394-4403.
75. Steele-Mortimer, O., et al., *Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway*. Cell Microbiol, 1999. **1**(1): S. 33-49.
76. Beuzon, C.R., et al., *Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA*. Embo J, 2000. **19**(13): S. 3235-3249.
77. Pietila, T.E., et al., *Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2005.
78. Kalupahana, R.S., et al., *Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Immunology, 2005. **115**(4): S. 462-472.
79. Mastroeni, P., et al., *Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(2): S. 237-248.
80. Vazquez-Torres, A. und Fang, F.C., *Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages*. Trends Microbiol, 2001. **9**(1): S. 29-33.
81. Vazquez-Torres, A., et al., *Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to Salmonella-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): S. 2561-2565.
82. Kim, C.C., Monack, D. und Falkow, S., *Modulation of virulence by two acidified nitrite-responsive loci of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Infect Immun, 2003. **71**(6): S. 3196-3205.
83. Chen, L.M., Kaniga, K. und Galan, J.E., *Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages*. Mol Microbiol, 1996. **21**(5): S. 1101-1115.
84. Monack, D.M., et al., *Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): S. 9833-9838.

85. Brennan, M.A. und Cookson, B.T., *Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis*. Mol Microbiol, 2000. **38**(1): S. 31-40.
86. Lindgren, S.W., Stojiljkovic, I. und Heffron, F., *Macrophage killing is an essential virulence mechanism of Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): S. 4197-4201.
87. Guilloteau, L.A., et al., *The Salmonella virulence plasmid enhances Salmonella-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses*. Infect Immun, 1996. **64**(8): S. 3385-3393.
88. Jesenberger, V., et al., *Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis*. J Exp Med, 2000. **192**(7): S. 1035-1046.
89. Watson, P.R., et al., *Salmonella enterica serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis*. Infect Immun, 2000. **68**(6): S. 3744-3747.
90. Hueffer, K. und Galan, J.E., *Salmonella-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes*. Cellular Microbiology, 2004. **6**(11): S. 1019-1025.
91. Hernandez, L.D., et al., *A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy*. J. Cell Biol., 2003. **163**(5): S. 1123-1131.
92. Monack, D.M., Navarre, W.W. und Falkow, S., *Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation*. Microbes Infect, 2001. **3**(14-15): S. 1201-1212.
93. Genome Sequencing Centre, Washington University in St. Louis, 2005. <http://genomeold.wustl.edu/projects/bacterial/styphimurium/>, gefunden: 25.08.2005.
94. Figueroa-Bossi, N., et al., *Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella*. Mol Microbiol, 2001. **39**(2): S. 260-271.
95. Figueroa-Bossi, N., et al., *Unsuspected prophage-like elements in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1997. **25**(1): S. 161-173.
96. Affolter, M., Parent-Vaugeois, C. und Anderson, A., *Curing and induction of the Fels 1 and Fels 2 prophages in the Ames mutagen tester strains of Salmonella typhimurium*. Mutat Res, 1983. **110**(2): S. 243-262.
97. Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. und Hensel, M., *Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates*. J Exp Med, 2002. **195**(9): S. 1155-1166.
98. Oelschlaeger, T.A. und Hacker, J., *Impact of pathogenicity islands in bacterial diagnostics*. Apmis, 2004. **112**(11-12): S. 930-936.
99. Hacker, J. und Kaper, J.B., *Pathogenicity islands and the evolution of microbes*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: S. 641-679.
100. Hacker, J., et al., *Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution*. Mol Microbiol, 1997. **23**(6): S. 1089-1097.
101. Hensel, M., *Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol, 2004. **294**(2-3): S. 95-102.
102. Marcus, S.L., et al., *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. Microbes Infect, 2000. **2**(2): S. 145-156.
103. Bajaj, V., Hwang, C. und Lee, C.A., *hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of Salmonella typhimurium invasion genes*. Mol Microbiol, 1995. **18**(4): S. 715-727.
104. Collazo, C.M. und Galan, J.E., *The invasion-associated type-III protein secretion system in Salmonella--a review*. Gene, 1997. **192**(1): S. 51-59.
105. Jones, B.D., *Salmonella invasion gene regulation: a story of environmental awareness*. J Microbiol, 2005. **43**: S. 110-117.

106. Brumell, J.H., Steele-Mortimer, O. und Finlay, B.B., *Bacterial invasion: Force feeding by Salmonella*. *Curr Biol*, 1999. **9**(8): S. R277-280.
107. Galan, J.E. und Curtiss, R. 3rd, *Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(16): S. 6383-6387.
108. Galan, J.E. und Curtiss, R. 3rd, *Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: invA mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells*. *Infect Immun*, 1991. **59**(9): S. 2901-2908.
109. Lee, V.T. und Schneewind, O., *Type III secretion machines and the pathogenesis of enteric infections caused by Yersinia and Salmonella spp.* *Immunol Rev*, 1999. **168**: S. 241-255.
110. Tsolis, R.M., et al., *Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves*. *Infect Immun*, 1999. **67**(9): S. 4879-4885.
111. Daefler, S., *Type III secretion by Salmonella typhimurium does not require contact with a eukaryotic host*. *Mol Microbiol*, 1999. **31**(1): S. 45-51.
112. Bajaj, V., et al., *Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression*. *Mol Microbiol*, 1996. **22**(4): S. 703-714.
113. Hayward, R.D. und Koronakis, V., *Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella*. *Embo J*, 1999. **18**(18): S. 4926-4934.
114. Zhou, D., Mooseker, M.S. und Galan, J.E., *Role of the S. typhimurium actin-binding protein SipA in bacterial internalization*. *Science*, 1999. **283**(5410): S. 2092-2095.
115. Hersh, D., et al., *The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): S. 2396-2401.
116. Stender, S., et al., *Identification of SopE2 from Salmonella typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell*. *Mol Microbiol*, 2000. **3**(6): S. 1206-1221.
117. Fu, Y. und Galan, J.E., *A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion*. *Nature*, 1999. **401**(6750): S. 293-297.
118. Hensel, M., Nikolaus, T. und Egelseer, C., *Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of Salmonella pathogenicity island 2*. *Mol Microbiol*, 1999. **31**(2): S. 489-498.
119. Shea, J.E., et al., *Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(6): S. 2593-2597.
120. Hensel, M., *Salmonella pathogenicity island 2*. *Mol Microbiol*, 2000. **36**(5): S. 1015-1023.
121. Cirillo, D.M., et al., *Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival*. *Mol Microbiol*, 1998. **30**(1): S. 175-188.
122. Blanc-Potard, A.B. und Groisman, E.A., *The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival*. *Embo J*, 1997. **16**(17): S. 5376-5385.
123. Blanc-Potard, A.B., et al., *The SPI-3 pathogenicity island of Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(3): S. 998-1004.
124. Snavely, M.D., et al., *Magnesium transport in Salmonella typhimurium: expression of cloned genes for three distinct Mg²⁺ transport systems*. *J Bacteriol*, 1989. **171**(9): S. 4752-4760.
125. Wong, K.K., et al., *Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a Salmonella pathogenicity island located at 92*

- minutes on the chromosome map of Salmonella enterica serovar typhimurium LT2.* Infect Immun, 1998. **66**(7): S. 3365-3371.
126. Wood, M.W., et al., *Identification of a pathogenicity island required for Salmonella enteropathogenicity.* Mol Microbiol, 1998. **29**(3): S. 883-891.
127. Galyov, E.E., et al., *A secreted effector protein of Salmonella dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa.* Mol Microbiol, 1997. **25**(5): S. 903-912.
128. Norris, F.A., et al., *SopB, a protein required for virulence of Salmonella dublin, is an inositol phosphate phosphatase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): S. 14057-14059.
129. Folkesson, A., Lofdahl, S. und Normark, S., *The Salmonella enterica subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells.* Res Microbiol, 2002. **153**(8): S. 537-545.
130. Bijlsma, J.J.E. und Groisman, E.A., *The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of Salmonella enterica.* Mol Microbiol, 2005. **57**(1): S. 85-96.
131. Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C. und Groisman, E.A., *Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence.* Cell, 1996. **84**(1): S. 165-174.
132. Pegues, D.A., et al., *PhoP/PhoQ transcriptional repression of Salmonella typhimurium invasion genes: evidence for a role in protein secretion.* Mol Microbiol, 1995. **17**(1): S. 169-181.
133. Alpuche Aranda, C.M., et al., *Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): S. 10079-10083.
134. Valdivia, R.H. und Falkow, S., *Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of Salmonella typhimurium acid-inducible promoters by differential fluorescence induction.* Mol Microbiol, 1996. **22**(2): S. 367-378.
135. Miller, S.I., Kukral, A.M. und Mekalanos, J.J., *A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): S. 5054-5058.
136. Galan, J.E. und Curtiss, R. 3rd, *Virulence and vaccine potential of phoP mutants of Salmonella typhimurium.* Microb Pathog, 1989. **6**(6): S. 433-443.
137. Schaible, U.E. und Kaufmann, S.H., *A nutritive view on the host-pathogen interplay.* Trends Microbiol, 2005. **13**(8): S. 373-380.
138. O'Callaghan, D., et al., *Characterization of aromatic- and purine-dependent Salmonella typhimurium: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice.* Infect Immun, 1988. **56**(2): S. 419-423.
139. Khan, S.A., et al., *Salmonella typhi and S. typhimurium derivatives harbouring deletions in aromatic biosynthesis and Salmonella Pathogenicity Island-2 (SPI-2) genes as vaccines and vectors.* Vaccine, 2003. **21**(5-6): S. 538-548.
140. Gentschev, I., et al., *Salmonella strain secreting active listeriolysin changes its intracellular localization.* Infect Immun, 1995. **63**(10): S. 4202-4205.
141. Mei, J.M., et al., *Identification of Staphylococcus aureus virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis.* Mol Microbiol, 1997. **26**(2): S. 399-407.
142. Lau, G.W., et al., *A functional genomic analysis of type 3 Streptococcus pneumoniae virulence.* Mol Microbiol, 2001. **40**(3): S. 555-571.
143. Hoiseth, S.K. und Stocker, B.A., *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines.* Nature, 1981. **291**(5812): S. 238-239.

144. Eriksson, S., et al., *Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): S. 103-118.
145. Cole, S.T., et al., *Massive gene decay in the leprosy bacillus*. Nature, 2001. **409**(6823): S. 1007-1011.
146. Sakharkar, K.R., Dhar, P.K. und Chow, V.T., *Genome reduction in prokaryotic obligatory intracellular parasites of humans: a comparative analysis*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 6): S. 1937-1941.
147. Handfield, M. und Levesque, R.C., *Strategies for isolation of in vivo expressed genes from bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 1999. **23**(1): S. 69-91.
148. Hedges, R.W. und Jacob, A.E., *Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons*. Mol Gen Genet, 1974. **132**(1): S. 31-40.
149. Spector, M.P., et al., *Identification and characterization of starvation-regulated genetic loci in Salmonella typhimurium by using Mu d-directed lacZ operon fusions*. J Bacteriol, 1988. **170**(1): S. 345-351.
150. Mahan, M.J., Slauch, J.M. und Mekalanos, J.J., *Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues*. Science, 1993. **259**(5095): S. 686-688.
151. Mahan, M.J., et al., *Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: S. 139-164.
152. Chiang, S.L., Mekalanos, J.J. und Holden, D.W., *In vivo genetic analysis of bacterial virulence*. Annu Rev Microbiol, 1999. **53**: S. 129-154.
153. Mahan, M.J., et al., *Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): S. 669-673.
154. Camilli, A., Beattie, D.T. und Mekalanos, J.J., *Use of genetic recombination as a reporter of gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): S. 2634-2638.
155. Camilli, A. und Mekalanos, J.J., *Use of recombinase gene fusions to identify Vibrio cholerae genes induced during infection*. Mol Microbiol, 1995. **18**(4): S. 671-683.
156. Valdivia, R.H. und Falkow, S., *Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells*. Science, 1997. **277**(5334): S. 2007-2011.
157. Hensel, M., et al., *Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection*. Science, 1995. **269**(5222): S. 400-403.
158. Lehoux, D.E. und Levesque, R.C., *Detection of genes essential in specific niches by signature-tagged mutagenesis*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(5): S. 434-439.
159. Chan, K., Kim, C.C. und Falkow, S., *Microarray-Based Detection of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Transposon Mutants That Cannot Survive in Macrophages and Mice*. Infect Immun, 2005. **73**(9): S. 5438-5449.
160. Knuth, K., et al., *Large-scale identification of essential Salmonella genes by trapping lethal insertions*. Mol Microbiol, 2004. **51**(6): S. 1729-1744.
161. Niesalla, H., *Entwicklung rekombinanter Lebendimpfstoffe auf der Basis attenuierter Salmonella-Vakzinstämme*, Dissertation an der Fakultät für Biologie, 2002. Eberhard Karls Universität: Tübingen.
162. Fuchs, T.M., Klumpp, J. und Przybilla, K., *Insertion-duplication mutagenesis of Salmonella enterica and related species using a novel thermosensitive vector*. Plasmid, 2005. *in press*.
163. Law, J., et al., *A system to generate chromosomal mutations in Lactococcus lactis which allows fast analysis of targeted genes*. J Bacteriol, 1995. **177**(24): S. 7011-7018.
164. Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A., *A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria*. Biotechnology, 1983(1): S. 784-791.

165. Datsenko, K.A. und Wanner, B.L., *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): S. 6640-6645.
166. Uzzau, S., et al., *Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): S. 15264-15269.
167. Velge, P., Cloeckert, A. und Barrow, P., *Emergence of Salmonella epidemics: the problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes*. Vet Res, 2005. **36**(3): S. 267-288.
168. Van Dyk, T.K. und Rosson, R.A., *Photobacterium luminescens luxCDABE promoter probe vectors*. Methods Mol Biol, 1998. **102**: S. 85-95.
169. Bolivar, F., et al., *Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system*. Gene, 1977. **2**(2): S. 95-113.
170. Froussard, P., *A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(11): S. 2900.
171. NEB, *Catalog & Technical Reference*. 2000/ 2001, New England Biolabs: Beverly, USA. S. 210-211.
172. Murphy, K.C., *Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998. **180**(8): S. 2063-2071.
173. Hashimoto-Gotoh, T., et al., *Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors*. Gene, 1981. **16**(1-3): S. 227-235.
174. Cherepanov, P.P. und Wackernagel, W., *Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant*. Gene, 1995. **158**(1): S. 9-14.
175. Link, A.J., Phillips, D. und Church, G.M., *Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization*. J Bacteriol, 1997. **179**(20): S. 6228-6237.
176. Ralph, P., Moore, M.A. und Nilsson, K., *Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines*. J Exp Med, 1976. **143**(6): S. 1528-1533.
177. VDLUFA, *Methodenhandbuch Band VI*, Hrsg. Lechner, E. und Hüfner, J. 1996, Darmstadt: Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten.
178. Vesterlund, S., et al., *Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods*. J Microbiol Methods, 2005. **60**(2): S. 225-233.
179. Velagic, S., *Analyse funktional unbekannter Gene in Salmonella typhimurium*, Diplomarbeit an der Abteilung Mikrobiologie, ZIEL, 2005. TU München: Freising.
180. Knudsen, S., *Promoter 2.0: for the recognition of PolIII promoter sequences*. Bioinformatics, 1999. **15**: S. 356-361.
181. Rozen, S. und Skaletsky, H., *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: S. 365-386.
182. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): S. 3389-3402.
183. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): S. 403-410.
184. Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J., *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(22): S. 4673-4680.
185. Mulder, N.J., et al., *InterPro, progress and status in 2005*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): S. D201-205.

186. Quevillon, E., et al., *InterProScan: protein domains identifier*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): S. W116-120.
187. Freissler, E., et al., *Screening method for attenuating or virulence defective microbial cells*. 2004. Patent EP1407014.
188. Vagner, V., Dervyn, E. und Ehrlich, S.D., *A vector for systematic gene inactivation in Bacillus subtilis*. Microbiology, 1998. **144** (Pt 11): S. 3097-3104.
189. Windgassen, M., Urban, A. und Jaeger, K.E., *Rapid gene inactivation in Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **193**(2): S. 201-205.
190. Merlin, C., McAteer, S. und Masters, M., *Tools for characterization of Escherichia coli genes of unknown function*. J Bacteriol, 2002. **184**(16): S. 4573-4581.
191. Langermans, J.A., et al., *Activation of mouse peritoneal macrophages during infection with Salmonella typhimurium does not result in enhanced intracellular killing*. J Immunol, 1990. **144**(11): S. 4340-4346.
192. Lundberg, U., et al., *Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes*. J Bacteriol, 1999. **181**(11): S. 3433-3437.
193. Kingsley, R.A., et al., *Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of Salmonella enterica serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants*. Infect Immun, 2003. **71**(2): S. 629-640.
194. Jones, B.D., Lee, C.A. und Falkow, S., *Invasion by Salmonella typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation*. Infect Immun, 1992. **60**(6): S. 2475-2480.
195. Schmitt, C.K., et al., *Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis*. Infect Immun, 2001. **69**(9): S. 5619-5625.
196. Abromaitis, S., et al., *The presence of the tet gene from cloning vectors impairs Salmonella survival in macrophages*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **242**(2): S. 305-312.
197. Lucchini, S., Thompson, A. und Hinton, J.C., *Microarrays for microbiologists*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 6): S. 1403-1414.
198. Thompson, A., Lucchini, S. und Hinton, J.C., *It's easy to build your own microarrayer!* Trends Microbiol, 2001. **9**(4): S. 154-156.
199. Roth, J.R., Lawrence, J.G. und Bobik, T.A., *Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: S. 137-181.
200. Bobik, T.A., Ailion, M. und Roth, J.R., *A single regulatory gene integrates control of vitamin B12 synthesis and propanediol degradation*. J Bacteriol, 1992. **174**(7): S. 2253-2266.
201. Jeter, R.M., Olivera, B.M. und Roth, J.R., *Salmonella typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B12) de novo under anaerobic growth conditions*. J Bacteriol, 1984. **159**(1): S. 206-213.
202. Rondon, M.R. und Escalante-Semerena, J.C., *The poc locus is required for 1,2-propanediol-dependent transcription of the cobalamin biosynthetic (cob) and propanediol utilization (pdu) genes of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1992. **174**(7): S. 2267-2272.
203. Ailion, M., Bobik, T.A. und Roth, J.R., *Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1993. **175**(22): S. 7200-7208.
204. Jeter, R.M., *Cobalamin-dependent 1,2-propanediol utilization by Salmonella typhimurium*. J Gen Microbiol, 1990. **136** (Pt 5): S. 887-896.

205. Toraya, T., Honda, S. und Fukui, S., *Fermentation of 1,2-propanediol with 1,2-ethanediol by some genera of Enterobacteriaceae, involving coenzyme B12-dependent diol dehydratase*. J Bacteriol, 1979. **139**(1): S. 39-47.
206. Johnson, C.L., et al., *Functional genomic, biochemical, and genetic characterization of the Salmonella pduO gene, an ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase gene*. J Bacteriol, 2001. **183**(5): S. 1577-1584.
207. Obradors, N., et al., *Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1988. **170**(5): S. 2159-2162.
208. Leal, N.A., Havemann, G.D. und Bobik, T.A., *PduP is a coenzyme-a-acylating propionaldehyde dehydrogenase associated with the polyhedral bodies involved in B12-dependent 1,2-propanediol degradation by Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Arch Microbiol, 2003. **180**(5): S. 353-361.
209. Horswill, A.R. und Escalante-Semerena, J.C., *Propionate catabolism in Salmonella typhimurium LT2: two divergently transcribed units comprise the prp locus at 8.5 centisomes, prpR encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the prpBCDE genes constitute an operon*. J Bacteriol, 1997. **179**(3): S. 928-940.
210. Walter, D., Ailion, M. und Roth, J., *Genetic characterization of the pdu operon: use of 1,2-propanediol in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1997. **179**(4): S. 1013-1022.
211. Escalante-Semerena, J.C. und Roth, J.R., *Regulation of cobalamin biosynthetic operons in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1987. **169**(5): S. 2251-2258.
212. Andersson, D.I., *Involvement of the Arc system in redox regulation of the Cob operon in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1992. **6**(11): S. 1491-1494.
213. Lawhon, S.D., et al., *Global regulation by CsrA in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 2003. **48**(6): S. 1633-1645.
214. Lawrence, J.G. und Roth, J.R., *Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex*. Genetics, 1996. **142**(1): S. 11-24.
215. Bobik, T.A., et al., *The propanediol utilization (pdu) operon of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B(12)-dependent 1, 2-propanediol degradation*. J Bacteriol, 1999. **181**(19): S. 5967-5975.
216. Stanley, T.L., Ellermeier, C.D. und Slauch, J.M., *Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects Salmonella enterica serovar typhimurium survival in Peyer's patches*. J Bacteriol, 2000. **182**(16): S. 4406-4413.
217. Davidson, A.L. und Chen, J., *ATP-binding cassette transporters in bacteria*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: S. 241-268.
218. van der Heide, T. und Poolman, B., *ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites?* EMBO Rep, 2002. **3**(10): S. 938-943.
219. Dassa, E., et al., *The Escherichia coli ABC transporters: an update*. Mol Microbiol, 1999. **32**(4): S. 887-889.
220. Nakai, K. und Horton, P., *PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(1): S. 34-36.
221. NCBI, *BLAST*, 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, gefunden: 05.09.2005.
222. NCBI, *Conserved Domain Search*, 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=cdd>, gefunden: 05.09.2005.
223. Institute for genomic research (TIGR), *Transport Protein Analysis Database (Transport DB)*, 2005. <http://www.membranetransport.org/>, gefunden: 04.09.2005.

224. Ren, Q., Kang, K.H. und Paulsen, I.T., *TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): S. D284-288.
225. Krogh, A., et al., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. J Mol Biol, 2001. **305**(3): S. 567-580.
226. Sonnhammer, E.L., von Heijne, G. und Krogh, A., *A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences*. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 1998. **6**: S. 175-182.
227. Center for biological sequence analysis, T.U.o.D., Lyngby, *TMHMM Server*. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, gefunden: 05.09.2005.
228. Klarsfeld, A.D., Goossens, P.L. und Cossart, P., *Five Listeria monocytogenes genes preferentially expressed in infected mammalian cells: plcA, purH, purD, pyrE and an arginine ABC transporter gene, arpJ*. Mol Microbiol, 1994. **13**(4): S. 585-597.
229. Hamer, L., et al., *Recent advances in large-scale transposon mutagenesis*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(1): S. 67-73.
230. Bender, J. und Kleckner, N., *Tn10 insertion specificity is strongly dependent upon sequences immediately adjacent to the target-site consensus sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): S. 7996-8000.
231. Berg, D.E., Schmandt, M.A. und Lowe, J.B., *Specificity of transposon Tn5 insertion*. Genetics, 1983. **105**(4): S. 813-828.
232. Claus, H., Frosch, M. und Vogel, U., *Identification of a hotspot for transformation of Neisseria meningitidis by shuttle mutagenesis using signature-tagged transposons*. Mol Gen Genet, 1998. **259**(4): S. 363-371.
233. Akerley, B.J. und Lampe, D.J., *Analysis of gene function in bacterial pathogens by GAMBIT*. Methods Enzymol, 2002. **358**: S. 100-108.
234. Akerley, B.J., et al., *Systematic identification of essential genes by in vitro mariner mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): S. 8927-8932.
235. Lowe, A.M., Beattie, D.T. und Deresiewicz, R.L., *Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology*. Mol Microbiol, 1998. **27**(5): S. 967-976.
236. Heithoff, D.M., et al., *Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): S. 934-939.
237. Lehoux, D.E., Sanschagrin, F. und Levesque, R.C., *Defined oligonucleotide tag pools and PCR screening in signature-tagged mutagenesis of essential genes from bacteria*. Biotechniques, 1999. **26**(3): S. 473-478, 480.
238. Lehoux, D.E., et al., *Identification of novel pathogenicity genes by PCR signature-tagged mutagenesis and related technologies*. Methods Mol Biol, 2004. **266**: S. 289-304.
239. Meccas, J., *Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(1): S. 33-37.
240. Lehoux, D.E., Sanschagrin, F. und Levesque, R.C., *Discovering essential and infection-related genes*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(5): S. 515-519.
241. Jones, A.L., Knoll, K.M. und Rubens, C.E., *Identification of Streptococcus agalactiae virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis*. Mol Microbiol, 2000. **37**(6): S. 1444-1455.
242. Karlyshev, A.V., et al., *Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel Yersinia virulence-associated genes*. Infect Immun, 2001. **69**(12): S. 7810-7819.
243. Salama, N.R., Shepherd, B. und Falkow, S., *Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of Helicobacter pylori*. J Bacteriol, 2004. **186**(23): S. 7926-7935.

244. Conway, T. und Schoolnik, G.K., *Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome*. Mol Microbiol, 2003. **47**(4): S. 879-889.
245. Hambraeus, G., von Wachenfeldt, C. und Hederstedt, L., *Genome-wide survey of mRNA half-lives in Bacillus subtilis identifies extremely stable mRNAs*. Mol Genet Genomics, 2003. **269**(5): S. 706-714.
246. Bernstein, J.A., et al., *Global analysis of Escherichia coli RNA degradosome function using DNA microarrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): S. 2758-2763.
247. Badarinarayana, V., et al., *Selection analyses of insertional mutants using subgenomic-resolution arrays*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(11): S. 1060-1065.
248. Sasseti, C.M., Boyd, D.H. und Rubin, E.J., *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. Mol Microbiol, 2003. **48**(1): S. 77-84.
249. Merrell, D.S. und Camilli, A., *Information overload: assigning genetic functionality in the age of genomics and large-scale screening*. Trends Microbiol, 2002. **10**(12): S. 571-574.
250. Ehrbar, K. und Hardt, W.D., *Bacteriophage-encoded type III effectors in Salmonella enterica subspecies I serovar Typhimurium*. Infect Genet Evol, 2005. **5**(1): S. 1-9.
251. Nataro, J.P. und Kaper, J.B., *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): S. 142-201.
252. Plunkett, G. 3rd, et al., *Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from Escherichia coli O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product*. J Bacteriol, 1999. **181**(6): S. 1767-1778.
253. Waldor, M.K. und Mekalanos, J.J., *Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin*. Science, 1996. **272**(5270): S. 1910-1914.
254. Freeman, V.J., *Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of Corynebacterium diphtheriae*. J Bacteriol, 1951. **61**(6): S. 675-688.
255. Barksdale, L. und Arden, S.B., *Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions*. Annu Rev Microbiol, 1974. **28**(0): S. 265-299.
256. Green, N.M., et al., *Genome Sequence of a Serotype M28 Strain of Group A Streptococcus: Potential New Insights into Puerperal Sepsis and Bacterial Disease Specificity*. J Infect Dis, 2005. **192**(5): S. 760-770.
257. Beres, S.B., et al., *Genome sequence of a serotype M3 strain of group A Streptococcus: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): S. 10078-10083.
258. Brussow, H., Canchaya, C. und Hardt, W.D., *Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(3): S. 560-602, table of contents.
259. Ochman, H., Lawrence, J.G. und Groisman, E.A., *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*. Nature, 2000. **405**(6784): S. 299-304.
260. Figueroa-Bossi, N. und Bossi, L., *Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice*. Mol Microbiol, 1999. **33**(1): S. 167-176.
261. Canvin, J., et al., *Identification of sodC encoding periplasmic [Cu,Zn]-superoxide dismutase in Salmonella*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **136**(2): S. 215-220.
262. De Groote, M.A., et al., *Periplasmic superoxide dismutase protects Salmonella from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): S. 13997-14001.
263. Fang, F.C., et al., *Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): S. 7502-7507.
264. Farrant, J.L., et al., *Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis*. Mol Microbiol, 1997. **25**(4): S. 785-796.

265. Ho, T.D., et al., *Identification of GtgE, a Novel Virulence Factor Encoded on the Gifsy-2 Bacteriophage of Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. J. Bacteriol., 2002. **184**(19): S. 5234-5239.
266. Navarre, W.W., et al., *Co-regulation of Salmonella enterica genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ*. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): S. 492-508.
267. Chopra, A.K., et al., *Role of Salmonella enterotoxin in overall virulence of the organism*. Microb Pathog, 1999. **27**(3): S. 155-171.
268. Chopra, A.K., et al., *Molecular characterization of an enterotoxin from Salmonella typhimurium*. Microb Pathog, 1994. **16**(2): S. 85-98.
269. Libby, S.J., et al., *A cytolysin encoded by Salmonella is required for survival within macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): S. 489-493.
270. van Asten, A.J. und van Dijk, J.E., *Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **44**(3): S. 251-259.
271. Nishi, J., et al., *The export of coat protein from enteroaggregative Escherichia coli by a specific ATP-binding cassette transporter system*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): S. 45680-45689.
272. Tamayo, R., Prouty, A.M. und Gunn, J.S., *Identification and functional analysis of Salmonella enterica serovar Typhimurium PmrA-regulated genes*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **43**(2): S. 249-258.
273. Rondon, M.R., Kazmierczak, R. und Escalante-Semerena, J.C., *Glutathione is required for maximal transcription of the cobalamin biosynthetic and 1,2-propanediol utilization (cob/pdu) regulon and for the catabolism of ethanolamine, 1,2-propanediol, and propionate in Salmonella typhimurium LT2*. J Bacteriol, 1995. **177**(19): S. 5434-5439.
274. Roof, D.M. und Roth, J.R., *Functions required for vitamin B12-dependent ethanolamine utilization in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1989. **171**(6): S. 3316-3323.
275. Sheppard, D.E., et al., *Evidence that a B12-adenosyl transferase is encoded within the ethanolamine operon of Salmonella enterica*. J Bacteriol, 2004. **186**(22): S. 7635-7644.
276. Stojiljkovic, I., Baumler, A.J. und Heffron, F., *Ethanolamine utilization in Salmonella typhimurium: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the cchA cchB eutE eutJ eutG eutH gene cluster*. J Bacteriol, 1995. **177**(5): S. 1357-1366.
277. Heithoff, D.M., et al., *Coordinate intracellular expression of Salmonella genes induced during infection*. J Bacteriol, 1999. **181**(3): S. 799-807.
278. Conner, C.P., Heithoff, D.M. und Mahan, M.J., *In vivo gene expression: contributions to infection, virulence, and pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **225**: S. 1-12.
279. Sampson, B.A. und Gotschlich, E.C., *Elimination of the vitamin B12 uptake or synthesis pathway does not diminish the virulence of Escherichia coli K1 or Salmonella typhimurium in three model systems*. Infect Immun, 1992. **60**(9): S. 3518-3522.
280. Bjorkman, J., Rhen, M. und Anderson, D.I., *Salmonella typhimurium cob mutants are not hyper-virulent*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **139**(2-3): S. 121-126.
281. Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, S.D., *Regulation of Salmonella enterica serovar typhimurium invasion genes by csrA*. Infect Immun, 2000. **68**(12): S. 6790-6797.
282. Folkesson, A., et al., *Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of Salmonella serovars responsible for human disease*. Mol Microbiol, 1999. **33**(3): S. 612-622.

283. Townsend, S.M., et al., *Salmonella enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences*. Infect Immun, 2001. **69**(5): S. 2894-2901.
284. Henikoff, S., et al., *A large family of bacterial activator proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): S. 6602-6606.
285. Zaim, J. und Kierzek, A.M., *The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(5): S. 1444-1454.
286. Schell, M.A., *Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators*. Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: S. 597-626.
287. Russell, D.A., et al., *The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene vapA of Rhodococcus equi ATCC 33701*. J Bacteriol, 2004. **186**(17): S. 5576-5584.
288. Doty, S.L., Chang, M. und Nester, E.W., *The chromosomal virulence gene, chvE, of Agrobacterium tumefaciens is regulated by a LysR family member*. J Bacteriol, 1993. **175**(24): S. 7880-7886.
289. Sheehan, B.J. und Dorman, C.J., *In vivo analysis of the interactions of the LysR-like regulator SpvR with the operator sequences of the spvA and spvR virulence genes of Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1998. **30**(1): S. 91-105.
290. Steiner, K.E. und Preiss, J., *Biosynthesis of bacterial glycogen: genetic and allosteric regulation of glycogen biosynthesis in Salmonella typhimurium LT-2*. J Bacteriol, 1977. **129**(1): S. 246-253.
291. Schwoppe, C., Winkler, H.H. und Neuhaus, H.E., *Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in Escherichia coli*. Eur J Biochem, 2003. **270**(7): S. 1450-1457.
292. Island, M.D., Wei, B.Y. und Kadner, R.J., *Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1992. **174**(9): S. 2754-2762.
293. Schwoppe, C., Winkler, H.H. und Neuhaus, H.E., *Properties of the glucose-6-phosphate transporter from Chlamydia pneumoniae (HPTcp) and the glucose-6-phosphate sensor from Escherichia coli (UhpC)*. J Bacteriol, 2002. **184**(8): S. 2108-2115.
294. Maier, R.J., et al., *Respiratory hydrogen use by Salmonella enterica serovar Typhimurium is essential for virulence*. Infect Immun, 2004. **72**(11): S. 6294-6299.
295. Baker, S.J., Daniels, C. und Morona, R., *PhoP/Q regulated genes in Salmonella typhi identification of melittin sensitive mutants*. Microb Pathog, 1997. **22**(3): S. 165-179.
296. Josenhans, C. und Suerbaum, S., *The role of motility as a virulence factor in bacteria*. Int J Med Microbiol, 2002. **291**(8): S. 605-614.
297. Bardy, S.L., Ng, S.Y. und Jarrell, K.F., *Prokaryotic motility structures*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 2): S. 295-304.
298. Pallen, M.J., Penn, C.W. und Chaudhuri, R.R., *Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era*. Trends Microbiol, 2005. **13**(4): S. 143-149.
299. Kutsukake, K., Ohya, Y. und Iino, T., *Transcriptional analysis of the flagellar regulon of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1990. **172**(2): S. 741-747.
300. Schmitt, C.K., Darnell, S.C. und O'Brien, A.D., *The attenuated phenotype of a Salmonella typhimurium flgM mutant is related to expression of FliC flagellin*. J Bacteriol, 1996. **178**(10): S. 2911-2915.
301. Samatey, F.A., et al., *Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism*. Nature, 2004. **431**(7012): S. 1062-1068.
302. Surridge, C., *Molecular motors: smooth coupling in Salmonella*. Nature, 2004. **431**(7012): S. 1047.

303. Homma, M., et al., *Identification of flagellar hook and basal body gene products (FlaFV, FlaFVI, FlaFVII and FlaFVIII) in Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1987. **169**(8): S. 3617-3624.
304. Jones, C.J., Homma, M. und Macnab, R.M., *Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1987. **169**(4): S. 1489-1492.
305. Schoenhals, G.J. und Macnab, R.M., *Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1996. **178**(14): S. 4200-4207.
306. Schmitt, C.K., et al., *Mutation of flgM attenuates virulence of Salmonella typhimurium, and mutation of fliA represses the attenuated phenotype*. J Bacteriol, 1994. **176**(2): S. 368-377.
307. Lee, J.H., et al., *Role of flagellum and motility in pathogenesis of Vibrio vulnificus*. Infect Immun, 2004. **72**(8): S. 4905-4910.
308. Lockman, H.A. und Curtiss, R. 3rd, *Salmonella typhimurium mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice*. Infect Immun, 1990. **58**(1): S. 137-143.
309. Teplitski, M., Goodier, R.I. und Ahmer, B.M., *Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in Salmonella*. J Bacteriol, 2003. **185**(24): S. 7257-7265.
310. Lucas, R.L. und Lee, C.A., *Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 2000. **36**(5): S. 1024-1033.
311. Iyoda, S., et al., *A flagellar gene fliZ regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Microb Pathog, 2001. **30**(2): S. 81-90.
312. Stecher, B., et al., *Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice*. Infect Immun, 2004. **72**(7): S. 4138-4150.
313. Tawa, P. und Stewart, R.C., *Mutational activation of CheA, the protein kinase in the chemotaxis system of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1994. **176**(14): S. 4210-4218.
314. Stock, A.M., et al., *Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis*. Nature, 1989. **337**(6209): S. 745-749.
315. Smith, H., *What happens to bacterial pathogens in vivo?* Trends Microbiol, 1998. **6**(6): S. 239-243.
316. Hurley, B.P. und McCormick, B.A., *Translating tissue culture results into animal models: the case of Salmonella typhimurium*. Trends Microbiol, 2003. **11**(12): S. 562-569.
317. Buchmeier, N.A. und Libby, S.J., *Dynamics of growth and death within a Salmonella typhimurium population during infection of macrophages*. Can J Microbiol, 1997. **43**(1): S. 29-34.
318. Buchmeier, N.A. und Heffron, F., *Intracellular survival of wild-type Salmonella typhimurium and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages*. Infect Immun, 1989. **57**(1): S. 1-7.
319. Bowe, F., et al., *At least four percent of the Salmonella typhimurium genome is required for fatal infection of mice*. Infect Immun, 1998. **66**(7): S. 3372-3377.
320. Husseiny, M.I. und Hensel, M., *Rapid method for the construction of Salmonella enterica Serovar Typhimurium vaccine carrier strains*. Infect Immun, 2005. **73**(3): S. 1598-1605.
321. Cong, H., et al., *Oral immunization with a live recombinant attenuated Salmonella typhimurium protects mice against Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol, 2005. **27**(1-2): S. 29-35.

322. Pacheco, L.G., et al., *Oral administration of a live Aro attenuated Salmonella vaccine strain expressing 14-kDa Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis*. Acta Trop, 2005. **95**(2): S. 132-142.
323. Liu, X.F., et al., *Systemic immune responses to oral administration of recombinant attenuated Salmonella typhimurium expressing Helicobacter pylori urease in mice*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(14): S. 2154-2156.
324. Jazani, N.H., et al., *Conjugation of tetanus toxoid with Salmonella typhimurium PTCC 1735 O-specific polysaccharide and its effects on production of opsonizing antibodies in a mouse model*. Can J Microbiol, 2005. **51**(4): S. 319-324.
325. Soto, L.J. 3rd, et al., *Preferential proliferation of attenuated Salmonella typhimurium within neuroblastoma*. J Pediatr Surg, 2004. **39**(6): S. 937-940; discussion 937-940.
326. Avogadri, F., et al., *Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(9): S. 3920-3927.
327. Thamm, D.H., et al., *Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting Salmonella typhimurium to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(13): S. 4827-4834.

6 ANHANG

6.1 Verwendete PCR-Primer

Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Primername	Sequenz 5'-3'	Zielgen	3'- Modifikation	Bemerkung/ Zweck
STM301.5prime	CTTAAATAAATCCAGGGGCTTAGCGGCAGAAAATGAAGTTCAAACA ACCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM0301	-	Deletionsprimer
STM301.3prime	TCCTTCAGAATCGGCTATCTGCAGAGACCGCTCATTTGATACAAGCC CGCCATATGAATATCCTCCTTA	STM0301	-	Deletionsprimer
STM301Test.5	GTCACAGTAGGGGG	STM301	-	Test Deletion
STM301Test.3	GCACGTGCCAGCC	STM301	-	Test Deletion
1031.F1	ATACCAGGCCTGCGGGATGCTATAAACGGAGATGATGATGACAAC GGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM1031	-	Deletionsprimer
1031.R1	TAGCCCTGCCCTGGTCATAACCACCCTCCTCCGGAACCACCGCCCA GGCCATATGAATATCCTCCTTA	STM1031	-	Deletionsprimer
1031Test.F	GGCCTGCGGGATGC	STM1031	-	Test Deletion
1031Test.R	CGCGGCGCCCCTTC	STM1031	-	Test Deletion
1033.F1	GCTGGTATTCCATCAGGGCTGCAGCCAATAACACGGCGGAAGTCCG CATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM1033	-	Deletionsprimer
1033.R1	CTGCTTTTAGTGGGTTATACGGTGCATTTACCATGCCGCGATAATC CACCATATGAATATCCTCCTTA	STM1033	-	Deletionsprimer
1033Test.F	GGACGCGGGGAGGG	STM1033	-	Test Deletion
1033Test.R	CGGCACGCCGTGCC	STM1033	-	Test Deletion
STM1042.5prime	CGTGACGGCGGCAGGCTGAGCGGGGCATATCGATGATGAAAACCTT TCACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM1042	-	Deletionsprimer
STM1042.3prime	TTCGATCAAAAATACTAAGAAATAACCTGCTCAAATGTCGCGGTGA ATGTCATATGAATATCCTCCTTA	STM1042	-	Deletionsprimer
STM1042Test.5	GCAATCAGCAACACG	STM1042	-	Test Deletion
STM1042Test.3	CCTAACGCCAGACC	STM1042	-	Test Deletion
1257.F1	GGTGGTGCTTAATCGATCGCTGGAGCGTCCCGATGCTCTATAATCCT GCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM1257	-	Deletionsprimer

1257.R1	AACCTGTTGTAAACTCAGCATACGTCACCTTAGCCACAGCCGCTG AATCATATGAATATCCTCCTTA	STM1257	-	Deletionsprimer
1257Test.F	GATGCCGGCCTGCG	STM1257	-	Test Deletion
1257Test.R	GCGATAACGCGCGC	STM1257	-	Test Deletion
STM1555.5prime	ATACCCTTTAAACGAACAAATATGAGCTTAACATGGCGACAATAAA GGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM1555	-	Deletionsprimer
STM1555.3prime	TGTTGACGACGCATTCACCGTGAAAAATAGGGCGCGACAGAATCGC GGATCATATGAATATCCTCCTTA	STM1555	-	Deletionsprimer
STM1555Test.5	GCCGAGTGATTGC	STM1555	-	Test Deletion
STM1555Test.3	GGGATACGCTTCC	STM1555	-	Test Deletion
STM1677.5prime	TTCTGATAAATGGGATAATTGGCGGGGGGAAAATGGACAAGCTGGA AGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM1677	-	Deletionsprimer
STM1677.3prime	CCGGAATAATATTTTTAGCGAAGAGGCCCGGCTGGCTCAGCGCCG TTTTCATATGAATATCCTCCTTA	STM1677	-	Deletionsprimer
STM1677Test.5	GCACTGACGCCCC	STM1677	-	Test Deletion
STM1677Test.3	CGCCGTGTAGCACC	STM1677	-	Test Deletion
cobS.5prime	CTGGTAGTCTCAGGTATTGGAGTCAAATTAATGAGTAAGCTGTTT TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM2017	-	Deletionsprimer
cobS.3prime	CCGTAATAATCGGCTCATAACAGAGCCAGCAGAAAGATCAATTCAC CAAGCATATGAATATCCTCCTTA	STM2017	-	Deletionsprimer
cobSTest.5	AACCAACGACTGGCGGC	STM2017	-	Test Deletion
cobSTest.3	TGAGCGGCAAGCACGC	STM2017	-	Test Deletion
STM2603to05.5prime	CGCGGCGAGCCGTCAGACGGAGGAGGAAAAGCGTGCAACGTAATCT CTCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	STM2603-05	-	Deletionsprimer
STM2603to05.3prime	GCCTTTTGGGATGCTTAACCGACAGTGACAATGACAACTCATCCGG GTCCATATGAATATCCTCCTTA	STM2603-05	-	Deletionsprimer
STM2603Test.5	GGAATCCGAAGAACG	STM2603	-	Test Deletion
STM2603Test.3	CCATCCATGACACG	STM2603	-	Test Deletion
phoP4	GCCATGACGCCGGC	<i>phoP</i>	-	
phoP5	CGCAGCGACAGCGGC	<i>phoP</i>	-	
kanR1	CCTTGCGCAGCTGTGC	Kanamycin- Resistenzkassette	-	
kanR2	CCGGCTACCTGCCC	Kanamycin- Resistenzkassette	-	
kanR3	GCGCTGCGAATCGGG	Kanamycin- Resistenzkassette	-	

pBR322.F	CCGAGCGCAGAAGTGG	Vektor pBR322	-	
pBR322.R	CCACGCCGAAACAAGC	Vektor pBR322	-	
1677.Seq	CTGAACAGGCAATGCG	STM1677	-	Sequenzierung
phoP.Seq	GAAGAGATGATGCGCG	<i>phoP</i>	-	Sequenzierung
pocR.F1	GCGAGATCTGTCTGATGAGCGATCGC	<i>pocR</i>	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
pocR.R1	GCGAGATCTCAGCCTGCCAGCGATCG	<i>pocR</i>	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
phoN.F1	ACGGGGTACCGGCTTACCGCTATG	<i>phoN</i>	<i>Kpn</i> I	gezielte IDM
phoN.R1	ACGGGGTACCAGTAGCGTAGTAGCC	<i>phoN</i>	<i>Kpn</i> I	gezielte IDM
phoN.R2	ACGGGGTACCACGCTTACATCTGC	<i>phoN</i>	<i>Kpn</i> I	gezielte IDM
phoN.R3	ACGGGGTACCCTTTATCGCATAGCC	<i>phoN</i>	<i>Kpn</i> I	gezielte IDM
phoN.R4	ACGGGGTACCTCCTTATCATAGCG	<i>phoN</i>	<i>Kpn</i> I	gezielte IDM
1540ins.5prime	GGAAGATCTTGAAGGCATGAATAGC	STM1540	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
1540ins.3prime	GGAAGATCTGAAGAGCGGTCCAC	STM1540	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
1554ins.5prime	GGAAGATCTTAGCTCTCTGCATTC	STM1554	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
1554ins.3prime	GGAAGATCTGTATCGTAAACCCAG	STM1554	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
1558ins5.prime	GGAAGATCTTTACCCAGCTTAATTC	STM1558	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
1558ins.3prime	GGAAGATCTTTAAATGACAGCGTGG	STM1558	<i>Bgl</i> II	gezielte IDM
C1257.fw	CCGGAATTCCGGTTGGACTCCATAG	-	<i>Eco</i> RI	Komplementation
C1257.re	CCGGAATTCCGGCAGCAGATCG	-	<i>Eco</i> RI	Komplementation
1555Komp.F	AAAAGTGCAGTGGTCAATAACTCATTG	STM1555	<i>Pst</i> I	Komplementation
1555Komp.R	AAAAGTGCAGTAAGGTAGCTCAAGGG	STM1555	<i>Pst</i> I	Komplementation
C1555.F	GCGGCCATCACATCG	STM1555	-	Komplementation
C1555.R	CATCCATGGCCGGTG	STM1555	-	Komplementation

6.2 Verwendete Nährmedien und Pufferlösungen

LB-Medium

Bacto Trypton	10 g
Bacto Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
1000 ml ddH ₂ O, autoklavieren	

50x TAE

TRIS	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
ad 1000 ml ddH ₂ O	

10x PBS

KCl	2 g
NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
MgCl ₂	1 g
ad 1000 ml ddH ₂ O, autoklavieren	

10x M9-Stock

Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g
ad 1000 ml ddH ₂ O, sterilfiltrieren	

Minimalmedium

ddH ₂ O	440 ml
10x M9-Stock	50 ml
20 % Glukose	10 ml
1 M MgSO ₄	500 µl
0,1 M CaCl ₂	500 µl
20 % CAA	2,5 ml
sterilfiltrieren	

SOB-Medium

Bacto Trypton	20 g
Bacto Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,2 g
ad 1000 ml ddH ₂ O, autoklavieren	
anschließend 10 ml 2 M Mg ²⁺ zugeben (1 M MgCl ₂ , 1 M MgSO ₄)	

SOC-Medium (Elektroporation)

SOB-Medium	48 ml
1 M MgSO ₄	1 ml
1 M Glucose	1 ml
sterilfiltrieren	

6.3 Intrazelluläre Überlebensdaten für Insertionsmutanten

Tabelle 22: Intrazelluläre Überlebensdaten für Insertionsmutanten

Die erste Spalte führt alle Insertionsmutanten aufsteigend nach interner Nummerierung auf. In der zweiten Spalte sind die Prozentwerte des intrazellulären Überlebens der jeweiligen Mutante bezogen auf *S. typhimurium* Wildtyp angegeben. Dabei handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens zwei, oft vier unabhängigen Einzelmessungen, deren Standardabweichung in der dritten Spalte angegeben ist. Mit aufgeführt sind Daten für die vier zielgerichtet erzeugten Mutanten in *pocR*, STM1540, STM1554 und STM1558. Fünf Mutanten sind nicht attenuiert, da sie eine intrazelluläre Überlebensrate auf Wildtypniveau zeigen.

Stammbezeichnung	Intrazelluläre Überlebensrate bezogen auf wt (in Prozent)	SD der Zusammenführung der Einzelversuche
14028-Ins001	1,11	0,56
14028-Ins002	54,48	17,33
14028-Ins003	28,83	9,47
14028-Ins004	33,70	6,75
14028-Ins005	37,74	11,84
14028-Ins006	27,08	14,03
14028-Ins007	34,08	21,01
14028-Ins008	19,08	10,20
14028-Ins009	15,51	1,86
14028-Ins010	3,41	0,13
14028-Ins011	5,67	1,57
14028-Ins012	12,42	2,74
14028-Ins013	3,54	0,96
14028-Ins014	4,02	0,47
14028-Ins015	16,84	7,35
14028-Ins016	0,63	0,41
14028-Ins017	1,54	0,29
14028-Ins018	4,04	1,10
14028-Ins019	5,41	1,36
14028-Ins020	0,80	0,27
14028-Ins021	2,64	0,60
14028-Ins022	2,16	0,18
14028-Ins023	3,25	1,45
14028-Ins024	58,09	0,60
14028-Ins025	16,04	4,45
14028-Ins026	11,38	0,62
14028-Ins027	57,84	28,27
14028-Ins028	nicht attenuiert	
14028-Ins029	41,00	24,63
14028-Ins030	10,97	3,52
14028-Ins031	16,97	1,66
14028-Ins032	nicht attenuiert	
14028-Ins033	71,26	6,13
14028-Ins034	13,24	3,19
14028-Ins035	nicht attenuiert	
14028-Ins036	54,47	11,66
14028-Ins037	0,99	0,13
14028-Ins038	17,49	4,92
14028-Ins039	42,01	10,25
14028-Ins040	17,21	3,84

Stammbezeichnung	Intrazelluläre Überlebensrate bezogen auf wt (in Prozent)	SD der Zusammenführung der Einzelversuche
14028-Ins041	18,61	5,94
14028-Ins042	6,91	2,69
14028-Ins043	16,84	2,20
14028-Ins044	13,43	3,20
14028-Ins045	14,04	3,87
14028-Ins046	2,13	0,74
14028-Ins047	21,02	8,53
14028-Ins048	20,65	10,57
14028-Ins049	40,22	5,19
14028-Ins050	12,34	0,05
14028-Ins051	35,02	16,59
14028-Ins052	1,90	0,50
14028-Ins053	13,68	4,13
14028-Ins054	5,80	2,10
14028-Ins055	14,71	0,37
14028-Ins056	3,69	0,69
14028-Ins057	1,43	0,38
14028-Ins058	8,81	1,43
14028-Ins059	8,74	0,87
14028-Ins060	11,73	0,38
14028-Ins061	9,71	2,67
14028-Ins062	11,31	6,70
14028-Ins063	8,83	4,27
14028-Ins064	3,45	1,84
14028-Ins065	5,40	1,40
14028-Ins066	5,56	1,07
14028-Ins067	4,51	2,23
14028-Ins068	14,88	4,67
14028-Ins069	3,92	0,23
14028-Ins070	11,45	4,80
14028-Ins071	16,39	4,36
14028-Ins072	33,23	7,87
14028-Ins073	9,59	0,34
14028-Ins074	10,75	1,70
14028-Ins075	8,02	0,36
14028-Ins076	4,75	1,37
14028-Ins077	3,09	0,12
14028-Ins078	5,31	1,18
14028-Ins079	4,92	1,12
14028-Ins080	6,11	1,52
14028-Ins081	8,80	0,68
14028-Ins082	12,62	2,54
14028-Ins083	32,11	1,00
14028-Ins084	24,71	0,55
14028-Ins085	12,93	1,29
14028-Ins086	12,32	0,86
14028-Ins087	60,86	6,63
14028-Ins088	21,43	1,22
14028-Ins089	12,51	1,74
14028-Ins090	12,82	6,20
14028-Ins091	25,33	17,65

Stammbezeichnung	Intrazelluläre Überlebensrate bezogen auf wt (in Prozent)	SD der Zusammenführung der Einzelversuche
14028-Ins092	18,61	0,09
14028-Ins093	2,04	1,39
14028-Ins094	56,75	16,64
14028-Ins095	26,43	1,47
14028-Ins096	17,71	4,80
14028-Ins097	nicht attenuiert	
14028-Ins098	28,04	2,62
14028-Ins099	53,01	15,73
14028-Ins100	78,57	13,53
14028-Ins101	17,23	2,02
14028-Ins102	26,14	4,33
14028-Ins103	9,55	2,02
14028-Ins104	75,57	7,55
14028-Ins105	18,05	11,31
14028-Ins106	15,76	3,52
14028-Ins107	9,57	0,69
14028-Ins108	17,88	10,49
14028-Ins109	6,35	2,51
14028-Ins110	7,71	1,59
14028-Ins111	9,87	1,75
14028-Ins112	15,87	1,39
14028-Ins113	16,88	5,05
14028-Ins114	16,38	3,72
14028-Ins115	12,62	2,39
14028-Ins116	10,57	4,42
14028-Ins117	8,95	1,95
14028-Ins118	13,31	0,76
14028-Ins119	11,11	0,91
14028-Ins120	16,81	0,45
14028-Ins121	17,87	3,36
14028-Ins122	18,10	3,78
14028-Ins123	23,32	6,82
14028-Ins124	8,18	1,03
14028-Ins125	11,69	0,53
14028-Ins126	10,39	0,79
14028-Ins127	2,94	0,27
14028-Ins128	17,14	0,17
14028-Ins129	16,50	0,71
14028-Ins130	61,19	15,07
14028-Ins131	32,39	5,58
14028-Ins132	1,17	0,28
14028-Ins133	32,87	0,14
14028-Ins134	28,55	8,51
14028-Ins135	39,77	10,82
14028-Ins136	63,63	3,04
14028-Ins137	31,78	6,78
14028-Ins138	20,74	0,79
14028-Ins139	14,80	1,05
14028-Ins140	39,27	1,93
14028-Ins141	65,30	6,92
14028-Ins142	43,78	7,98

Stammbezeichnung	Intrazelluläre Überlebensrate bezogen auf wt (in Prozent)	SD der Zusammenführung der Einzelversuche
14028-Ins143	20,19	8,28
14028-Ins144	5,51	0,60
14028-Ins145	63,10	8,07
14028-Ins146	14,95	3,11
14028-Ins147	22,88	5,05
14028-Ins148	16,78	3,14
14028-Ins149	55,68	10,90
14028-Ins150	6,10	0,38
14028-Ins151	37,76	21,71
14028-Ins152	nicht attenuiert	
14028-Ins153	7,36	1,22
14028-Ins154	10,28	0,72
14028-Ins155	3,11	0,12
14028-Ins156	12,20	0,65
14028-Ins157	17,45	1,29
14028-Ins158	20,44	0,21
14028-Ins159	19,89	3,23
14028-Ins160	9,93	2,29
14028-Ins161	27,24	8,50
14028-Ins162	24,91	12,78
14028-Ins163	86,48	19,21
14028-Ins164	81,41	21,23
14028-Ins165	11,97	6,73
14028-Ins166	29,46	13,57
14028-Ins167	35,35	13,97
14028-Ins168	43,98	16,81

Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen

Fuchs, T. M., Klumpp, J., Przybilla, K. (2005): „Insertion-duplication mutagenesis of *Salmonella enterica* and related species using a novel thermosensitive vector“, Plasmid, *in press*

Klumpp, J., Fuchs T. M. (2005): „Multiple insertions identify novel genomic islands contributing to *Salmonella enterica* sv. Typhimurium replication in macrophages“, *submitted*

Klumpp, J., Schauer, K., Fuchs, T. M. (2005): „Identification and functional analysis of Oxd-6, a putative ABC transporter of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium“, *in preparation*

Posterpräsentationen

Klumpp, J., Fuchs, T. M. „Identification and characterisation of novel gene clusters contributing to intracellular survival of *Salmonella*“; Leopoldina Symposium „Thread of Infection“, 25.-28. Juli 2004, Würzburg

Przybilla, K., Klumpp, J., Fuchs, T. M.: „Functional genome analysis of *Salmonella*“; *Salmonella: Pathogenesis, Epidemiology, and Vaccine Development*, September 2003, Alghero (Sardinien), Italien

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Dipl.-Biol. Jochen Klumpp

* 06.07.1976, Würzburg

AUSBILDUNG

- 11.2002 - 10.2005 Promotion, Abteilung Mikrobiologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Technische Universität München, Professor S. Scherer
- 09.1997 - 10.2002 Diplomstudium Biologie, Universität Würzburg
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Informatik, Biochemie
01.2002 - 10.2002
Diplomarbeit: „Erweiterung eines hierarchischen Katalogs zur Proteinfunktionsklassifikation (FunCat) und genomweite funktionelle Analyse der Genprodukte von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua*“, Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS) und Lehrstuhl für Bioinformatik der Technischen Universität München, Professor H. W. Mewes
Abschluss: Diplom-Biologe
- 11.2000 - 12.2000 Mikrobiologisches Fortgeschrittenenpraktikum, Universidad Complutense, Madrid, Spanien, Grupo de Pathogénesis Molecular Bacteriana, Professor José A. Vázquez-Boland
Projekt: „Role of the cholesterol oxidase ChoE in the intracellular survival ability of *Rhodococcus equi* within murine macrophages“
- 03.1999 - 04.1999 Praktikum „Marine Evertibraten des Mittelmeeres“, Insel Giglio, Italien
- 1987 - 1996 Naturwissenschaftliches Schönborn-Gymnasium Würzburg
Abschluss: Abitur