



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Regulation des *myo*-Inositol-Metabolismus von
Salmonella Typhimurium durch den Aktivator ReiD
und die sRNA RssR

Johannes Erhard Rothhardt

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Thilo M. Fuchs
2. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 09.03.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.05.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Zusammenfassung | 6 |
| Abstract | 8 |
| Abbildungsverzeichnis | 10 |
| Tabellenverzeichnis | 12 |
| Abkürzungsverzeichnis | 13 |
| 1 Einleitung | 16 |
| 1.1 Die Gattung <i>Salmonella</i> | 16 |
| 1.1.1 Pathogenese der Salmonellose..... | 16 |
| 1.1.2 Die Rolle der <i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinseln für die Pathogenese..... | 19 |
| 1.2 Metabolismus als Virulenzfaktor..... | 24 |
| 1.3 Der bakterielle MI-Metabolismus..... | 31 |
| 1.3.1 <i>myo</i> -Inositol - Ökologische Bedeutung..... | 31 |
| 1.3.2 Enzymatischer Abbau von MI..... | 32 |
| 1.3.3 Genetik des MI-Katabolismus in <i>B. subtilis</i> | 34 |
| 1.4 MI-Metabolismus von <i>S. Typhimurium</i> | 35 |
| 1.4.1 Struktur und transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436..... | 36 |
| 1.4.2 Regulation der <i>iol</i> -Gene..... | 38 |
| 1.4.3 MI-Metabolismus und Virulenz in <i>S. Typhimurium</i> | 41 |
| 1.5 Ziel dieser Arbeit..... | 43 |
| 2 Material und Methoden | 44 |
| 2.1 Mikrobiologische Methoden..... | 44 |
| 2.1.1 Bakterienstämme..... | 44 |
| 2.1.2 Kultivierung von Bakterien..... | 46 |
| 2.1.3 Herstellung von Spezialmedien..... | 49 |
| 2.1.4 Phagentransduktion..... | 49 |
| 2.1.5 Lagerung von Bakterien..... | 50 |
| 2.2 Zellkultur..... | 50 |
| 2.2.1 Eukaryotische Zelllinien..... | 50 |
| 2.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen..... | 50 |
| 2.2.3 Langfristige Lagerung der eukaryotischen Zellen..... | 51 |
| 2.2.4 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen..... | 51 |
| 2.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl..... | 52 |
| 2.3 Molekulargenetische Methoden..... | 53 |
| 2.3.1 Plasmide..... | 53 |
| 2.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren..... | 56 |
| 2.3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA..... | 56 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.2.2 | Plasmidisolierung | 56 |
| 2.3.2.3 | Präparation von RNA aus <i>S. Typhimurium</i> | 56 |
| 2.3.3 | Analyse von Nukleinsäuren..... | 58 |
| 2.3.3.1 | Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren | 58 |
| 2.3.3.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 58 |
| 2.3.3.3 | Northern Blot | 59 |
| 2.3.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 61 |
| 2.3.4.1 | Standard PCR..... | 61 |
| 2.3.4.2 | Quantitative real-time-PCR | 63 |
| 2.3.4.3 | Aufreinigung von PCR-Produkten..... | 65 |
| 2.3.5 | Bestimmung des Transkriptionsstarts | 66 |
| 2.3.6 | Enzymatische Modifikation von DNA..... | 68 |
| 2.3.6.1 | Spezifische Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen | 68 |
| 2.3.6.2 | Ligation | 69 |
| 2.3.7 | DNA-Transfer | 70 |
| 2.3.7.1 | Konjugation | 70 |
| 2.3.7.2 | Transformation..... | 70 |
| 2.3.8 | Genetische Modifikation von <i>S. Typhimurium</i> | 71 |
| 2.3.8.1 | Herstellung von Deletionsmutanten | 71 |
| 2.3.8.2 | Herstellung von chromosomalen Reporterstämmen..... | 72 |
| 2.3.9 | Sequenzierung von DNA | 73 |
| 2.3.10 | Bioinformatische Methoden | 73 |
| 2.3.11 | Quantifizierung der Biolumineszenz | 74 |
| 2.3.12 | Herstellung von rekombinanten Plasmiden zur Überexpression von sRNA | 75 |
| 2.4 | Proteinchemische Methoden | 75 |
| 2.4.1 | Überexpression und Präparation von Proteinen | 75 |
| 2.4.1.1 | Überexpression mittels pBAD-Myc/HisC, pBAD/HisA (Tet ^R) oder pET28b..... | 75 |
| 2.4.1.2 | Zellaufschluss und Ni-NTA-Affinitätschromatographie | 76 |
| 2.4.1.3 | Rückfaltung des unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Proteins ReiD via Dialyse | 77 |
| 2.4.2 | Analyse von Proteinen | 77 |
| 2.4.2.1 | Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD..... | 77 |
| 2.4.2.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 77 |
| 2.4.2.3 | Western Blot..... | 80 |
| 2.4.2.4 | Immunochemische Detektion | 81 |
| 2.4.2.5 | Gelmobilitätsstudien | 82 |
| 3 | Ergebnisse | 83 |
| 3.1 | Abundanz und transkriptionelle Organisation der genomischen Insel GEI4417/4436 | 83 |
| 3.1.1 | Bioinformatische Untersuchung zur Abundanz der GEI4417/4436 | 83 |
| 3.1.2 | Physiologische Untersuchungen zur Abundanz des MI-Metabolismus bei Salmonellen | 85 |
| 3.1.3 | Die transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 ist dynamisch..... | 86 |
| 3.2 | Funktionelle Analyse von <i>reiD</i> und ReiD | 89 |
| 3.2.1 | Das Produkt des Gens <i>reiD</i> hat Homologien zu AraC-ähnlichen Regulatoren mit DNA- Bindedomäne..... | 89 |
| 3.2.2 | ReiD ist essentiell für das Wachstum mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle | 90 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.3 Die Deletion von <i>reiD</i> hat Einfluss auf das Wachstum von 14028 unter ökologisch relevanten Kulturbedingungen | 92 |
| 3.2.4 Die Überexpression von <i>iolE</i> und <i>iolG1</i> entkoppelt den MI-Abbau von <i>reiD</i> | 93 |
| 3.2.5 ReiD aktiviert die Transkription von P_{iolE} in einem heterologen System..... | 95 |
| 3.2.6 ReiD induziert als positiver Autoregulator seine eigene Expression sowie auch die anderer Gene der GEI4417/4436..... | 96 |
| 3.2.7 ReiD bindet an P_{iolE} und an seinen eigenen Promotor | 99 |
| 3.2.8 Die Transkription von <i>reiD</i> wird durch IoIR reprimiert | 100 |
| 3.2.9 Test verschiedener Kulturbedingungen zur Stimulierung der <i>iol</i> -Promotoren..... | 102 |
| 3.3 Die sRNA RssR wird von SsrB induziert und ist durch die Stabilisierung der mRNA <i>reiD</i> Teil des Regulons des MI-Metabolismus in <i>S. Typhimurium</i> | 105 |
| 3.3.1 Identifizierung von zwei sRNAs, die auf der GEI4417/4436 kodiert sind..... | 105 |
| 3.3.2 STnc1740 und STnc2160 beeinflussen das Wachstumsverhalten von <i>S. Typhimurium</i> in MI-Medium | 108 |
| 3.3.3 SsrB bindet an P_{rssR} und induziert dessen Aktivität..... | 111 |
| 3.3.4 RssR erhöht die Menge der <i>reiD</i> mRNA | 113 |
| 3.3.5 Die Deletion von <i>rssR</i> führt zur Destabilisierung der <i>reiD</i> mRNA | 115 |
| 3.3.6 Die Deletion von <i>hfq</i> bewirkt einen signifikanten Wachstumsdefekt von <i>Salmonella</i> in MI-Medium | 117 |
| 3.4 Einfluss von IoIR, SsrB und H-NS auf das Expressionsmuster der GEI4417/4436..... | 121 |
| 3.4.1 IoIR bindet und reprimiert die <i>iol</i> -Promotoren der GEI4417/4436 | 121 |
| 3.4.2 SsrB bindet und induziert P_{srfJ} | 125 |
| 3.4.3 H-NS bindet Promotoren und intragenische Sequenzen der GEI4417/4436..... | 127 |
| 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse | 130 |
| 4 Diskussion | 132 |
| 4.1 Taxonomische Restriktion des MI-Metabolismus | 132 |
| 4.2 Relevanz von ReiD für das <i>in vivo</i> Verhalten von <i>S. Typhimurium</i> | 133 |
| 4.3 Einfluss der globalen Regulatoren SsrB und H-NS auf die Expression der Gene der GEI4417/4436..... | 140 |
| 4.3.1 SrfJ wird sowohl durch die Aktivierung des MI-Metabolismus als auch in der intrazellulären Phase exprimiert..... | 140 |
| 4.3.2 H-NS als Schlüsselement des <i>xenogeneic silencing</i> | 143 |
| 4.4 Modell zur Regulation der GEI4417/4436 im Zusammenspiel zwischen MI-Metabolismus und Virulenz..... | 147 |
| Veröffentlichungen | 152 |
| Anhang | 153 |
| Literaturverzeichnis..... | 163 |
| Danksagung..... | 184 |

Zusammenfassung

Das gramnegative Bakterium *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium zählt zu den häufigsten Verursachern bakterieller Darminfektionen bei Menschen und endothermen Tieren. Die Bakterien werden über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen und gelangen so in den Intestinaltrakt des Wirts, wo sie die mikrobielle Flora auskonkurrieren, proliferieren und eine Entzündung des Darmepithels auslösen können. Die Infektionen können insbesondere für Kleinkinder, alte und immungeschwächte Menschen letale Folgen haben. Über den Metabolismus von *S. Typhimurium* während der Infektion ist bisher nur wenig bekannt. Wie Forschungsarbeiten in der jüngeren Vergangenheit gezeigt haben, stellt jedoch gerade die metabolische Kapazität eines Pathogens einen wichtigen Faktor für eine erfolgreiche Infektion dar. Spezifische metabolische Eigenschaften ermöglichen es den Pathogenen, unter wechselnden Bedingungen gegen die Mikrobiota zu konkurrieren und Nischen im Wirt erfolgreich zu besetzen. Die Nutzung von *myo*-Inositol (MI) als Kohlenstoff- und Energiequelle stellt für *S. Typhimurium* einen solchen Faktor in der Schnittmenge von Metabolismus und Virulenz dar. Zum einen sind die *iol*-Gene, die für diese Eigenschaft kodieren, essentiell für die Nutzung von MI *in vitro*. Zum anderen führt die Deletion dieser Gene zur Attenuation der Virulenz in verschiedenen Tiermodellen. In dieser Arbeit wurde die Regulation und die *in vivo* Relevanz dieses Stoffwechselwegs eingehend untersucht.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die genomische Insel GEI4417/4436, auf der die *iol*-Gene kodiert sind, einer komplexen Regulation unterliegt. Neben dem bereits bekannten Repressor IolR konnte ein bislang unbekannter weiterer Regulator des MI-Metabolismus auf der Insel identifiziert und analysiert werden. Wie die Untersuchung des als „ReiD“ benannten Autoregulators ergab, ist dieser taxonomisch auf nicht-typhöse Salmonellen und den *E. coli* Stamm ED1a begrenzt. Den Zusammenhang zwischen MI-Metabolismus und Virulenz bestärkt dabei das Ergebnis der phylogenetischen Untersuchung: Die Mehrheit der Stämme, die die Insel tragen, gehören zu *S. enterica* subsp. *enterica*. Diese Subspezies infiziert im Gegensatz zu den übrigen Subspezies typischerweise endotherme Wirbeltiere, wie z. B. Menschen, Schweine, Rinder und Geflügel, deren Nahrung reich an MI ist. Durch Wachstumsversuche mit MI-Medium konnte gezeigt werden, dass ReiD essentiell für den Metabolismus von MI ist. Zudem wirkt sich die ReiD-Überexpression positiv auf das Wachstum aus, was sich in der Halbierung der 40-60 Stunden dauernden lag-Phase

äußert. Unter Verwendung von Gelmobilitätsstudien (GMSA) und chromosomalen *lux*-Reportern wurde nachgewiesen, dass ReiD den Promotor des essentiellen Operons *iolE/iolG1* bindet und induziert. Dessen Genprodukte katalysieren die ersten beiden Reaktionen beim Abbau von MI. Die ökologische Relevanz des MI-Metabolismus konnte anhand von ReiD bestätigt werden: Die Wachstumsraten der *reiD*-Mutante waren signifikant niedriger als die des Wildtyps in Medien, die aus dem Inhalt des Schweinecaecums oder Maissilage hergestellt wurden. Mittels GMSA und chromosomaler *lux*-Reporter konnte gezeigt werden, dass IolR den Promotor P_{reiD} bindet und reprimiert, was belegt, dass auch *reiD* Teil des IolR-Regulons ist. Die Bindung des globalen Repressorproteins H-NS konnte an mehreren Regionen innerhalb der Insel mittels GMSA nachgewiesen werden, was die Annahme bestärkt, dass die GEI4417/4436 durch horizontalen Gentransfer verbreitet wird.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Expression von ReiD auch von der bislang unbekanntenen sRNA RssR reguliert wird. Diese ist ebenso wie *reiD* taxonomisch begrenzt auf *Salmonella*-Stämme, die die GEI4417/4436 tragen. Das Gen *rssR* befindet sich auf demselben DNA-Strang wie das 5'-gelegene Gen *iolB*, mit dem es zu 13 Nukleotiden überlappt. Die sRNA verfügt über einen eigenen Promotor, der innerhalb der kodierenden Region von *iolB* liegt, sodass es sich bei RssR um ein primäres Transkript handelt. Die Deletion von *rssR* führt zu einer Verdopplung der Generationszeit und einer verzögerten lag-Phase in MI-Medium. Die Überexpression von RssR resultiert in einer höheren optischen Dichte der Kultur in der stationären Phase. Wie durch Northern Blots gezeigt werden konnte, wird RssR von den Zellen in MI-Medium, aber nicht in Glukosemedium exprimiert. qRT-PCRs ergaben, dass RssR keine direkte Induktion des Promotors P_{reiD} bewirkt, sondern die mRNA *reiD* stabilisiert. Dabei spielt auch Hfq eine Rolle, da dieses RNA Chaperon RssR bindet und so dessen Interaktion mit der Ziel-mRNA vermutlich erst ermöglicht. Durch GMSA und Reporterstudien wurde der Hauptregulator SsrB der *Salmonella* Pathogenitätsinsel-2 (SPI-2) als Aktivator von P_{rssR} identifiziert. SsrB bindet dabei direkt an P_{rssR} und induziert die Transkription der sRNA. Somit hängt die ReiD-Expression sowohl direkt von IolR als auch indirekt von dem Hauptvirulenzregulator SsrB ab.

In dieser Arbeit wurden zwei neue Regulationsfaktoren des MI-Abbauweges, die sRNA RssR und der Aktivator ReiD, identifiziert und charakterisiert. Der von der Pathogenitätsinsel SPI-2 kodierte Hauptvirulenzregulator SsrB kontrolliert die Expression der sRNA *rssR*, die wiederum das Transkript von *reiD* stabilisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern daher den Zusammenhang zwischen dem MI-Metabolismus und der Virulenz von Salmonellen.

Abstract

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium is a gram-negative bacterium and one of the most common causes of bacterial intestinal infections in humans and endothermic animals. Due to oral uptake of contaminated food, the bacteria enter the intestinal tract of the host where they compete with the microbial flora, proliferate and trigger inflammation of the intestinal epithelium. Especially for infants, old and immunocompromised humans the infection can have fatal consequences. So far little is known about the metabolism of *S. Typhimurium* during infection. However recent research has shown the metabolic capacity of a pathogen is an important factor for a successful infection. Under varying conditions specific metabolic abilities enable pathogens to compete against the microbiota and to successfully occupy niches in the host. The use of *myo*-inositol (MI) by *S. Typhimurium* as a source of carbon and energy is such a factor overlapping metabolism and virulence. On the one hand the *iol* genes coding for this property are essential for the use of MI *in vitro*. On the other hand the deletion of these genes leads to attenuation of virulence in different animal models. In the present study the regulation and the *in vivo* relevance of this metabolic pathway was investigated in detail.

The results show that the genomic island GEI4417/4436 on which the *iol* genes are encoded is subject to a complex regulation. In addition to the already known repressor IolR another regulator of the MI metabolism on the island, which was previously unknown, could be identified and analyzed. The investigation of the autoregulator termed "ReiD" revealed that it is taxonomically restricted to non-typhoidal *Salmonella* and the *E. coli* strain ED1a. The relation between MI metabolism and virulence is confirmed by the results of the phylogenetic investigation: the majority of the strains carrying the island belong to *S. enterica* subsp. *enterica*. In contrast to other subspecies this subspecies typically infects endothermic vertebrates, such as humans, pigs, cattle and poultry, whose food is rich in MI. By growth experiments with MI medium it was shown that ReiD is essential for the metabolism of MI. In addition overexpression of ReiD has a positive effect on the growth, which is expressed by the halving of the 40-60 hour lag phase. Using gelelectrophoretic mobility shift assays (GMSA) and chromosomal *lux*-reporters ReiD has been shown to bind and induce the promoter of the essential operon *iolE/iolG1*. Its gene products catalyze the first two reactions of the MI degradation pathway. The ecological relevance of the MI metabolism was confirmed by ReiD: The growth rates of the *reiD* mutant were significantly lower than

those of the wild type in media made of swine caecum content or corn silage. Due to GMSA and chromosomal *lux*-reporters it was shown that IolR binds and represses the promoter P_{reiD} , which demonstrates that *reiD* is also part of the IolR regulon. Using GMSA the binding of the global repressor protein H-NS could be detected in several regions within the island, which supports the assumption that the GEI4417/4436 is spread via horizontal gene transfer.

Further investigations show that the expression of ReiD is also regulated by the novel sRNA RssR. Comparable to ReiD RssR is taxonomically restricted to *Salmonella* strains carrying GEI4417/4436. The sRNA is sharing 13 nucleotides with the 5'-upstream gene *iolB*, which is located on the same DNA strand. RssR is a primary transcript with its own promoter, which is located within the coding region of *iolB*. The deletion of *rssR* doubles the generation time and delays the lag phase in MI medium. The overexpression of RssR leads to a higher optical density of the culture in the stationary phase. In *Salmonella* wildtype RssR is expressed in MI medium whereas no expression of the sRNA could be observed in glucose medium using Northern blots. qRT-PCRs revealed that RssR does not induce P_{reiD} directly but stabilizes the mRNA *reiD*. Since RssR is bound by Hfq the RNA chaperon seems to play an important role for the interaction between sRNA and mRNA *reiD*. Due to GMSA and reporter studies the main regulator SsrB of the *Salmonella* pathogenicity island-2 (SPI-2) was identified as an activator of P_{rssR} . SsrB binds directly to P_{rssR} and induces transcription. Thus, ReiD expression depends directly on IolR as well as indirectly on the main virulence regulator SsrB.

The sRNA RssR and the activator ReiD were identified and characterized as two novel regulatory factors of the MI degradation pathway. The main virulence regulator SsrB is encoded on the pathogenicity island SPI-2 and regulates the expression of the sRNA *rssR*, which stabilizes the transcript of *reiD*. Hence, the results of the present study support the link between MI metabolism and virulence in *Salmonella*.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 1: Phylogenie der Salmonellen. | 17 |
| Abb. 2: Strategien von Salmonellen zur Durchdringung der Darmbarriere..... | 21 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen, an denen das RNA Chaperon Hfq beteiligt sein kann. | 29 |
| Abb. 4: Strukturformel von <i>myo</i> -Inositol und Phytat. | 31 |
| Abb. 5: Der MI-Katabolismus von <i>B. subtilis</i> | 34 |
| Abb. 6: Wachstum von <i>S. Typhimurium</i> 14028 mit MI als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. | 36 |
| Abb. 7: Struktur, transkriptionelle Organisation und Regulation der genomischen Insel GEI4417/4436 | 37 |
| Abb. 8: Modell zur Regulation des MI-Metabolismus in <i>S. Typhimurium</i> | 40 |
| Abb. 9: Transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 mit Fokus auf <i>STM4428</i> und <i>STM4434</i> | 87 |
| Abb. 10: Transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 mit Fokus auf <i>srfJ</i> und <i>ioll1</i> | 88 |
| Abb. 11: Überexpression von <i>ReiD</i> -His ₆ mittels pBAD-Myc/His- <i>reiD</i> | 90 |
| Abb. 12: <i>reiD</i> ist essentiell für das Wachstum von 14028 mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle. | 91 |
| Abb. 13: Die Deletion von <i>reiD</i> verringert das Wachstum von 14028 in konditioniertem Medium von Kompost, Maissilage und Schweinecaecuminhalt. | 92 |
| Abb. 14: Die Überexpression von <i>iolE</i> und <i>iolG1</i> komplementiert die Deletion von <i>reiD</i> auf MI-Agar. | 93 |
| Abb. 15: Die Überexpression von <i>iolE</i> und <i>iolG1</i> komplementiert die Deletion von <i>reiD</i> in MI-Medium. | 94 |
| Abb. 16: Induktion von <i>P_{iolE}</i> durch <i>ReiD</i> in <i>E. coli</i> | 95 |
| Abb. 17: Transkription des <i>reiD</i> Promotors. | 96 |
| Abb. 18: Transkriptionsaktivität von <i>P_{reiD}</i> des Reporterstammes 14028 <i>P_{reiD}::lux</i> während des Wachstums in MI-Medium. | 97 |
| Abb. 19: <i>ReiD</i> induziert die eigene Transkription sowie die von <i>iolR</i> , <i>iolA/iolB</i> , <i>iolE/iolG1</i> , <i>iolC1/iol2</i> und <i>ioll2/iolH</i> | 98 |
| Abb. 20: GMSA zur Bindung von <i>ReiD</i> an <i>P_{iolE}</i> und <i>P_{reiD}</i> | 99 |
| Abb. 21: GMSA zur Bindung von <i>IolR</i> an <i>P_{reiD}</i> | 100 |
| Abb. 22: Transkriptionelle Aktivität von <i>P_{reiD}</i> in 14028 und 14028Δ <i>iolR</i> in LB-Medium. | 101 |
| Abb. 23: Transkriptionelle Aktivität von <i>P_{reiD}</i> unter verschiedenen Kulturbedingungen. | 103 |
| Abb. 24: Proliferation und Promotoraktivität von 14028 pDEW- <i>P_{iolE}</i> und 14028 pDEW- <i>P_{sseA}</i> in Caco-2 Zellen. | 104 |
| Abb. 25: Identifizierung von <i>STnc1740</i> und <i>rssR</i> innerhalb der GEI4417/4436 | 106 |
| Abb. 26: Northern Blot von <i>Stnc1740</i> und <i>RssR</i> | 107 |
| Abb. 27: Darstellung der Deletionsmutante 14028Δ <i>rssR</i> | 108 |
| Abb. 28: Generationszeiten der <i>rssR</i> -Mutanten in MI-Medium. | 109 |
| Abb. 29: Wachstum der <i>rssR</i> -Mutanten in MI-Medium. | 109 |
| Abb. 30: Wachstum der <i>STnc1740</i> -Mutanten in MI-Medium. | 110 |
| Abb. 31: Bioinformatische Verifizierung des postulierten Promotors <i>P_{rssR}</i> | 111 |
| Abb. 32: Physiologische Wirkung von <i>SsrB_c</i> auf den Promotor von <i>rssR</i> | 112 |
| Abb. 33: Direkte Interaktion von <i>SsrB_c</i> mit dem Promotor von <i>rssR</i> | 113 |
| Abb. 34: Untersuchung der transkriptionellen Regulation von <i>reiD</i> durch <i>RssR</i> | 114 |
| Abb. 35: Die mRNA-Stabilität von <i>reiD</i> wird von <i>RssR</i> beeinflusst..... | 116 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 36: Ergebnis der Software-Analysen zur Struktur von RssR und der Interaktion mit der mRNA <i>reiD</i> | 117 |
| Abb. 37: Einfluss von Hfq auf den Wachstumsphänotyp von 14028 in LB-Medium. | 118 |
| Abb. 38: Einfluss von Hfq auf das Wachstum in MI-Medium. | 119 |
| Abb. 39: Einfluss von Hfq auf die Expression der <i>iol</i> -Gene in MI-Medium. | 120 |
| Abb. 40: Interaktion von SsrB _c mit dem Promotor von <i>srjJ</i> | 125 |
| Abb. 41: Einfluss von LPM-Medium auf die Transkriptionsaktivität von <i>srjJ</i> | 126 |
| Abb. 42: Effekt von SsrB _c auf P _{<i>srjJ</i>} im heterologen System mit <i>E. coli</i> TOP-Zellen. | 127 |
| Abb. 43: Visuelle Darstellung der H-NS-Bindestellen innerhalb der GEI4417/4436 nach LUCCHINI. | 128 |
| Abb. 44: Nachweis von H-NS-Bindungen an Sequenzen der GEI4417/4436 mittels GMSA. | 129 |
| Abb. 45: Modell zur Regulation und Funktion von RssR. | 139 |
| Abb. 46: Modell zur Regulation und transkriptionellen Organisation von <i>srjJ</i> | 142 |
| Abb. 47: Vollständige Darstellung der transkriptionellen Organisation und Regulation der genomischen Insel GEI4417/4436. | 147 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tab. 1: Gene der GEI4417/4436 von <i>S. Typhimurium</i> 14028 | 38 |
| Tab. 2: Die Deletion dieser Gene der GEI4417/4436 führt zur Attenuation in den jeweiligen Infektionsmodellen. | 42 |
| Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme | 44 |
| Tab. 4: Verwendete Medien | 46 |
| Tab. 5: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze | 48 |
| Tab. 6: Verwendete eukaryotische Zelllinie..... | 50 |
| Tab. 7: Verwendete Plasmide | 53 |
| Tab. 8: Prozessschritte im Thermocycler bei der Standard-PCR..... | 62 |
| Tab. 9: Prozessschritte zur cDNA-Synthese | 64 |
| Tab. 10: Programm des SmartCyclers. | 65 |
| Tab. 11: Prozessschritte der 5'-RACE. | 66 |
| Tab. 12: Prozessschritte der <i>tailing</i> -Reaktion. | 67 |
| Tab. 13: Prozessschritte zur Amplifizierung der 5'-RACE-Produkte..... | 68 |
| Tab. 14: Prozessschritte des Standard-Restriktionsverdaus. | 68 |
| Tab. 15: Häufig verwendete Restriktionsendonukleasen. | 69 |
| Tab. 16: Prozessschritte der Standard-Ligation. | 69 |
| Tab. 17: Verwendete bioinformatische Software..... | 73 |
| Tab. 18: Auflistung der <i>S. enterica</i> Serovare, deren Genomsequenz auf das Vorhandensein der GEI4417/4436 hin untersucht wurde. | 84 |
| Tab. 19: Generationszeit der sRNA-Mutanten in LB-Medium. | 108 |
| Tab. 20: Aktivitätsmessung der chromosomalen Reporter der Gene der GEI4417/4436 in LB-Medium, MM-Glukose und MI-Medium. | 122 |
| Tab. S1: Liste der verwendeten Primer..... | 153 |
| Tab. S2: Liste der untersuchten <i>Salmonella</i> -Stämme hinsichtlich eines MI-Metabolismus. | 159 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|-------------------------------------------------------|
| % | Prozent |
| μF | Mikrofarad |
| μm | Mikrometer |
| μM | Mikromolar |
| μl | Mikroliter |
| μg | Mikrogramm |
| Ω | Ohm |
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| AT-Gehalt | Adenin- und Thymin-Gehalt |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA) |
| cm | Zentimeter |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| DKP | 2-Deoxy-5-keto-D-Glucuronsäure-6-Phosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dsDNA | <i>double strand DNA</i> (Doppelstrang DNA) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum) |
| g | Gramm |
| GC-Gehalt | Guanin- und Cytosin-Gehalt |

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|
| GEF | <i>guanidine exchange factor</i> (Guanidin-Austauschfaktor) |
| GEI | Genomische Insel |
| GFP | <i>green flourescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein) |
| GMSA | <i>gelectrophoretic mobility shift assay</i> (Gelmobilitätsstudien) |
| h | <i>hours</i> (Stunden) |
| HGT | Horizontaler Gentransfer |
| IVIS | <i>in vivo imaging system</i> (<i>in vivo</i> Bildgebungssystem) |
| kDa | Kilodalton |
| kb | Kilobasen |
| KBE | Koloniebildende Einheit |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| LB | lysogenic broth (Lysogene Bouillon) |
| M | Mol |
| M-Zelle | Mikrofalten Zelle |
| mg | Milligramm |
| MI | <i>myo</i> -Inositol |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MM | Minimalmedium |
| MM-Glukose | Minimalmedium mit Glukose |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA |
| nm | Nanometer |
| nt | Nukleotid |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| o. g. | oben genannt |
| ORI | <i>origin of replication</i> (Replikationsursprung) |

| | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| PAI | Pathogenitätsinsel |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| pH | potentia hydrogenii (Wasserstoffionen-Aktivität) |
| ReiD | Regulator, der essentiell für die <i>myo</i> -Inositol Degradation ist |
| RLU | <i>relative light unit</i> (Relative Lichteinheiten) |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| rpm | round per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| s | Sekunde |
| s. g. | so genannt |
| s. u. | siehe (weiter) unten |
| ser. | Serovar |
| <i>spp.</i> | mehrere Spezies |
| subsp. | Subspezies |
| SCV | <i>Salmonella containing vacuole</i> (<i>Salmonella</i> enthaltende Vakuole) |
| SIF | <i>Salmonella</i> induziertes Filament |
| SIT | <i>Salmonella</i> induzierte Tubuli |
| SPI | <i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel |
| sRNA | <i>small regulatory RNA</i> (kleine regulatorische RNA) |
| ssDNA | <i>single strand DNA</i> (Einzelstrang DNA) |
| t | <i>time</i> (Zeit) |
| Tab. | Tabelle |
| U | <i>unit</i> (Einheiten) |
| ÜNK | Über Nacht Kulturen |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| UTR | Untranslatierte Region |
| WT | Wildtyp |
| z. B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Salmonella*

1.1.1 Pathogenese der Salmonellose

Salmonellen gehören zur Familie *Enterobacteriaceae* und zeichnen sich durch ihre fakultativ anaerobe sowie fakultativ intrazelluläre Lebensweise aus. Ihre peritriche Begeißelung ermöglicht ihnen Motilität im extrazellulären Stadium. Sie sind stäbchenförmig und haben eine Länge von 1,5 bis 3,5 µm und einen Durchmesser von 0,7 bis 1,0 µm (Aldea *et al.*, 1982). Die Gattung ist nach dem Veterinär Daniel Elmer Salmon benannt, der mit seinem Mitarbeiter Theobald Smith ein später als *Salmonella choleraesuis* benanntes Bakterium entdeckte (Salmon & Smith, 1886). Taxonomisch wird die Gattung *Salmonella* in die zwei Arten *S. enterica* und *S. bongori* klassifiziert (Abb. 1). Die Spezies *S. enterica* ist dabei in sechs Subspezies (I (*S. enterica*), II (*S. salamae*), IIIa (*S. arizonae*), IIIb (*S. diarizonae*), IV (*S. houtenae*), VI (*S. indica*)) unterteilt und umfasst mehr als 2500 Serovare. Von *S. bongori*, die auch als Subspezies V bezeichnet wird, sind mehr als 20 Serovare bekannt (Brenner *et al.*, 2000, Grimont & Weill, 2007). Die Differenzierung der Serovare erfolgt dabei nach dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema entsprechend der O- (Lipopolysaccharide) und H-Antigene (Flagellen) (Brenner *et al.*, 2000). Die Phylogenie der Salmonellen sowie das Auftreten wichtiger Virulenzfaktoren sind in Abb. 1 dargestellt (Bäumler, 1997, Cotter & DiRita, 2000, Groisman & Ochman, 1997, Desai *et al.*, 2013).

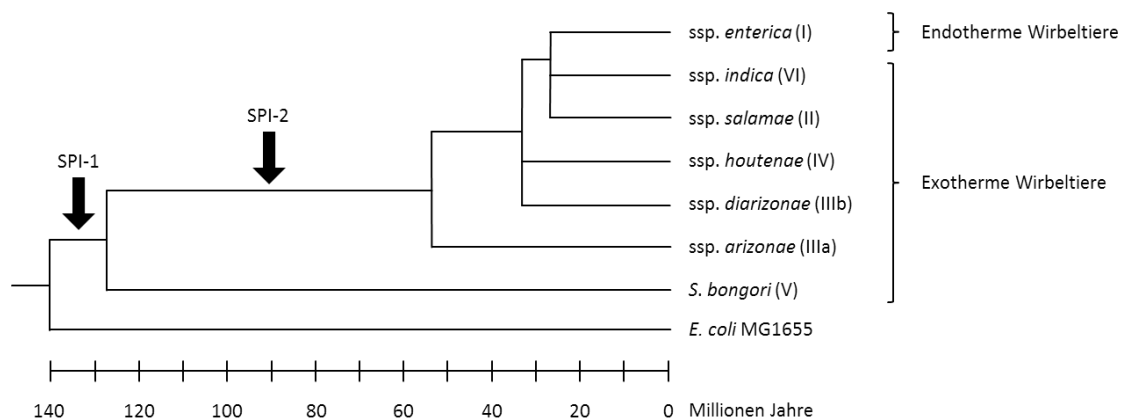


Abb. 1: Phylogenie der Salmonellen. Das Phylogramm zeigt die phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb der Gattung *Salmonella*. Das Auftreten der beiden *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI) 1 und 2 ist markiert. Das Vorkommen der SPI-2 trennt die Art *S. enterica* von *S. bongori* ab. Abbildung modifiziert nach Cotter and DiRita (2000) und Desai *et al.* (2013).

Das erste Genom von einem *Salmonella*-Stamm wurde 2001 sequenziert (McClelland *et al.*, 2001). Dabei handelte es sich um den Stamm *S. Typhimurium* LT-2, der neben einem 4,8 Megabasen Chromosom das 93 Kilobasen große Plasmid pSLT trägt. Dieses Plasmid enthält Virulenzgene und liegt in 1-3 Kopien vor (Gulig *et al.*, 1993, Gulig & Doyle, 1993, Matsui *et al.*, 2001). Ein vergleichbares Plasmid ist in den typhösen Stämmen *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A oder *S. Paratyphi* B nicht vorhanden (s. u.) (Popoff *et al.*, 1984). Sowohl das Chromosom als auch das Plasmid von LT-2 haben einen GC-Gehalt von 53 % und tragen 4489 bzw. 108 Gene.

Salmonella enterica-Stämme weisen ein sehr breites Wirtsspektrum mit unterschiedlichen Infektionsverläufen auf. Die Verbreitung der Bakterien erfolgt dabei fäkal-oral. Die Mehrheit der *Salmonella*-Stämme, die von endothermen Wirbeltieren isoliert wurden, gehört zu *S. enterica* Subspezies I. Die übrigen Subspezies einschließlich *S. bongori* besiedeln hauptsächlich exotherme Wirbeltiere und lösen nur in Ausnahmefällen Infektionen beim Menschen aus (Giammanco *et al.*, 2002). Salmonellen gelangen durch die Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln, insbesondere durch Eier, Geflügelfleisch, Milch und Rindfleisch, seltener auch Trinkwasser, in den Wirt (Hof & Dörries, 2005). Durch die Magensäure, die die Bakterien als erste Barriere passieren müssen, wird ein Teil der Salmonellen abgetötet. Die Infektionsdosis ist mit ca. 10^6 Zellen vergleichsweise hoch (Blaser & Newman, 1982, Kothary & Babu, 2001). So weisen die Erreger der *Campylobacter*-Enteritis eine minimale Infektionsdosis von 8×10^2 (Black *et al.*, 1988), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) eine minimale Infektionsdosis von unter 10^2 auf (Tilden *et al.*, 1996). Die *Salmonella*-Zellen, die den niedrigen pH-Wert des Magens überlebt haben, besiedeln den Dünndarm und konkurrieren mit der bestehenden Darmflora um Nährstoffe und um Platz zur Adhäsion an die Zellen der Darmschleimhaut. Hierfür und für die folgende

Invasion und Persistenz in den Darmepithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen benötigt *S. enterica* verschiedene Virulenzfaktoren. Diese sind auf mehreren *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI), insbesondere der SPI-1, SPI-2 und SPI-4, kodiert. Im Darmepithel löst *Salmonella* eine starke Entzündungsreaktion aus, die mit Ödemen der Mucosa und der Nekrose des Gewebes einhergeht. Dies führt zur starken Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen sowie zur Freisetzung von antimikrobiellen Molekülen (Zhang *et al.*, 2003).

Neben der beschriebenen Systematisierung von *Salmonella*-Stämmen in die beiden Arten und insgesamt sieben Subspezies findet auch die Untergliederung der Subspezies *enterica* (I) in typhöse und enterische (nicht-typhöse) Serotypen Verwendung. Dabei dienen die Krankheitsverläufe, die der jeweilige Serotyp bei Infektionen beim Menschen auslöst, als systematisierende Parameter. Die typhösen Serotypen, zu denen *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B und C zählen, verursachen systemische Infektionen, die mit Kopf-, Glieder- und Abdominalschmerzen, Fieber, Abgeschlagenheit, Diarrhoe, Obstipation, Somnolenz, Bradykardie, Bronchitis und Roseolen einhergehen können. In schweren Fällen kann es zu Darmblutungen und -perforationen mit Peritonitis und Cholezystitis sowie zu Osteomyelitis, Endokarditis, Meningitis, Pneumonie oder Thrombosen kommen. Unbehandelt liegt die Letalität bei typhösen Infektionen bei 15 %. Erfolgt eine adäquate Therapie, kann die Letalitätsrate auf 1-2 % gesenkt werden (Hof & Dörries, 2005). Im Jahr 2015 wurden in Deutschland insgesamt 104 Fälle registriert: 68 Fälle von Typhus und 36 Fälle von Paratyphus (Robert-Koch-Institut, 2016). Die enterischen *S. enterica* subsp. *enterica*-Serotypen, zu denen beispielsweise *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* zählen, verursachen bei immunokompetenten Patienten hingegen meist eine unkomplizierte und selbstlimitierende Gastroenteritis (Rabsch *et al.*, 2001). Bei jungen, alten und immunsupprimierten Menschen kann die enterische Salmonellose jedoch auch schwere Verlaufsformen annehmen. Kinder und alte Menschen leiden bedingt durch Diarrhoe unter starker Dehydrierung. Immunsupprimierte Patienten können eine letale Bakteriämie und Sepsis erleiden, da die Salmonellen aus dem Darm in die Blutbahn übertreten können (Santos *et al.*, 2009). Im Jahr 2015 wurden insgesamt 13.823 Fälle, darunter 16 Todesfälle, der enterischen Salmonellose in Deutschland registriert. Die verstorbenen Personen waren im Alter zwischen 43 und 90 Jahren, der Median betrug 72,5 Jahre. Bei 62 % dieser Todesfälle konnte *S. Typhimurium* und bei 31 % *S. Enteritidis* identifiziert werden. Ein Fall (= 8 %) wurde von *S. Infantis* hervorgerufen (Robert-Koch-Institut, 2016). Bei den nicht-letalen Erkrankungen wurde mit 42 % die größte Anzahl ebenfalls von *S. Typhimurium* verursacht. Als zweithäufigstes wurde *S. Enteritidis* mit 38 % identifiziert. Als dritthäufigstes mit 2,5 %

konnte *S. Infantis* bestimmt werden. Somit rufen *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* mit Abstand die häufigsten enterischen Salmonellosen hervor. Bemerkenswert ist, dass 50 der ca. 2.600 bekannten *Salmonella*-Serovare ca. 99 % aller klinischen Isolate von Menschen und domestizierten Tieren in den USA ausmachen. Zudem gehören diese 50 Serovare ausschließlich zur Subspezies *enterica* (I) (CDC, 2011). In Deutschland ist eine vergleichbare Situation zu beobachten. Auch hier gehen nur 0,1 % der *Salmonella*-Infektionen nicht auf die Subspezies *enterica* (I) zurück (Frank, 2016). Zudem ist ein deutlicher Rückgang der gemeldeten Salmonellosen in Deutschland zu beobachten. 2011 wurden bundesweit noch über 24.000 Infektionen gemeldet, wohingegen es 2015 nur ca. 14.000 Fälle waren. Die genauen Gründe bleiben unklar. Wahrscheinliche Ursachen sind jedoch, dass zum einen die erregerspezifische Diagnostik budgetbedingt reduziert wurde und zum anderen die Bekämpfungsmaßnahmen in den Geflügelbeständen erfolgreicher werden (Frank, 2016).

Führte bei den letalen Fällen die mit Diarrhoe einhergehende Dehydrierung der Patienten zum Tode, löst bei Mäusen die Subspezies *S. Typhimurium* jedoch Symptome aus, die mit dem o. g. Verlauf des Typhus beim Menschen vergleichbar sind (Bäumler *et al.*, 1998b, Stecher *et al.*, 2005). Dies zeigt deutlich, dass *S. enterica*-Stämme ein breites Wirtsspektrum und je nach Wirt sehr differenzierte Infektionsverläufe aufweisen können. Ein Grund hierfür liegt möglicherweise in der Fähigkeit von *Enterobacteriaceae*, verschiedene metabolische Nischen im Darm des Wirtes besetzen zu können (Staub & Fuchs, 2014).

1.1.2 Die Rolle der *Salmonella*-Pathogenitätsinseln für die Pathogenese

Der Begriff Pathogenität beschreibt die Eigenschaft einer Spezies, krankheitsauslösend zu sein. Virulenz ist wiederum eine stammspezifische Eigenschaft, die den Schweregrad dieser krankheitsauslösenden Eigenschaft beschreibt (Bhakdi *et al.*, 2009). Virulenzfaktoren können einzelne Moleküle, Proteine oder auch der gesamte Effekt des Zusammenspiels mehrerer Proteine und Moleküle sein. Ein Beispiel ist das Protein PliC von *S. Enteritidis*, welches als periplasmatischer Lysozym-Inhibitor diesem Stamm ermöglicht, der antimikrobiellen Wirkung des wirtseigenen Lysozyms und somit einer Schädigung der Zellwand zu entgehen (Callewaert *et al.*, 2008). Befinden sich mehrere Gene, deren Genprodukte der Regulation, Synthese oder dem Transport von Molekülen zum Zweck einer gemeinsamen Funktion dienen, konserviert in benachbarter Region im Genom, so kann dieser Genomabschnitt als genomische Insel bezeichnet werden. Kommen genomische Inseln in pathogenen und nicht in apathogenen Stämmen einer Bakterienart vor, so werden diese als Pathogenitätsinseln

(PAI) bezeichnet. Diese sind häufig vergleichsweise große DNA-Abschnitte (*deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) mit über 20 kb, die einen GC-Gehalt aufweisen, der sich von dem des restlichen Genoms unterscheidet, und mindestens ein Virulenzgen tragen (Hacker *et al.*, 1990, Knapp *et al.*, 1986, Hacker *et al.*, 1997). Zudem werden diese PAIs häufig von Insertionssequenzen flankiert. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei ihnen um mobile Elemente handelt oder sie sich aus diesen entwickelt haben, die mittels horizontalem Gentransfer (HGT) in das Genom gelangt sind (Hacker *et al.*, 1997, Hacker & Kaper, 2000). Bei Salmonellen sind mehrere dieser SPIs bekannt. Zu den am besten untersuchten zählen die SPI-1 und SPI-2 (Groisman & Ochman, 1997). Die Funktion der SPI-1 stellt einen der wichtigsten Virulenzfaktoren von Salmonellen im frühen Infektionsgeschehen dar. Diese PAI umspannt eine ca. 40 kb große Region im Genom von *S. enterica* und *S. bongori* und ist insbesondere für die Invasion der Wirtszellen essentiell.

Zu Beginn der Invasion adhären die Salmonellen mittels des SPI-4-kodierten Adhäsins SiiE an die Darmepithelzellen (Gerlach *et al.*, 2008, Barlag & Hensel, 2015). Auch wenn Salmonellen unterschiedliche Darmepithelzellen invadieren können, liegt ein Tropismus für die M-Zellen in dem Follikel-assoziierten Epithel der Peyerschen Plaques vor (Clark *et al.*, 1994, Jones *et al.*, 1994, Galan, 1996, Santos & Bäumlner, 2004). Nach der Adhäsion invadieren die Salmonella-Zellen die Wirtszellen. Dazu translozieren sie durch das Typ 3 Sekretionssystem der SPI-1 (T3SS-1), welches aus SipB, SipC und SipD besteht, verschiedene Effektorproteine in die Wirtszellen (Lara-Tejero & Galan, 2009). Dazu zählen SopE, SopE2 und SopB, dessen entsprechendes Gen *sopB* auf der SPI-5 kodiert ist. SopE und SopE2 stellen zwei homologe Proteine dar, die als GEF (*guanidine exchange factor*, Guanidin-Austauschfaktor) fungieren. Dadurch werden die wirtseigenen Rho GTPasen Cdc42 und Rac-1 aktiviert, die Teil der Signalwege des Wirts sind (Hardt *et al.*, 1998). Dies führt einerseits zur Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und somit zur induzierten Endozytose der *Salmonella*-Zellen. Andererseits wird der NF- κ B-Signalweg des Wirts manipuliert, sodass die proinflammatorischen Zytokine Il-8 und TNF- α induziert werden. Dies bewirkt die Entzündungsreaktion der Mucosa, die zur Beschädigung der Epithels führt, wodurch Nährstoffe für *Salmonella* verfügbar gemacht werden (Hobbie *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 2002, Patel & Galan, 2006). Das Symptom der Diarrhoe wird durch den Effektor SopB verstärkt, der zudem auch an der Induktion der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Dabei handelt es sich um eine Inositol-Phosphat-Phosphatase, die den Phosphatidylinositol-Signalweg manipuliert und so die Wirtszelle zur Sekretion von Chlorid und somit zur Abgabe von Flüssigkeit an das Darmlumen veranlasst (Norris *et al.*, 1998).

Die acht Gene bzw. Operons der SPI-1 werden von dem Transkriptionsfaktor HilA induziert, dessen entsprechendes Gen *hilA* selbst auch auf der SPI-1 kodiert ist. Zudem aktiviert HilA die Genexpression weiterer Effektoren, die nicht auf der SPI-1 kodiert sind, wie z. B. die Gene der SPI-4 *siiABCDEF* (Thijs *et al.*, 2007). Die Transkription von *hilA* wird von dem Hauptregulator HilD induziert. Dieser AraC-ähnliche Autoregulator wird von einer Vielzahl an weiteren Regulationswegen beeinflusst, die an der Wahrnehmung von Umweltsignalen beteiligt sind. Dies sind insbesondere solche Signale, die vor und während der Invasion der Wirtszellen eine Rolle spielen (Altier, 2005, Ellermeier & Slauch, 2007, Golubeva *et al.*, 2012): beispielsweise eine hohe Osmolarität oder anaerobe Bedingungen (Lee *et al.*, 1992, Bajaj *et al.*, 1996).

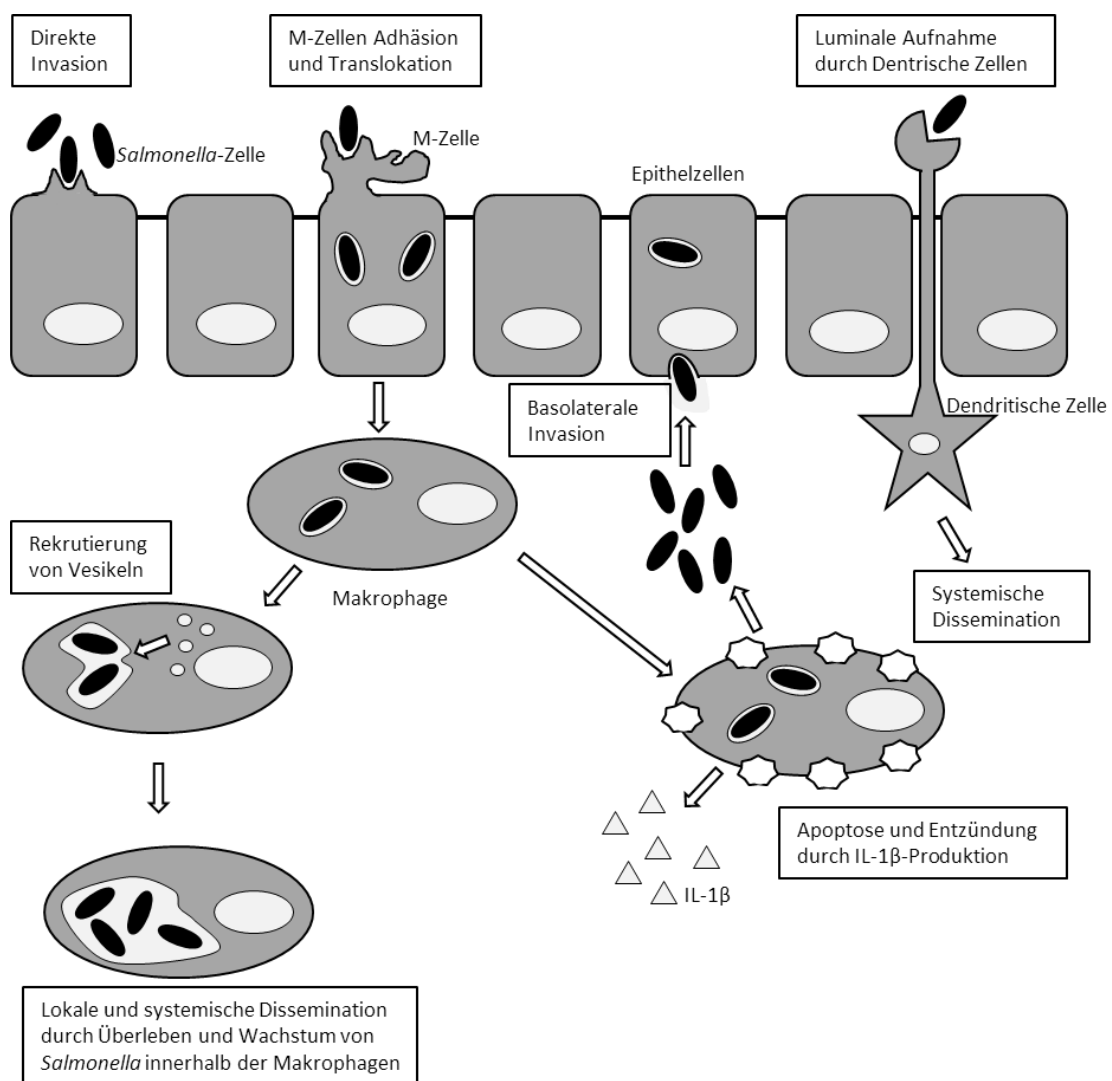


Abb. 2: Strategien von Salmonellen zur Durchdringung der Darmbarriere. Abbildung modifiziert nach Sansonetti (2004).

Für das weitere Infektionsgeschehen ist die SPI-2, die phylogenetisch nur in *S. enterica* und nicht in *S. bongori* vorkommt, essentiell für Salmonellen (Abb. 1) (Ochman *et al.*,

1996, Hensel *et al.*, 1997). Ihre Sequenz ist ebenfalls ca. 40 kb groß und besteht aus 42 offenen Leserahmen (Shea *et al.*, 1996). Nach der induzierten Endozytose befinden sich die *Salmonella*-Zellen in einer Vakuole innerhalb der Epithelzellen (Abb. 2). Die Induktion der Genexpression der SPI-2 führt zur Bildung eines weiteren T3SS, dem T3SS-2. Dieses transloziert über 30 verschiedene Effektorproteine, deren jeweilige Funktion sich je nach Infektionsmodell auch unterscheiden kann (McQuate *et al.*, 2017). Die Effektoren sorgen in der Membran der Vakuole sowie im Zytosol der Wirtszelle dafür, dass die Bakterien intrazellulär überleben und in dem geschaffenen Mikrohabitat SCV (*Salmonella containing vacuole*, *Salmonella* enthaltende Vakuole) proliferieren können (Figueira & Holden, 2012). Dabei spielt u. a. SsaB eine entscheidende Rolle. Dieses ist Teil des T3SS-2 und kann als Effektorprotein, nachdem es in das Zytosol der Wirtszelle transloziert wurde, das Protein Hook3 inaktivieren. Dieses Wirtsprotein ist Teil des Zellapparates, der die Mikrotubuli mit Organellen verbindet, sodass durch dessen Inaktivierung die Fusion von SCV und den Lysosomen verhindert wird. Zu den Effektoren, die die Membran der Vakuole beeinflussen, zählt u. a. SifA. Dieses Protein ist essentiell für die Reifung der SCV zum SIF (*Salmonella* induziertes Filament), das Bestandteil des tubulären Membransystems SIT (*Salmonella* induzierte Tubuli) ist (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993). Dieses System manipuliert den Vesikeltransport innerhalb der Wirtszelle und ist möglicherweise von großer Bedeutung für die Versorgung der intrazellulären *Salmonella*-Zellen mit Nährstoffen (Liss & Hensel, 2015, Popp *et al.*, 2015). Die Deletion von *sifA* führt dazu, dass die Membran der Vakuole einige Stunden nach der Invasion verloren geht und sich die Bakterien im Zytosol befinden. Da im Zytosol lokalisierte Bakterien in Makrophagen schnell abgetötet werden, ist dies eine Erklärung für die starke Attenuation der *sifA*-Mutante in der systemischen Infektion im Mausmodell (Beuzon *et al.*, 2000, Beuzon *et al.*, 2002). In Epithelzellen besteht dagegen unter nativen Bedingungen die Möglichkeit, dass einige der Bakterien in das Zytosol gelangen und dort als hyperreplizierende Subpopulation ein Reservoir für die Dissemination in das Gewebe bilden (Knodler *et al.*, 2010, Malik-Kale *et al.*, 2012, Avraham *et al.*, 2015, Knodler, 2015).

Während der intrazellulären Lebensphase sind die *Salmonella*-Zellen vor antimikrobiellen Molekülen geschützt und mit Nährstoffen versorgt, sodass sie sich vermehren und die Darmbarriere überwinden können. Dort werden sie von Makrophagen oder dendritischen Zellen phagozytiert. Auch hier verhindert *Salmonella* erneut mittels der T3SS-2-translozierten Effektorproteine seine Lyse. Innerhalb von dendritischen Zellen persistieren die Bakterien, wohingegen sie in Makrophagen sowohl replizieren als auch persistieren können (Buchmeier & Heffron, 1989, Schwan

et al., 2000, Jantsch *et al.*, 2003, Helaine *et al.*, 2014). Intrazellulär vor dem Immunsystem verborgen gelangen die Salmonellen so zu den bevorzugten Replikationsorten Leber und Milz (Worley *et al.*, 2006). Neben diesem klassischen Infektionsweg konnte eine weitere Möglichkeit der Invasion durch Salmonellen identifiziert werden. Dabei nehmen CD18⁺-Phagozyten die Salmonellen direkt aus dem Darmlumen auf und migrieren mit diesen in die Blutbahn, wodurch die Pathogene innerhalb weniger Minuten zu Leber und Milz gelangen können (Vazquez-Torres *et al.*, 1999, Rescigno *et al.*, 2001, Worley *et al.*, 2006, Thornbrough & Worley, 2012).

Die Makrophagen reagieren auf die T3SS-2-vermittelte Manipulation mit Pyroptose. Dies ist eine Variante des programmierten Zelltods, die durch die Aktivierung der Caspase-1 ausgelöst wird. Dadurch kommt es zur Ausschüttung der Zytokine Il-1 β und Il-18, die eine zentrale Rolle sowohl für die akute als auch für die chronische Entzündung haben (Monack *et al.*, 2001). Sie führen zur Rekrutierung von Immunzellen und lösen sowohl Fieber als auch die Produktion verschiedener sekundärer Zytokine aus (Braddock *et al.*, 2004). Durch das Effektorprotein AvrA ist es Salmonellen möglich, diesen Prozess zu verlangsamen und so ein größeres Zeitfenster für die Replikation und Migration innerhalb der Makrophagen zu schaffen. Bei AvrA handelt es sich um eine Acetyltransferase, die JNK (Jun N-terminale Proteinkinase), einen Hauptregulator der Wirtszelle, inhibiert (Wu *et al.*, 2012).

Die Gene der SPI-2 werden durch das Zweikomponentensystem SsrA/SsrB reguliert, das selbst auch auf der SPI-2 kodiert ist (Cirillo *et al.*, 1998, Xu & Hensel, 2010). Der Transkriptionsfaktor SsrB bindet und reguliert dabei alle funktionalen Gene bzw. Operons der SPI-2, also die Gene des T3SS, der Effektoren sowie von P_{SsrA} und P_{SsrB} (Feng *et al.*, 2003, Walthers *et al.*, 2007). Zudem induziert SsrB die Transkription weiterer Gene, die nicht Teil der SPI-2 sind, wie beispielsweise *srfJ* innerhalb der GEI4417/4436 (Worley *et al.*, 2000) oder *sifA* (Garmendia *et al.*, 2003). Dabei wird die C-terminale Effektor-domäne von SsrB im inaktiven Status von dessen N-terminaler Empfängerdomäne blockiert. Wird diese durch die Sensor kinase SsrA phosphoryliert, kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass SsrB an die DNA binden und die Transkription aktivieren kann. Wie FENG zeigen konnte, ist die C-terminale Effektor-domäne (SsrB_c) für sich alleine auch ohne Phosphorylierung aktiv (Feng *et al.*, 2004). Erwartungsgemäß wird SsrB während der Infektion von Makrophagen aktiviert (Walthers *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die SPI-2 auch schon im Darmlumen induziert werden kann (Brown *et al.*, 2005). Eine Induktion des SPI-2-Regulators kann zudem auch *in vitro* durch spezielle Kulturbedingungen erreicht werden. Dazu zählen ein niedriger pH-Wert sowie geringe Konzentrationen von

Magnesium-Ionen, wodurch ein Medium zur Induktion von SsrB entwickelt werden konnte (Coombes *et al.*, 2004).

1.2 Metabolismus als Virulenzfaktor

In den vergangenen Jahren stellte sich immer deutlicher heraus, dass neben den klassischen Virulenzfaktoren, wie einzelnen Toxinen, der Metabolismus von Pathogenen eine enorme Rolle für das Infektionsgeschehen spielt. So konnte in Infektionsstudien mit *S. Typhimurium* im Mausmodell gezeigt werden, dass der Metabolismus eine der Hauptaktivitäten während der Infektion darstellt (Becker *et al.*, 2006). Unter dem neu geprägten Begriff *nutritional virulence* (engl. für Ernährungsvirulenz) werden die speziellen Virulenzmechanismen bzw. Strategien subsummiert, die für die Versorgung des Pathogens mit Nährstoffen während des Infektionsgeschehens in den verschiedenen Mikrohabitaten notwendig sind (Abu Kwaik & Bumann, 2013). Diesem Begriff übergeordnet steht der „Pathometabolismus“, der die gesamten metabolischen Interaktionen bezeichnet, die zwischen Pathogen und dem Wirt während der Infektion stattfinden (Eisenreich *et al.*, 2015). Dem wachsenden Bewusstsein um die Bedeutung dieses Forschungsbereichs wurde auch mit dem Schwerpunktprogramm SPP1316 „Wirtsadaptierter Metabolismus von bakteriellen Infektionserregern“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft begegnet. Durch dieses Programm, in dessen Rahmen u. a. auch die vorliegende Arbeit entstand, konnte das Verständnis für die Rolle des Metabolismus im Infektionsgeschehen grundlegend verbessert werden. Dazu gehören sowohl die wechselseitigen Stoffflüsse zwischen Wirt und Pathogen als auch die Regulation und Funktion bakterieller Stoffwechselwege während der Infektion der verschiedenen Mikrohabitats des Wirts. Dabei zeigte sich u.a. auch, dass Regulatoren, die bis dahin als Steuerungselemente klassischer Virulenzfaktoren galten, auch an der Regulation von Stoffwechselwegen beteiligt sind (Lawhon *et al.*, 2003, Eisenreich *et al.*, 2010, Fuchs *et al.*, 2012, Rothhardt *et al.*, 2014, Abu Kwaik & Bumann, 2015, Häuslein *et al.*, 2016, Kern *et al.*, 2016, Kutzner *et al.*, 2016, Manske *et al.*, 2016).

Während der Infektion durchlaufen Pathogene eine Vielzahl verschiedener Mikrohabitats, in denen sie Nährstoffe aufnehmen müssen, um sowohl proliferieren und gegen die bestehende Mikrobiota konkurrieren als auch Virulenzfaktoren exprimieren zu können. Dies beginnt bereits in den Nahrungsmitteln, in denen die Zellen proliferieren müssen, um zu einem späteren Zeitpunkt mit einer entsprechenden Infektionsdosis den Wirt erfolgreich kolonisieren zu können (Staib & Fuchs, 2014). Nachdem die kontaminierte Nahrung aufgenommen wurde, durchlaufen

beispielsweise Salmonellen erst den Magen und die verschiedenen Milieus der Darmabschnitte, bevor sie intrazellulär in das Gewebe eindringen und disseminieren (siehe 1.1.2). Um unter diesen wechselnden Umweltbedingungen ausreichend mit Nährstoffen versorgt sein zu können, verfügen Salmonellen über ein breites Spektrum an Stoffwechselwegen. So ist *S. Typhimurium* beispielsweise in der Lage, mindestens 82 verschiedene Kohlenstoffquellen sowie verschiedene Elektronenakzeptoren zur aeroben bzw. anaeroben Atmung zu nutzen (Gutnick *et al.*, 1969), von denen vermutlich bis zu 69 im Gewebe der Maus verfügbar sind. Wie gezeigt werden konnte, produziert *Salmonella* während der Infektion viele der Enzyme, die den Abbau dieser Kohlenstoffquellen katalysieren (Becker *et al.*, 2006).

Zu den am häufigsten genutzten Ressourcen zählen Glycerol, Lactat, Gluconat, Glucose, C₁₆-Fettsäuren sowie Aminosäure und Nukleoside (Steeb *et al.*, 2013). Allerdings spielen die im geringeren Maße nutzbaren Nährstoffe dennoch eine entscheidende Rolle: Es scheint essentiell zu sein, dass mehrere Stoffwechselwege gleichzeitig aktiv sind, da die Mengen der einzelnen Moleküle, die als Kohlenstoff- und Energiequellen verfügbar sind, für sich alleine zu gering für eine erfolgreiche Proliferation wären. So konnten Steeb *et al.* (2013) zeigen, dass *S. Typhimurium* während der systemischen Infektion in der Maus mindestens 31 verschiedene organische und 13 anorganische Nährstoffquellen gleichzeitig metabolisiert. Zu den im geringeren Maße genutzten Metaboliten zählen beispielsweise Fucose und Ethanolamin (Staub & Fuchs, 2014). Fucose ist ein häufig vorkommendes Molekül im Darminhalt. Einerseits kommt es in der Zellwand von Pflanzen vor und kann so als Bestandteil der Nahrung in den Darm gelangen (Sampson & Bobik, 2008). Andererseits macht es 4-14 % der Oligosaccharide der Mucusschicht im Darm aus (Hugdahl *et al.*, 1988). Die Mucusschicht liegt über dem Darmlumen und schützt als Barriere die darunter liegenden Epithelzellen vor mechanischer Belastung und pathogenen Bakterien. Zudem hilft sie bei der Aufnahme von Nahrungspartikeln (Corazziari, 2009). Fucose kann von *S. Typhimurium* zu 1,2-Propandiol abgebaut werden, welches durch die Genprodukte des *pdu*-Operons weiter zu Propanol und Propionat degradiert wird (Staub & Fuchs, 2015). Für diese Reaktionsschritte benötigt die Zelle den Kofaktor Cobalamin sowie Tetrathionat, das der anaeroben Atmung dient (s. u.). Die Fähigkeit zur Nutzung von Fucose ist relevant für das enterische Infektionsgeschehen, sodass die Deletion der für diese Stoffwechselleistung notwendigen *fuc*-Gene zu einer Reduktion der Proliferation im Mausmodell führt (Ng *et al.*, 2013). Ebenso sind die *pdu*-Gene, die für den Abbau von 1,2-Propandiol essentiell sind, wichtig für die erfolgreiche Infektion des Wirts. Auch hier führt die Deletion des Operons zur Attenuation sowohl im

Mausmodell als auch in Maus-Makrophagen (Conner *et al.*, 1998, Klumpp & Fuchs, 2007).

Für den im Darminhalt häufig vorkommenden Metaboliten Ethanolamin konnte ebenfalls gezeigt werden, dass dessen Nutzung für das Infektionsgeschehen von Bedeutung ist. Ethanolamin kommt als Phosphatidylethanolamin in der Zellmembran von Prokaryoten und Eukaryoten vor. Das im Darminhalt vorliegende Ethanolamin stammt daher sowohl aus der Nahrung als auch aus der Zellmembran des Wirts oder der Mikrobiota (Staib & Fuchs, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Nutzung von Ethanolamin einen Wachstumsvorteil während der Infektion im Mausmodell verschafft. Es trifft allerdings nur auf die intestinale und nicht auf die systemische Infektion zu (Thiennimitr *et al.*, 2011). Dies geht mit der Entdeckung einher, dass Salmonellen im entzündeten Darm anaerob Tetrathionat atmen können. Dadurch können sie Metabolite wesentlich effizienter als die bestehende Darmflora degradieren, was es ihnen erlaubt, erfolgreich gegen diese zu konkurrieren und den Wirt zu infizieren (Winter *et al.*, 2010). Zu Beginn dieser anaeroben Atmung steht das toxische Dihydrogensulfid, welches von der Darmflora produziert wird. Die Darmepithelzellen detoxifizieren dieses, indem sie es zu Thiosulfat oxidieren. Das angeborene Immunsystem reagiert auf die Anwesenheit von Salmonellen im Darmepithel mit einer Entzündungsreaktion, zu der die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen sowie die Freisetzung von antimikrobiellen Molekülen gehört (Schurmann *et al.*, 2017). Dabei werden von den Immunzellen reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies produziert, die das Thiosulfat zu Tetrathionat oxidieren. Dieses wird von Salmonellen mittels der Genprodukte des *ttrSR ttrBCA* Genclusters als terminaler Elektronenakzeptor zur Respiration genutzt. Im Zusammenspiel mit dieser Fähigkeit führen die Induktion sowohl der transepithelialen Migration von Neutrophilen als auch der Sekretion von antimikrobiellen Stoffen zu einem enormen Selektionsvorteil. Dadurch sind Salmonellen in der Lage, sich gegen die bestehende Mikrobiota durchzusetzen und eine Infektion des Intestinaltrakts zu etablieren (Winter *et al.*, 2010, Thiennimitr *et al.*, 2012).

Ein weiteres Beispiel für die Interaktion zwischen Pathogen, Mikrobiota und Wirtszellen stellt die Aufnahme von Glucarat in *S. Typhimurium* dar. Die Expression des Gens *gudT*, welches für die Permease kodiert, die Glucarat in die Zelle transportiert, wird durch molekularen Wasserstoff induziert. Dieser wird wiederum von der Darmflora produziert. Die Nutzung von Glucarat stellt einen Vorteil für Salmonellen während der Infektion dar, sodass die Deletion von *gudT* zu einer Attenuation im Mausmodell führt (Lamichhane-Khadka *et al.*, 2013, Faber *et al.*, 2016).

Bakterielle Pathogene erreichen metabolische Flexibilität entweder durch eine veränderte Regulation der bestehenden Gene oder durch die Aufnahme von Genen anderer Bakterien durch den horizontalen Transfer von mobilen genetischen Elementen bzw. Pathogenitätsinseln (Le Bouguenec & Schouler, 2011). Im Gegensatz zu generalistischen Pathogenen tendieren hoch spezialisierte Pathogene zu einer eingeschränkteren metabolischen Kapazität (Thomson *et al.*, 2008, Holt *et al.*, 2009). So haben die *Salmonella*-Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi*, die nicht-enterische, systemische Infektionen auslösen, die Gene zur Tetrathionat-Atmung verloren (Winter *et al.*, 2010). Das ist dahingehend plausibel, da Tetrathionat bei der systemischen Infektion des Gewebes nicht verfügbar ist und somit dieser Stoffwechselweg dem Pathogen keinen Vorteil für die extra-intestinale Proliferation verschafft (Rohmer *et al.*, 2011, de Jong *et al.*, 2012).

Neben der Nutzung von Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequellen stellen auch die Mechanismen zur Aufnahme essentieller Spurenelemente wichtige Faktoren des Pathometabolismus dar. Ein Beispiel hierfür ist die Verfügbarkeit von Eisen, das eine wichtige Rolle in der Pathogen-Wirt-Interaktion spielt (Nairz *et al.*, 2014). Der Wirt limitiert die verfügbare Menge an Eisen im Körper durch die Eisen bindenden Proteine Lactoferrin und Transferrin, was das Wachstum von Pathogenen limitiert (Hentze *et al.*, 2004). Um dieser Limitierung zu entgehen, sezernieren Pathogene Siderophore, die Eisen mit sehr hoher Affinität chelatieren und die danach wieder von ihnen aufgenommen werden (Schaible & Kaufmann, 2004). Alle pathogenen *Salmonella*-Serovare sezernieren unter Eisen-limitierenden Bedingungen das Siderophor Enterobactin. Zudem wird von allen Serovaren, mit Ausnahme der *S. bongori*-Stämme, das C-glykosylierte Enterobactin-Derivat Salmochelin zur Eisenchelatierung in das umgebende Medium abgegeben (Bäumler *et al.*, 1998a, Hantke *et al.*, 2003, Crouch *et al.*, 2008). Während der Entzündungsreaktion im Darm inaktiviert das wirtseigene Lipocalin-2 bakterielle Siderophore. In diesem Zusammenhang ist Salmochelin, dessen Synthese- und Transportproteine von dem Gencluster *iroBCDEN* kodiert werden, von besonderem Vorteil für Salmonellen: Es ist resistent gegenüber der Degradation durch Lipocalin-2 und stellt somit einen Virulenzfaktor und Selektionsvorteil gegenüber der Mikrobiota dar (Raffatelli *et al.*, 2009).

Neben den klassischen Transkriptionsregulatorproteinen bilden sRNAs (*small regulatory RNA*, kleine regulatorische RNA) eine wichtige Gruppe an Regulatoren, deren enorme Bedeutung erst in den letzten 10-15 Jahren deutlich geworden ist (RNA, *ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure). sRNAs können mit mRNA (*messenger RNA*, Boten-RNA), Proteinen und DNA interagieren und modulieren so die Transkription,

Translation, mRNA Stabilität und Proteinaktivität. Dadurch spielen sie eine entscheidende Rolle für die schnelle Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen, so z. B. bei der Stressadaptation, Virulenz oder Metabolismus (Shimoni *et al.*, 2007, Waters & Storz, 2009, Gottesman & Storz, 2011, Papenfort *et al.*, 2013). Durch die Entwicklungen im Bereich der RNA-Sequenzierung wurden in der Vergangenheit viele sRNAs bioinformatisch identifiziert. Deren Funktion ist jedoch nur von einem Bruchteil bekannt (Sorek & Cossart, 2010).

sRNAs sind normalerweise zwischen 50 und 500 Nukleotide lang und werden nicht translatiert. Bei der Interaktion von sRNA mit mRNA kann zwischen der *cis*- und *trans*-Funktionsweise unterschieden werden: *cis*-kodierte sRNA ist in der kodierenden Region oder der 5'-UTR auf dem entgegengesetzten DNA-Strang zur regulierten RNA kodiert, sodass die sRNA-Sequenz komplementär zur mRNA ist (Vogel, 2009, Thomason & Storz, 2010, Georg & Hess, 2011). Die Interaktion zwischen sRNA und mRNA kann die Termination der Transkription, die Bindung zwischen mRNA und Ribosom oder auch die Stabilität der mRNA beeinflussen (Caldelari *et al.*, 2013). *trans*-kodierte sRNAs sind nicht in unmittelbarer Nähe zum Gen ihrer Ziel-mRNA kodiert, wodurch diese häufig nicht vollständig komplementär zu ihrer Zielsequenz sind (Vogel & Luisi, 2011). Diese *trans*-agierenden sRNAs binden normalerweise im Bereich der Shine-Dalgarno-Sequenz oder des Start-Codons (Storz *et al.*, 2011). Zudem basiert ihre Funktion in vielen Fällen auf dem Zusammenspiel mit RNasen, die doppelsträngige RNA degradieren (Viegas *et al.*, 2007, Viegas *et al.*, 2011, Saramago *et al.*, 2014). Auch das RNA Chaperon Hfq spielt insbesondere bei *trans*-agierenden sRNAs eine entscheidende Rolle (Vogel & Luisi, 2011). Als Mediator zwischen den häufig nicht vollständig komplementären sRNAs und mRNAs kann Hfq sowohl induzierend als auch reprimierend auf die Translation wirken. Dafür konnten bereits verschiedene Funktionsweisen identifiziert werden (Abb. 3).

Neben der direkten sRNA-mRNA-Interaktion oder der sRNA-Hfq-mRNA-Interaktion kann sRNA auch mit anderen Proteinen interagieren und deren Aktivität beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion zwischen der sRNA CsrBC und dem Regulatorprotein CsrA. Dieser Virulenzregulator ist sowohl an der Regulation der SPI-1, des *pdu*-Operons, des *eut*-Operons als auch des *cob*-Operons beteiligt. Durch diese Operons ist *S. Typhimurium* in der Lage, 1,2-Propandiol bzw. Ethanolamin abzubauen und Cobalamin zu synthetisieren. Damit stellt CsrA eine direkte Verbindung zwischen den klassischen Virulenzgenen und dem Pathometabolismus dar (Lawhon *et al.*, 2003). Dieses bindet an die RBS von speziellen mRNAs und blockiert so deren Translation. Durch die Bindung von CsrBC an CsrA wird diese Repression aufgehoben und die

Translation der mRNA kann stattfinden (Babitzke & Romeo, 2007). Eine vergleichsweise erst seit kurzem bekannte sRNA-Gruppe ist Bestandteil des CRISPR/Cas-Systems. Dieses dient Bakterien als adaptives Immunsystem gegen fremde Nukleotidsequenzen und stellt mittlerweile ein sehr starkes molekularbiologisches Werkzeug im Bereich des *genome editing* (engl. für Genombearbeitung) dar (Brouns *et al.*, 2008, Jinek *et al.*, 2012).

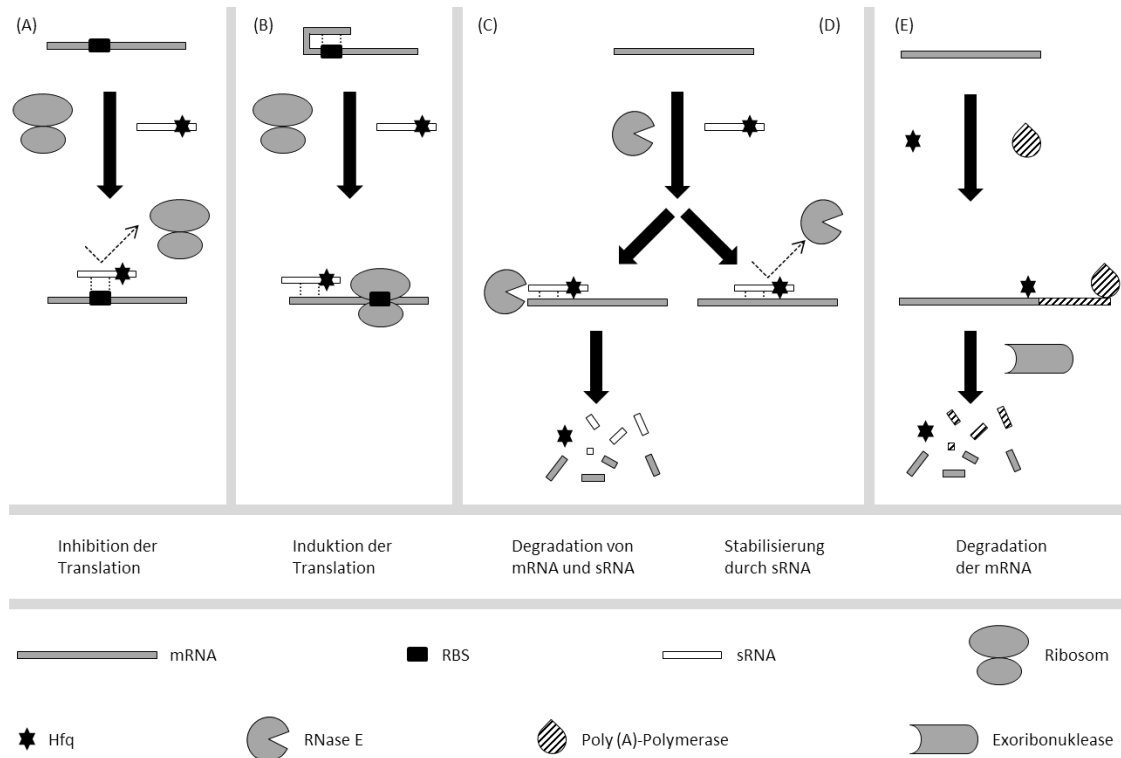


Abb. 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen, an denen das RNA Chaperon Hfq beteiligt sein kann. (A) Bei der Inhibition der Translation bindet der Komplex aus sRNA und Hfq an die Ribosomenbindestelle (RBS) der mRNA und verhindert so die Proteinbiosynthese. (B) Im Falle der Induktion der Translation kann die mRNA für sich alleine nicht translatiert werden, da sie über eine sekundäre Struktur verfügt, mit der die RBS verdeckt wird. Durch die Bindung der mRNA an den sRNA-Hfq-Komplex wird die RBS freigelegt und kann an die Ribosomen binden. (C) Eine dritte Funktion eines sRNA-Hfq-Komplexes ist es, durch die Bindung an eine mRNA die RNase E zu rekrutieren, sodass der doppelsträngige Komplex aus mRNA und sRNA abgebaut wird. (D) Im Zusammenspiel mit RNase E kann Hfq die mRNA auch vor Degradation schützen und so zur Stabilisierung der mRNA und einer vermehrten Translation beitragen. Dazu bindet der sRNA-Hfq-Komplex an die RNase E-Schnittstellen der mRNA, sodass diese verdeckt werden (Moll *et al.*, 2003, Vogel & Luisi, 2011). (E) Zur mRNA Degradation kann Hfq auch durch die Rekrutierung der Poly(A)-Polymerase beitragen. Diese polyadenyliert das 3'-Ende der mRNA, was schließlich zum Abbau durch Exoribonukleasen führt (Steege, 2000). Abbildung modifiziert nach Oliva *et al.* (2015).

sRNAs spielen ebenso eine Rolle in der Schnittmenge zwischen Metabolismus und Virulenz wie die klassischen Protein-Transkriptionsregulatoren. So konnten in den vergangenen Jahren einige bemerkenswerte Regulationsnetzwerke beschrieben werden, bei denen einzelnen sRNAs sowohl für den Metabolismus als auch für die Virulenz des Organismus eine hohe Bedeutung zukommt. Beispielsweise ist, wie bereits dargelegt, die Verfügbarkeit von Eisen für das Pathogen essentiell, um seinen Wirt erfolgreich zu besiedeln. In *E. coli* ist dabei die sRNA RyhB an der Eisen-

Homeostase beteiligt. Diese ist 90 Nukleotide lang und reguliert post-transkriptionell mRNAs, die für Proteine der Eisenaufnahme und -speicherung kodieren (Wassarman *et al.*, 2001, Masse *et al.*, 2005). Im Vergleich von *ryhB*-Mutante und Wildtyp zeigten dabei mindestens 19 Operons mit insgesamt 54 Genen eine geringere Expression und 15 Gene eine höhere Expression in der *ryhB*-Mutante. Reguliert wird RyhB von Fur, Hfq sowie von Endoribonukleasen (Geissmann & Touati, 2004, Masse *et al.*, 2005). In Salmonellen existieren die zwei *ryhB*-orthologen Gene *ryhB-1* und *ryhB-2*. Die Synthese von RyhB-1 wird durch niedrige Eisenkonzentrationen im Medium sowie durch oxidativen Stress induziert, wohingegen die Transkription von *ryhB-2* erst nach Erreichen der stationären Phase unter diesen Bedingungen aktiviert wird (Padalón-Brauch *et al.*, 2008). Wie gezeigt werden konnte, regulieren die beiden sRNAs dabei die Transkription von unterschiedlichen Genen, die an Chemotaxis und Motilität beteiligt sind (Kim & Kwon, 2013).

Neben der Eisen-Homeostase konnte die regulatorische Bedeutung von sRNAs auch für die Homeostase der Phosphatzucker in *S. Typhimurium* während des Infektionsgeschehens gezeigt werden. Während des intrazellulären Wachstums zeigt *Salmonella* eine deutliche Präferenz für die Aufnahme von Glukose, sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch hinsichtlich der tatsächlichen Stoffflüsse (Hautefort *et al.*, 2008, Götz & Goebel, 2010). Die Aufnahme von Glukose erfolgt dabei über ein Phosphotransferase-System (PTS): Ein Molekül Glukose wird durch die Zellmembran ins Zytosol transportiert und zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert (Jahreis *et al.*, 2008). Dieses kann dann direkt in die Glykolyse eingehen. Da hohe Konzentrationen an G6P die Zelle schädigen, indem sie das Wachstum hemmen und Schäden an der DNA verursachen, unterliegt dessen Konzentration in der Zelle einer strikt regulierten Homeostase (Irani & Maitra, 1977, Lee & Cerami, 1987, Kadner *et al.*, 1992). Der Hauptregulator im Umgang mit diesem Phosphatzucker-Stress ist die sRNA SgrS. Liegen hohe Konzentrationen an G6P in der Zelle vor, so induziert der Regulator SgrR die Transkription von *sgrS* (Vanderpool & Gottesman, 2007). SgrS bindet an die RBS der mRNA *ptsG* und verhindert deren Translation und somit die Neusynthese des Proteins PtsG, welches Glukose als G6P in die Zelle transportiert. Dadurch wird eine weiter steigende Konzentration an G6P in der Zelle verhindert (Vanderpool & Gottesman, 2004). Zudem kann SgrS auch an die mRNA *manXYZ* binden, die für einen Mannose-spezifischen Transporter kodiert, und deren Translation reprimieren (Rice & Vanderpool, 2011). Eine weitere Zielsequenz von SgrS ist die mRNA *yigL*. Durch die Bindung von SgrS an dieses Transkript wird deren RNase E-vermittelter Abbau verhindert, sodass vermehrt YigL synthetisiert wird. Dieses Transmembranprotein detoxifiziert 6-Phosphatzucker, indem es diese dephosphoryliert und aus der Zelle

transportiert (Papenfert *et al.*, 2013, Sun & Vanderpool, 2013). SgrS hat neben den Transkripten *yigL*, *ptsG* und *manXYZ*, die an der Regulation des Metabolismus beteiligt sind, auch direkten Einfluss auf die Regulation des Virulenzfaktors SopD. Indem SgrS die mRNA *sopD* bindet, reprimiert es deren Translation (Papenfert *et al.*, 2012). Dieses Effektorprotein wird in die Wirtszelle transloziert und ist an der Induktion der Entzündungsreaktion sowie der Bildung der SCV beteiligt (Jones *et al.*, 1998, Bakowski *et al.*, 2007). Somit stellt SgrS ein sehr gut untersuchtes Beispiel für eine sRNA dar, die sowohl den Metabolismus und die Virulenz in *S. Typhimurium* miteinander regulatorisch verbindet.

1.3 Der bakterielle MI-Metabolismus

1.3.1 *myo*-Inositol - Ökologische Bedeutung

MI ist ein ubiquitär im Boden vorkommendes zyklisches Polyol (Turner *et al.*, 2002, Gerke, 2015). Als sechsfach phosphorylierte Form von MI kommt Phytat in Pflanzen vor und dient dort als Phosphatspeicher (Raboy, 1997, Kasim & Edwards, 1998) (siehe Abb. 4). Zudem ist MI Bestandteil von Phosphatidylinositol, welches in der Membran von eukaryotischen Zellen auch der Weiterleitung von Signalen dient (Hawkins & Stephens, 2015).

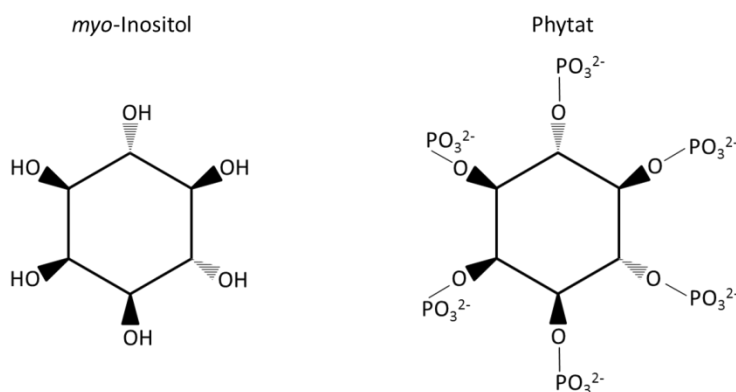


Abb. 4: Strukturformel von *myo*-Inositol und Phytat.

Phytat ist das häufigste organische Phosphat-tragende Molekül in der terrestrischen Umwelt. Es wird hauptsächlich von Pflanzen gebildet und reichert sich durch Samen, den Verfallsprozess der Pflanzen oder die Ausscheidungen von Pflanzenfressern im Boden an. In den Samen kann Phytat bis zu 80 % des absoluten Phosphatgehalts ausmachen (Loewus *et al.*, 1990, Raboy, 1990). Zudem kann Phytat als polyanionisches Molekül Kationen, insbesondere Calcium, Eisen und Zink, chelatieren. Dadurch reduziert es während der Verdauung bei Tieren die Aufnahme dieser Spurenelemente. Davon sind hauptsächlich monogastrische Tiere betroffen, wohingegen polygastrische

Tiere durch ihre diverseren Mikrobiome eher in der Lage sind Phytat mittels mikrobieller Phytasen abzubauen und so auch das Phosphat nutzbar zu machen (Humer *et al.*, 2015).

Die Synthese von Phytat kann bei Pflanzen von MI ausgehend sowohl über den Lipid-abhängigen als auch über den Lipid-unabhängigen Reaktionsweg erfolgen. Der erstgenannte Weg findet in allen Pflanzengeweben statt, wohingegen der zweitgenannte hauptsächlich in den Samen abläuft (Sparvoli & Cominelli, 2015). Das Edukt dieser beiden Reaktionswege, MI, wird in allen drei Domänen der Lebewesen über drei Reaktionsschritte aus Glukose synthetisiert. Die Hexokinase HXK phosphoryliert Glukose zu Glukose-6-Phosphat, das wiederum von der *myo*-Inositol-3-Phosphat-Synthase MIPS zu *myo*-Inositol-3-Phosphat isomerisiert wird. Die *myo*-Inositol-Phosphat-Phosphatase IMP hydrolysiert dieses in einem dritten Reaktionsschritt zu MI (Sparvoli & Cominelli, 2015). Neben seiner Rolle als Phosphatspeicher ist Phytat ein wichtiges Signalmolekül für verschiedene Regulationsprozesse in Pflanzen (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003). In allen Eukaryoten kommen zudem phosphorylierte Formen von MI als essentielle Bestandteile der Zellmembran bzw. als sekundärer Botenstoffe IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat) vor. So dient auch Phosphatidylinositol sowohl als Strukturelement der Zellmembran als auch als Vorläufer für weitere Membranbestandteile wie Sphingolipide, Ceramide und GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol-Anker). An diesen können verschiedene Proteine angehängt sein, die dadurch mit der Zellmembran verankert sind (Michell, 2008, Reynolds, 2009). So wird beispielsweise das GPI-verankerte Wirtsprotein CD55, das an der Regulation des Komplementsystems beteiligt ist, für die Bildung der Membran der SCV rekrutiert (Catron *et al.*, 2002). Auch im Darminhalt von Menschen ist MI weit verbreitet, wobei die Konzentrationen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Darmabschnitt stark variieren können. Im Vergleich zum Duodenum, Jejunum und Ileum liegen in der Mucosa des transversen Colons große Mengen an Inositol vor (Wang *et al.*, 2007).

1.3.2 Enzymatischer Abbau von MI

Die Reaktionsschritte des Katabolismus von MI in Bakterien wurden anhand des gramnegativen Bakteriums *Enterobacter aerogenes* sowie insbesondere an *Bacillus subtilis* identifiziert (Berman & Magasanik, 1966, Anderson & Magasanik, 1971a, Anderson & Magasanik, 1971b, Yoshida *et al.*, 2008). In Abb. 5 sind die Reaktionen dargestellt, die in *B. subtilis* ablaufen. Dabei wird MI mittels der Transporter iolT1 und iolF (iolT2 in *S. Typhimurium* (Kröger *et al.*, 2010)) von *B. subtilis*

aufgenommen (Yoshida *et al.*, 2002). Im Zytoplasma dehydriert IolG (Inositol-Dehydrogenase) die Hydroxylgruppe am C₂-Atom. Dabei entsteht 2-Keto-*myo*-Inositol und ein Molekül NAD⁺ wird zu NADH + H⁺ reduziert. IolE spaltet als 2-Keto-*myo*-Inositol-Dehydratase ein Molekül H₂O ab, sodass 3D-(3,5/f)-Trihydroxycyclohexan-1,2-dion entsteht. Die Hydrolase IolD öffnet dieses Ringmolekül durch die hydrolytische Spaltung von H₂O, wobei 5-Deoxyglucuronsäure gebildet wird. Deren Isomerisierung in 2-Deoxy-5-keto-D-Glucuronsäure erfolgt durch die Isomerase IolB. Bei dem folgenden Schritt, bei dem ein Molekül ATP in ADP von der membranständigen Kinase IolC1/IolC2 hydrolysiert wird, entsteht 2-Deoxy-5-keto-D-Glucuronsäure-6-Phosphat (DKP). Die Aldolase IolJ spaltet dieses Molekül in je ein Molekül Dihydroxyacetonphosphat und Malonatsemialdehyd. Dieses wird wiederum unter Verbrauch eines Moleküls Coenzym A von IolA zu Acetyl-CoA dehydriert. Dabei wird ein Molekül CO₂ abgespalten sowie ein Molekül NAD⁺ zu NADH + H⁺ reduziert. Damit werden in der Nettobilanz jeweils ein Molekül MI, Coenzym A und ATP sowie zwei Moleküle NAD⁺ umgesetzt zu je einem Molekül Acetyl-CoA, ADP, CO₂, Dihydroxyacetonphosphat und zwei Molekülen NADH + H⁺. Dihydroxyacetonphosphat kann direkt in die Glykolyse eingehen und Acetyl-CoA den Citratzyklus speisen.

Dagegen ist die Nutzung von MI als Kohlenstoff- und Energiequelle bei Bakterien im Vergleich nur wenig verbreitet (Michell, 2008). Neben *B. subtilis*, *E. aerogenes* und *S. Typhimurium* ist es von folgenden Stämmen derzeit bekannt, dass sie mit MI als Kohlenstoffquelle wachsen können: den grampositiven *Bacillus cereus* (Warda *et al.*, 2016), *Corynebacterium glutamicum* (Kringes *et al.*, 2006), *Clostridium perfringens* (Kawsar *et al.*, 2004), *Lactobacillus casei* BL23 (Yebra *et al.*, 2007) sowie den gramnegativen *Caulobacter crescentus* (Boutte *et al.*, 2008), *Klebsiella pneumoniae* (Legakis *et al.*, 1976), *Legionella pneumophila* (Manske *et al.*, 2016), *Pseudomonas putida* (Rber *et al.*, 1977), *Rhizobium leguminosarum var viciae* (Fry *et al.*, 2001), *Serratia liquefaciens* (Legakis *et al.*, 1976), *Serratia marcescens* (Legakis *et al.*, 1976), *Sinorhizobium meliloti* (Galbraith *et al.*, 1998) und *Yersinia enterocolitica* (Kröger & Fuchs, 2009).

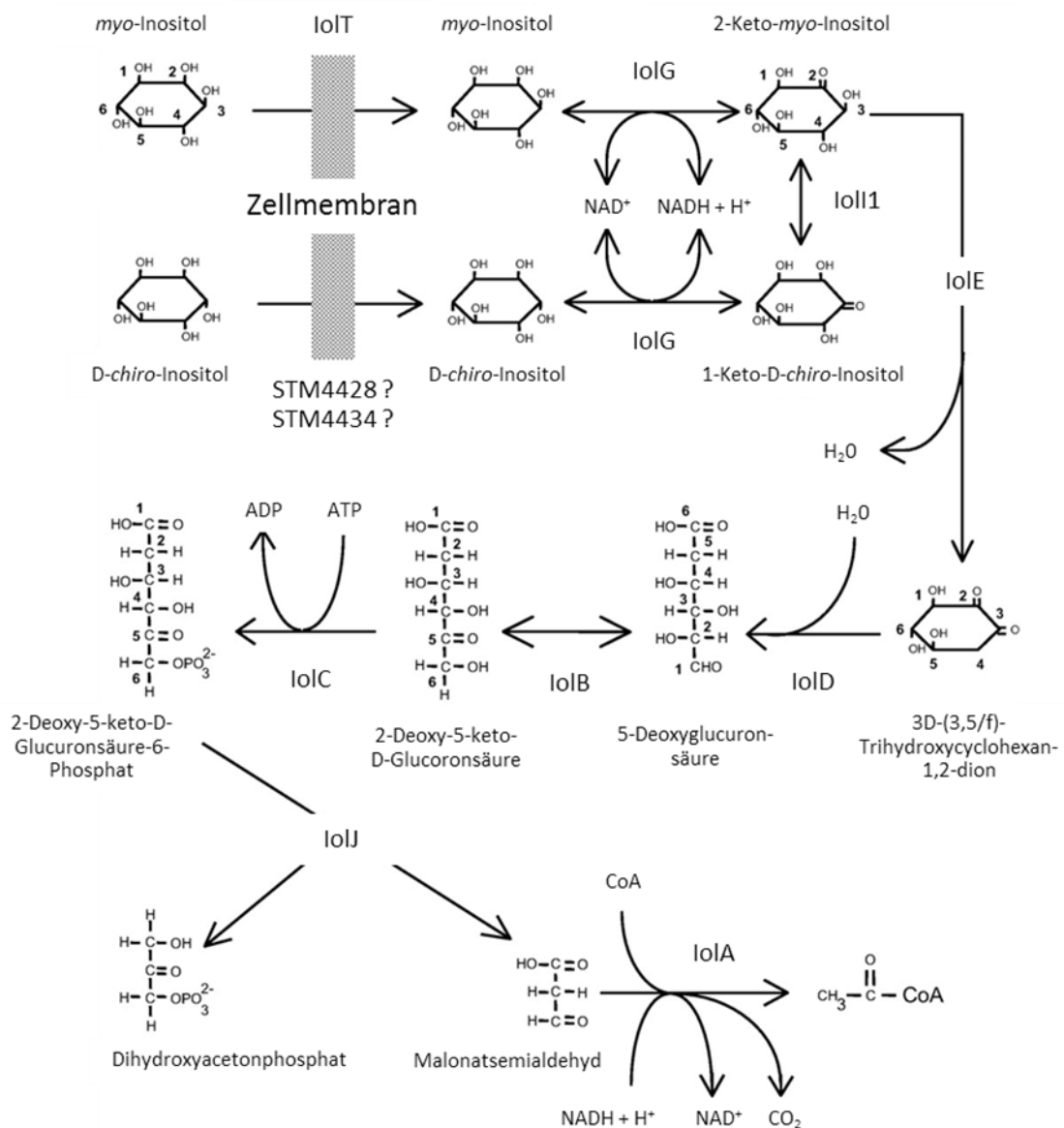


Abb. 5: Der MI-Katabolismus von *B. subtilis*. MI wird durch die Transporterproteine IolT und IolJ von den Zellen aufgenommen (Yoshida *et al.*, 2002). In sieben enzymatischen Reaktionen wird dabei ein Molekül MI zu jeweils einem Molekül Acetyl-CoA, Dihydroxyacetonphosphat und CO₂ umgesetzt, wobei zwei Moleküle NAD⁺ zu NADH + H⁺ reduziert werden und ein ATP zu ADP hydrolysiert (Yoshida *et al.*, 2008). Abbildung modifiziert nach Yoshida *et al.* (2008).

1.3.3 Genetik des MI-Katabolismus in *B. subtilis*

Die Genetik des MI-Katabolismus in *B. subtilis* ist wenig komplex. Die Proteine, die den Transport und den Abbau von MI katalysieren, sind auf einer genomischen Insel kodiert. Diese ist 13,5 kb groß und enthält 12 Gene. Der Haupttransporter IolT von MI befindet sich als einziges *iol*-Gen außerhalb dieser Insel. Die genomische Insel besteht aus dem bicistronischen Operon *iolRS*, das für den reprimierenden Transkriptionsregulator IolR und eine putative Pyridoxal-Reduktase IolS kodiert, sowie dem polycistronischen, unidirektionalen Operon *iolABCDEFGHJIJ*. Dieses kodiert für alle

weiteren essentiellen Enzyme des MI-Katabolismus. Dieses Operon wird von dem Repressorprotein IoIR in Abwesenheit von DKP (siehe 1.3.2) reprimiert. Das für IoIR kodierende Gen *ioIR* befindet sich dabei auf dem entgegengesetzten DNA-Strang in unmittelbarer Nähe zum Startcodon des *ioIABCDEFGHIIJ*-Operons. DKP entsteht als fünftes Zwischenprodukt beim Abbau von MI. Durch die Bindung von DKP an IoIR kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch sowohl die Repression der Transkription des *ioI*-Operons als auch die von *ioIT* aufgehoben wird. Die dadurch bedingte Synthese der IoI-Enzyme führt zum Abbau von MI im Medium und ermöglicht das Wachstum der Zellen. Der initiale Abbau von MI ist dem Modell nach möglich, da auch trotz der Repression durch IoIR eine sehr schwache Expression der *ioI*-Gene stattfindet und somit einige Moleküle der IoI-Enzyme in der Zelle vorliegen (Yoshida *et al.*, 1999, Yoshida *et al.*, 2002, Yoshida *et al.*, 2008).

1.4 MI-Metabolismus von *S. Typhimurium*

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm *Salmonella* Typhimurium 14028 verfügt über die Fähigkeit, mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen zu können. Dabei können verschiedene charakteristische Phänotypen beobachtet werden. Besonders auffällig ist die enorm lange und variable Latenzphase (engl. für lag-Phase) von 40-60 Stunden. Ein vergleichbarer Phänotyp ist weder von anderen Prokaryoten in Zusammenhang mit dem MI-Metabolismus noch von *S. Typhimurium* mit anderen Kohlenstoffquellen bekannt (Kawsar *et al.*, 2004, Krings *et al.*, 2006, Yebra *et al.*, 2007, Kröger & Fuchs, 2009, Manske *et al.*, 2016). Zuerst wurde das Wachstum von Salmonellen mit MI von Old beschrieben (Old, 1972). Dabei wurde festgestellt, dass sich *Salmonella*-Stämme deutlich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, innerhalb von 24 Stunden in *myo*-Inositol-Pepton-Medium wachsen zu können.

Für die hohe Variabilität der lag-Phasendauer ist der bistabile Wachstumsphänotyp ursächlich (Kröger *et al.*, 2011, Hellinckx & Fuchs, 2016). Dabei wird die Expression der *ioI*-Gene nur in einer Subpopulation der inokulierten Zellen aktiviert, sodass diese MI zum Wachstum nutzen können. Diese Aufteilung des isogenen Stammes 14028 in zwei Subpopulationen kann gut auf MI-Agarplatten beobachtet werden. Nach dem Ausstreichen und der Kultivierung für 48 Stunden bei 37 °C sind einige große, schnell wachsende Kolonien sowie ein „Rasen“ aus vielen, sehr kleinen Kolonien zu sehen (Abb. 6).

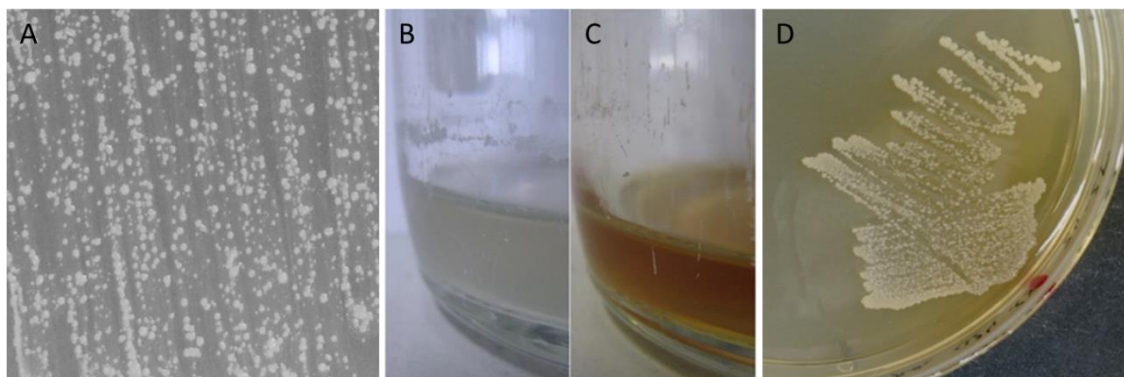


Abb. 6: Wachstum von *S. Typhimurium* 14028 mit MI als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. (A) Das Wachstum auf einer MI-Agarplatte zeigt deutlich zwei verschiedene Wachstumsphänotypen nach 48 Stunden bei 37 °C: große Kolonien auf einem „Rasen“ aus sehr kleinen Kolonien. Das Wachstum von 14028 mit MI ist zudem gekennzeichnet durch die Bildung eines braunen Pigments. Dieses ist während des logarithmischen Wachstums nicht zu beobachten (B), sondern tritt erst nach Erreichen der stationären Phase auf (C). Auf Agarplatten ist eine braune Verfärbung ebenfalls um die Kolonien herum auf dem ansonsten durchsichtigen Agar zu sehen (D).

Für das Wachstum von *S. Typhimurium* 14028 in MI-Medium ist zudem die braune Färbung des ursprünglich klaren Kulturmediums charakteristisch, die erst nach Erreichen der stationären Phase auftritt (Abb. 6 B). Dieser Phänotyp wurde ebenfalls bereits von OLD bei einem *Salmonella* Isolat beobachtet (Old, 1972). Es bleibt unklar, ob es sich bei diesem Isolat um *S. Typhimurium* 14028 handelte. Weiteren Einfluss auf das Wachstum von 14028 in MI-Medium hat CO₂ bzw. NaHCO₃. Werden die Zellen in MI-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ in der Atmosphäre oder 0,1 % NaHCO₃ im Medium kultiviert, so wird der bistabile Phänotyp aufgehoben und die Dauer der lag-Phase auf 25-30 Stunden reduziert. Ein vergleichbarer Effekt kann auch mit der Deletion des Repressors *IoIR* erreicht werden. Dadurch wird die Dauer der lag-Phase auf 30-35 Stunden reduziert. Interessanterweise sind diese beiden Effekte kumulativ und resultieren in einer Reduktion der lag-Phasendauer auf 15-20 Stunden (Kröger *et al.*, 2011). Zudem lässt dies den Schluss zu, dass der Effekt von CO₂ bzw. NaHCO₃ nicht über eine Interaktion mit *IoIR* stattfindet (Kröger, 2010). Die lange Dauer der lag-Phase von 14028 unter Standardbedingungen, also ohne CO₂ bzw. NaHCO₃, hängt zudem von der Konditionierung der Zellen und nicht von einer möglichen Konditionierung des Mediums durch die Zellen ab (Sundaram, 1972, Broadley, 2011). So wachsen Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und von dort in frisches MI-Medium überführt werden, kontinuierlich weiter.

1.4.1 Struktur und transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436

Im Gegensatz zu der wenig komplexen Struktur und Regulation der *iol*-Gene in *B. subtilis* ist die Genetik des MI-Metabolismus in Salmonellen sehr komplex. Die Proteine, die den Transport und den Abbau von MI katalysieren, sind ebenso auf der

genomischen Insel GEI4417/4436 kodiert wie auch die Gene für deren transkriptionelle Regulation. Sie umspannt eine 22,6 kb große Region im Genom von *S. Typhimurium* und umfasst 19 Gene (Abb. 7).

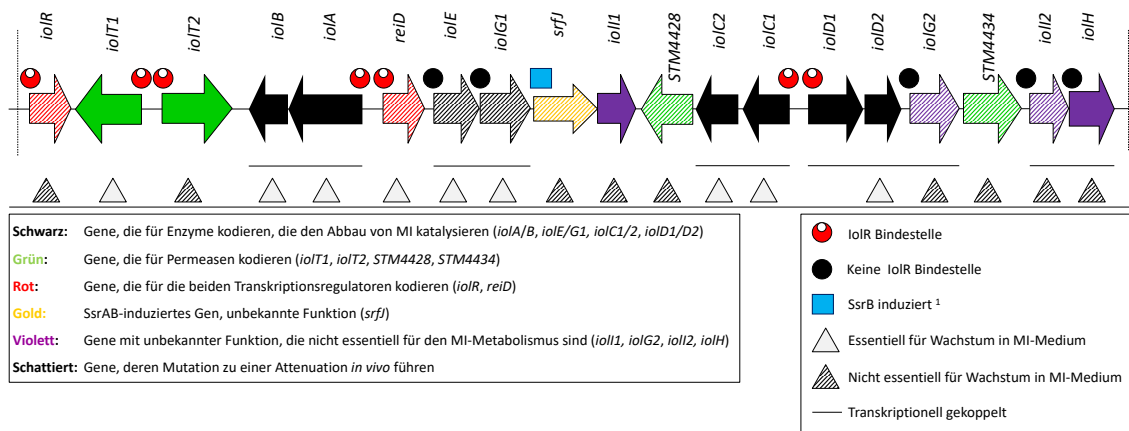


Abb. 7: Struktur, transkriptionelle Organisation und Regulation der genomischen Insel GEI4417/4436 (Kröger, 2010, Rothhardt *et al.*, 2014). Die Insel umspannt einen 22,6 kb großen Bereich von *STM*4417 (*ioI*R) bis *STM*4436 (*ioI*H) und enthält 19 Gene. Die *ioI*-Gene kodieren für Enzyme, die an der Regulation, dem Transport und dem Abbau von MI beteiligt sind. ¹ (Worley *et al.*, 2000, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010)

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Gene der GEI4417/4436 in 5 bicistronischen bzw. polycistronischen Operons sowie in 8 einzelnen Loci organisiert sind. Die 5 Operons bestehen aus *ioI*A/B, *ioI*E/G1, *ioI*C1/C2, *ioI*D1/D2/*ioI*G2 und *ioI*L2/H. Die jeweiligen putativen Funktionen der kodierten Proteine sind in Tab. 1 zusammengefasst. Ein Gen, das für die essentielle DKP-Aldolase *ioI*J kodiert, konnte bisher weder innerhalb der GEI4417/4436 noch außerhalb der genomischen Insel im Genom von *S. Typhimurium* identifiziert werden. Da dieser Reaktionsschritt jedoch essentiell für den MI-Katabolismus ist, muss ein entsprechendes Gen im Genom von *S. Typhimurium* 14028 vorhanden sein (Kröger & Fuchs, 2009). Zudem sind innerhalb der GEI4417/4436 die Gene *ioI*C und *ioI*D jeweils in zwei offene Leserahmen geteilt, weshalb diese als *ioI*C1 und *ioI*C2 sowie *ioI*D1 und *ioI*D2 annotiert wurden (Kröger & Fuchs, 2009). Neben den Genen, die essentiell für das Wachstum in MI-Medium sind, befinden sich mehrere konservierte Gene mit unbekannter Funktion auf der GEI4417/4436. Dazu gehören *STM*4428 und *STM*4434, die beide für putative Permeasen kodieren, sowie *ioI*G2 und *ioI*H. Diese kodieren vermutlich für eine Hydrogenase und eine Isomerase/Dehydratase. Von dem Gen *srj*f ist außer der Sequenzhomologie zu einer lysosomalen Glykosylceramidase bekannt, dass der SPI-2-Hauptregulator SsrB den Promotor von *srj*f induziert (Worley *et al.*, 2000, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Zudem führte die Deletion von *srj*f zu einer leichten Attenuation während der systemischen Infektion im Mausmodell nach intraperitonealer Inokulation (Ruiz-Albert *et al.*, 2002).

Tab. 1: Gene der GEI4417/4436 von *S. Typhimurium* 14028¹.

| Gen | Locus | Protein | Funktion | Essentiell ² |
|--------------|----------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|
| <i>iolR</i> | <i>STM4417</i> | Transkriptionsregulator | Hauptregulator des MI-Abbaus - Repressor | nein |
| <i>iolT1</i> | <i>STM4418</i> | Permease | MI-Transporter, hohe Effizienz | nein |
| <i>iolT2</i> | <i>STM4419</i> | Permease | MI-Transporter, niedrige Effizienz | nein |
| <i>iolB</i> | <i>STM4420</i> | Isomerase | 5DG/DKG Isomerisierung | ja |
| <i>iolA</i> | <i>STM4421</i> | Dehydrogenase | MSA Konvertierung zu Acetyl-CoA und CO ₂ | ja |
| <i>reiD</i> | <i>STM4423</i> | Transkriptionsregulator | Induktion von <i>iol</i> -Promotoren | ja |
| <i>iolE</i> | <i>STM4424</i> | Dehydratase | 2KMI/THcHDO Dehydratation | ja |
| <i>iolG1</i> | <i>STM4425</i> | Dehydrogenase | MI/2KMI Dehydrierung | ja |
| <i>srfJ</i> | <i>STM4426</i> | Putative lysosomale Glykosylceramidase | unbekannt | nein |
| <i>iolI1</i> | <i>STM4427</i> | Isomerase | 2KMI/1-keto-DCI Isomerase | nein |
| | <i>STM4428</i> | Permease | unbekannt | nein |
| <i>iolC2</i> | <i>STM4429</i> | Kinase | Phosphorylierung von DKG zu DKP | ja |
| <i>iolC1</i> | <i>STM4430</i> | Kinase | Phosphorylierung von DKG zu DKP | ja |
| <i>iolD1</i> | <i>STM4431</i> | Hydrolase | Ringbruch THcHDO/5DG | nicht bekannt |
| <i>iolD2</i> | <i>STM4432</i> | Hydrolase | Ringbruch THcHDO/5DG | ja |
| <i>iolG2</i> | <i>STM4433</i> | Dehydrogenase | unbekannt | nein |
| | <i>STM4434</i> | Permease | unbekannt | nein |
| <i>iolI2</i> | <i>STM4435</i> | Isomerase | 2KMI/1-keto-DCI Isomerase | nein |
| <i>iolH</i> | <i>STM4436</i> | Isomerase/Dehydratase | unbekannt | nein |

¹ Tabelle geändert nach Kröger (2010); ² essentiell für das Wachstum in MI-Medium.

1.4.2 Regulation der *iol*-Gene

Die Regulation der *iol*-Gene wird im hohen Maße durch den Repressor *IoIR* gesteuert. Wie in den Arbeiten von KRÖGER mittels episomaler *lux*-Reporter gezeigt werden konnte, reprimiert *IoIR* die Promotoren aller fünf *iol*-Operons sowie die Promotoren der Gene *iolT1* und *iolT2*. Zudem reprimiert *IoIR* auch den Promotor des *IoIR*-kodierenden Gens *iolR* und wirkt somit als Autoregulator (Kröger & Fuchs, 2009, Kröger *et al.*, 2010). Eine Bindung zwischen *IoIR* und den Promotoren konnte dabei für *iolR*, *iolT1*, *iolT2*, *iolA*, *iolC1* und *iolD1* nachgewiesen werden. Die Promotoren der Operons *iolE/G1* und *iolI2/H* zeigten hingegen keine Interaktion mit dem Repressor.

Bemerkenswert ist dabei, dass bei den Promotoren dieser beiden Operons mit großem Abstand die stärkste Expressionssteigerung aller Promotoren im Vergleich von der Kultivierung in Minimalmedium mit Glukose (MM-Glukose) und MI-Medium gemessen wurde.

Basierend auf der damaligen Datenlage postulierte KRÖGER ein Modell für die Regulation des MI-Metabolismus in *S. Typhimurium* (Kröger, 2010) (Abb. 8): In Abwesenheit von MI bindet der Transkriptionsfaktor IolR die Promotoren von *iolR*, *iolT1*, *iolT2*, *iolA/iolB*, *iolC1/iolC2* und *iolD1/iolD2*. Dadurch wird deren Expression auf ein basales Niveau reprimiert, sodass nur wenige Moleküle der Iol-Enzyme im Zytoplasma bzw. Zellmembran vorhanden sind. Kommt *S. Typhimurium* in Kontakt zu MI, wird dieses durch die geringe Menge an IolT1-Permeasen in die Zelle transportiert. Dort wird MI abgebaut, wobei DKP als Zwischenprodukt vorliegt. Dieses bindet IolR und bewirkt dessen Inaktivierung und Ablösung von der DNA. Durch die fehlende Repression wird die Aktivität der *iol*-Promotoren aktiviert, was zur Bildung der entsprechenden Enzyme führt. Durch das vermehrt gebildete IolT1 wird mehr MI von den Zellen aufgenommen, welches wiederum schneller abgebaut wird, sodass eine positive Rückkopplung entsteht.

Die Ursache der Bistabilität vermutet KRÖGER in der Bildung von DKP zu Beginn der positiven Rückkopplung. Diese könne in den individuellen Zellen unterschiedlich „optimal“ stattfinden, sodass die Konzentration an DKP, die für den Start der positiven Rückkopplung notwendig sei, nicht in allen Zellen gleichzeitig erreicht werde. Dadurch würden die Zellen nicht gleichzeitig mit dem Wachstum beginnen können. Sobald MI aus dem Kulturmedium vollständig von den Zellen aufgenommen und das Zwischenprodukt DKP ebenfalls weiter zu Dihydroxyacetonphosphat und Malonatsemialdehyd katalysiert worden sei, könne IolR wieder an die DNA binden und die Promotoren erneut reprimieren. Diese Regulation würde jedoch nur die Gene betreffen, deren Promotoren direkt von IolR reprimiert werden, also *iolR*, *iolT1*, *iolT2*, *iolA/iolB*, *iolC1/iolC2* und *iolD1/iolD2*, und nicht *iolE/iolG1*. Dieses Operon kodiert für zwei Enzyme, die die zwei initialen Reaktionsschritte beim Abbau von MI katalysieren. Sowohl durch die Deletion von *iolR* als auch durch das Wachstum in MI-Medium wird dieses Operon, wie auch alle anderen *iol*-Gene, stark induziert, obwohl der Promotor P_{iolE} nicht von IolR gebunden wird.

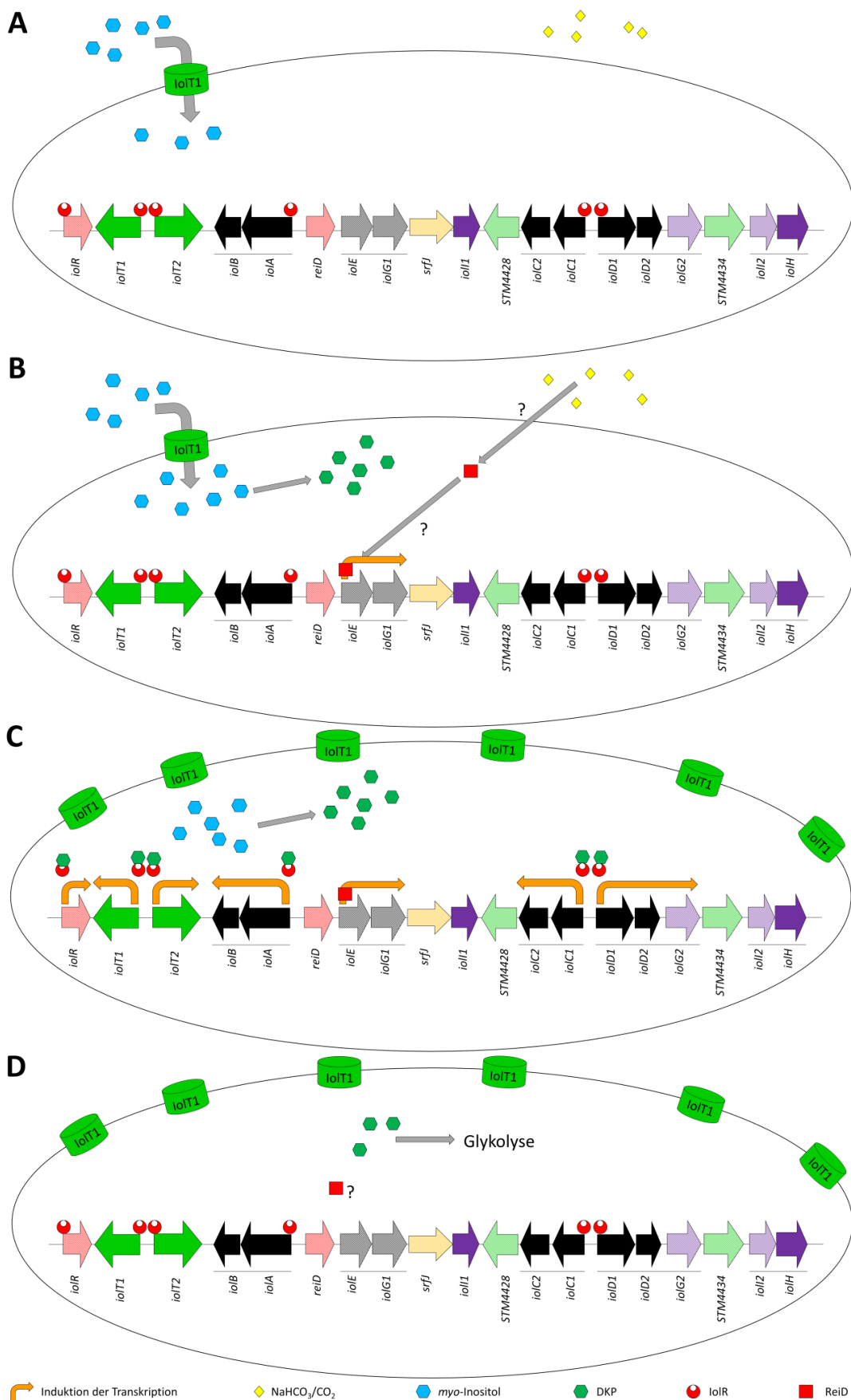


Abb. 8: Modell zur Regulation des MI-Metabolismus in *S. Typhimurium*. (A) Aus dem extrazellulären Medium werden geringe Mengen an MI über *IolT1* aufgenommen. *IolR* ist an die Promotoren der Gene *iolR*, *iolT1*, *iolT2*,

iolA/iolB, *iolC1/iolC2* und *iolD1/iolD2* gebunden und reprimiert deren Expression. (B) Ist $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ im Medium, kann es entweder in die Zelle diffundieren (CO_2) oder durch einen putativen Hydrogencarbonat-Transporter aufgenommen werden, um dann an der Aktivierung von $P_{iolE/iolG1}$ durch STM4423 (ReiD) beteiligt zu sein. Durch die basale Expression der *iol*-Gene werden kleine Mengen MI in DKP umgewandelt, das nun an IolR binden kann. Dadurch wird die Repression der *iol*-Gene beendet. (C) Alle *iol*-Gene werden stark exprimiert. Die Menge an MI-Transportern in der Zytoplasmamembran ist dadurch erhöht, sodass mehr MI in die Zelle transportiert wird, das sofort degradiert werden kann, um Energie für die Zelle zu generieren. (D) Nachdem MI aus dem Medium aufgebraucht ist und intrazellulär das restliche DKP in die Glykolyse eingeflossen ist, kann IolR wieder an die oben genannten Promotoren binden und so die Expression erneut reprimieren. Wie sich ReiD in dieser Phase verhält, ist unklar. Abbildung modifiziert nach Kröger (2010).

KRÖGER vermutete, dass dieser Promotor von einem zweiten Regulator gebunden und induziert wird, wobei auch CO_2 bzw. HCO_3^- die Expression beeinflussen kann. Als wahrscheinliches Gen, das für diesen unbekanntem Regulator kodiert, sieht KRÖGER STM4423 an. Dieses Gen befindet sich nur 260 bp 5'-gelegen vom Operon *iolE/iolG1* und ist essentiell für das Wachstum von *S. Typhimurium* mit MI als einziger Kohlenstoffquelle. Die Überexpression von *iolE/iolG1* konnte dabei den Wachstumsdefekt der STM4423-Mutante komplementieren (Kröger, 2010). Dies deutete am Ende der Arbeit von KRÖGER und zu Beginn der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass es sich bei STM4423 um den Transkriptionsfaktor handeln könnte, der den Promotor von *iolE/iolG1* bindet und reguliert. Da dieser Regulator essentiell für die *myo*-Inositol Degradation ist, wurde STM4423 **reiD** und das entsprechende Protein **ReiD** benannt.

1.4.3 MI-Metabolismus und Virulenz in *S. Typhimurium*

Bisherige Veröffentlichungen legen den Schluss nahe, dass der MI-Metabolismus eine Rolle im Infektionsgeschehen von *S. Typhimurium* spielt - sowohl während einer Enteritis als auch in der systemischen Infektion. Die Mutation der in Tab. 2 genannten Gene führte in den jeweiligen Tiermodellen zur Attenuation der Virulenz bzw. diese waren in den jeweiligen Tiermodellen während der Infektion stark exprimiert. Zudem wird die Genregulation der GEI4417/4436 durch CO_2 , das als *in vivo* Signal für Pathogene wirken kann, stimuliert (Yang *et al.*, 2008, Kröger *et al.*, 2011). Von diesen virulenzassoziierten Genen sind die Gene *reiD*, *iolE*, *iolG1* essentiell für das Wachstum mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle *in vitro*. Die weiteren virulenzassoziierten Gene sind unter diesen Bedingungen hingegen nicht essentiell. Die Gene *srfJ*, *STM4428*, *iolG2*, *STM4434* und *iolI2* stehen deshalb in Verdacht, für den MI-Metabolismus während der Infektion relevant zu sein.

Besonders interessant ist das Gen *reiD*. Dieses fiel bereits in der genomweiten Untersuchung von Genen auf, die im Maus-Enteritis-Modell exprimiert wurden (Rollenhagen & Bumann, 2006). Dabei zeigte sich, dass das Expressionslevel von *reiD* das zwanzigst stärkste in *S. Typhimurium* SL1344 im Enteritis-Modell war, wohingegen

keine signifikante Expression von *reiD* im systemischen Infektionsmodell gemessen werden konnte. Die Tatsache, dass das Gen eines putativen Regulators, der essentiell für das Wachstum mit MI als alleiniger Kohlenstoffquelle ist, während der Infektion des Darms sehr stark transkribiert wird, lässt einen Zusammenhang zwischen MI-Metabolismus und Virulenz vermuten.

Tab. 2: Die Deletion dieser Gene der GEI4417/4436 führt zur Attenuation in den jeweiligen Infektionsmodellen.

| Gen | Enteritis-Modell | Systemische Infektion-Modell |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>iolR</i> | Huhn, Schwein, Kalb, Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2013) | Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>reiD</i> | Maus (Rollenhagen & Bumann, 2006) Huhn, Schwein, Kalb, Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2013) | |
| <i>iolE</i> | | Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>iolG1</i> | Huhn, Schwein, Kalb, Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2013) | |
| <i>srfJ</i> | | Maus (Ruiz-Albert <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>STM4428</i> | | Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>iolG2</i> | Schwein (Carnell <i>et al.</i> , 2007) Huhn, Schwein, Kalb, Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2013) | Maus (Lawley <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>STM4434</i> | Huhn, Schwein, Kalb, Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2013) | Maus (Lawley <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>ioll2</i> | Huhn, Schwein, Kalb, Maus (Chaudhuri <i>et al.</i> , 2013) | Maus (Lawley <i>et al.</i> , 2006) |

1.5 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Untersuchung der Regulation des MI-Metabolismus von *S. Typhimurium* 14028 aufbauend auf der Arbeit von Carsten Kröger (KRÖGER, 2010). Der Schwerpunkt lag dabei auf dem zweiten Regulatorprotein STM4423 (ReiD), das auf der genomischen Insel GEI4417/4436 kodiert wird. Zu diesem Zweck sollte im ersten Teil dieser Arbeit das Vorkommen der Insel sowie des unbekanntes Regulators insbesondere innerhalb der Gattung *Salmonella* untersucht werden. Dazu wurden Genomdaten sowie Proben aus Stammsammlungen verwendet.

Im zweiten Teil sollte die physiologische Funktion von ReiD insbesondere mit Fokus auf den MI-Metabolismus von *S. Typhimurium* analysiert werden. Damit einhergehend sollten die Zielgene des Regulators sowie die Faktoren, die seine eigene Transkription regulieren, identifiziert und analysiert werden. Zu den zu untersuchenden Faktoren zählten sowohl Regulatorproteine als auch Umweltfaktoren. Aufgrund der Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen MI-Metabolismus und Virulenz bei *S. Typhimurium* wahrscheinlich machen, sollten bei dieser Untersuchung auch *in vivo*-Bedingungen und Virulenzfaktoren betrachtet werden.

Der nächste Schritt fokussierte sich auf den Einfluss der sRNA STnc1740 und STnc2160 (RssR) auf die Physiologie und Genregulation des MI-Metabolismus. Dabei sollten neben den sRNAs auch die damit assoziierten Regulatorproteine analysiert werden.

In einem letzten Schritt wurde die Bedeutung des Repressors IolR für den MI-Metabolismus eingehender untersucht. Zudem sollte der Einfluss der globalen Regulatoren SsrB und H-NS auf einzelne Gene der GEI4417/4436 und auf die Physiologie von *S. Typhimurium* in MI-Medium betrachtet werden.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders beschrieben, werden Chemikalien von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Carl-Roth, Gibco und Biochrom bezogen, die der p.A.-Qualität (*pro analysi*) entsprechen. Die Herstellung von Medien erfolgt mit deionisiertem Elix-Wasser. Für Lösungen und Puffer wird deionisiertes MilliQ-Wasser verwendet. Filtrationen werden mit Filtern der Firma Millipore durchgeführt. Zudem werden, sofern nicht anders beschrieben, alle prokaryotischen und eukaryotischen Zellen immer bei 37 °C inkubiert.

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Beschreibung | Herkunft |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>E. coli</i> Stämme | | |
| DH5α | <i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17</i> (r _k -m _k +), <i>recA1, relA1, supE44, λthi-1, Δ(lacZYA-argFV169)</i> | (Hanahan, 1983) |
| SM10 λ <i>pir</i> | <i>lacY tonA recA Mu_c+ thi thr leu supE</i> RP4-2-Tc::Mu Km ^R λ <i>pir</i> | (Simon <i>et al.</i> , 1983) |
| BL21 (DE3) | <i>F, ompT, hsdS_B (r_B⁻m_B⁻), gal, lon, dcm, rne131, λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i> | (Studier <i>et al.</i> , 1990) |
| BL21 (DE3) KB3 | BL21 (DE3) KB3, <i>ΔstpA, Δhns</i> | (Böhme <i>et al.</i> , 2012) |
| TOP10 | <i>F, mcrA, Δ(mcr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara leu)7679, galU, galk, rpsL (Str^r), endA1, nupG</i> | Invitrogen, Karlsruhe, Germany |

| | | |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| XL-1 Blue | <i>endA1, gyrA96, hsdR17</i> (r _k -m _{k+}), <i>recA1, relA1, supE44, λthi-1, lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)] | Agilent, Böblingen, Germany |
| XL-1 <i>imal-lux</i> | XL-1 blue mit einer Insertion von pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) zwischen <i>malE</i> und <i>malk</i> | Diese Arbeit |
| XL-1 <i>imal-P_{ioIE}::lux</i> | Siehe oben, aber mit einer <i>luxCDABE</i> -Kassette unter der Kontrolle des Promotors P _{ioIE} | Diese Arbeit |
| S. Typhimurium | | |
| 14028 | <i>S. Typhimurium</i> Stamm ATCC14028, spontane Str ^R Mutante | (Kröger & Fuchs, 2009) |
| 14028Δ <i>ioIR</i> | In-frame (<i>STM4417</i>) Deletionsmutante | (Kröger & Fuchs, 2009) |
| 14028Δ <i>reiD</i> | In-frame (<i>STM4423</i>) Deletionsmutante | Diese Arbeit |
| 14028Δ <i>reiD</i> Δ <i>ioIE</i> Δ <i>ioIG1</i> | In-frame Dreifach-Deletionsmutante <i>reiD, ioIE</i> und <i>ioIG1</i> (<i>STM4423</i> - <i>STM4425</i>) | Diese Arbeit |
| 14028Δ <i>STnc1740</i> | <i>STnc1740</i> Deletionsmutante | Diese Arbeit |
| 14028Δ <i>rssR</i> | Partielle <i>rssR</i> (<i>STnc2160</i>) Deletionsmutante, bei der die ersten 10 Nukleotide nicht deletiert wurden, die mit <i>ioIB</i> überlappen | Diese Arbeit |
| 14028Δ <i>hfq</i> | <i>hfq</i> Deletionsmutante | Diese Arbeit |
| 14028 P _{<i>reiD</i>} :: <i>lux</i> | Chromosomale Fusion des Luciferase-Reporters mit dem Promotor P _{<i>reiD</i>} | Diese Arbeit |
| 14028 <i>reiD</i> :: <i>lux</i> | Chromosomale Fusion von <i>reiD</i> mit dem Luciferase-Reporter | Diese Arbeit |

| | | |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 14028 <i>iolX::lux</i> | Jeweilige chromosomale Fusion der Gene <i>iolR</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>iolG1</i> , <i>srfJ</i> , <i>iolI1</i> , <i>STM4428</i> , <i>iolC2</i> , <i>iolD2</i> , <i>STM4434</i> und <i>iolH</i> mit dem Luciferase-Reporter | Diese Arbeit |
| 14028 <i>sseA::lux</i> | Chromosomale Fusion von <i>sseA</i> mit dem Luciferase-Reporter | Diese Arbeit |

2.1.2 Kultivierung von Bakterien

Von einem Reinigungsausstrich eines Bakterienstammes (Tab. 3) auf LB-Agarplatten wird jeweils eine Kolonie gepickt und in flüssigem LB-Medium resuspendiert. Die Kulturgefäße werden dann bei 37 °C und 180 rpm über Nacht (ÜN) inkubiert. Von diesen ÜNKs (**Über Nacht Kulturen**) werden dann entweder weitere Flüssigmedien angeimpft oder auf Agarplatten Ausstriche gemacht. *S. Typhimurium* und *E. coli* werden in folgenden Medien kultiviert (Tab. 4):

Tab. 4: Verwendete Medien

| Name | Inhalt |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Luria-Bertani (LB) Medium | 10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl |
| SOC-Medium | 20 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 3,9 g/l Glukose 0,6 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 2,5 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O 2,1 g/l MgCl ₂ x 6 H ₂ O |
| M9 Medium | 70 g/l Na ₂ HPO ₄ 30 g/l KH ₂ PO ₄ 5 g/l NaCl 10 g/l NH ₄ Cl |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Minimalmedium (MM) | 100 ml/l M9 Medium 2 mM MgSO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ |
| <i>myo</i> -Inositol-Medium (MI-Medium) | 100 ml/l M9 Medium 10 g/l <i>myo</i> -Inositol 2 mM MgSO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ |
| Minimalmedium mit Glukose (MM-Glukose) | 100 ml/l M9 Medium 10 g/l Glukose 2 mM MgSO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ |
| Expressionsmedium Arabinose | LB-Medium 1mM L(+) Arabinose |
| Expressionsmedium IPTG | LB-Medium 0,1 mM IPTG |
| Dünndarmsimulierendes Medium (SIEM) (Beumer <i>et al.</i> , 1992) | 5,7 g/l Pepton 2,4 g/l D-Glukose 6,14 g/l NaCl 0,68 g/l KH ₂ PO ₄ 0,3 g/l NaH ₃ PO ₄ 1,01 g/l NaHCO ₃ 5,6 g/l Schweinegalle 0,2 g/l Lysozym 1.000 U/l α -Amylase 110 U/l Trypsin 380 U/l Chymotrypsin |
| Dickdarmsimulierendes Medium (SCEM) (Beumer <i>et al.</i> , 1992) | 6,25 g/l Pepton 2,6 g/l D-Glukose 0,88 g/l NaCl 0,43 g/l KH ₂ PO ₄ |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | 1,7 g/l NaH ₃ PO ₄ |
| | 2,7 g/l KHCO ₃ |
| | 4,0 g/l Schweinegalle |
| SPI-1 induzierendes Medium (Bajaj <i>et al.</i> , 1996) | LB-Medium 1 % NaCl |
| LPM (SPI-2 induzierendes Medium) (Coombes <i>et al.</i> , 2004) | 5 mM KCl 7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 mM K ₂ SO ₄ 38 mM Glycerol 0,1 % Casaminosäuren 8 µM MgCl ₂ 337 µM PO ₄ ³⁻ mit 80 mM MES auf pH 5,8 |

Um Agarplatten herzustellen, wird dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar beigelegt. Den flüssigen und festen Medien werden nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ~50 °C entsprechende Antibiotika (AB) bzw. Zusätze nach Tab. 5 zugesetzt, um zu selektionieren bzw. Genexpression zu induzieren.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze

| Antibiotikum | Stammlösung [mg/ml] | Endkonzentration [µg/ml] | Lösungsmittel |
|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Ampicillin (Amp) | 50 | 150 | MilliQ-H ₂ O |
| Chloramphenicol (Cm) | 10 | 20 | 70 % Ethanol |
| Kanamycin (Kan) | 50 | 50 | MilliQ-H ₂ O |
| Rifampicin (Rif) | 50 | 500 | Methanol |
| Streptomycin (Str) | 50 | 50 | MilliQ-H ₂ O |
| Tetracyclin (Tet) | 12 | 12 | MilliQ-H ₂ O |
| IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) | 1 M | 0,1 mM | MilliQ-H ₂ O |
| Arabinose (Ara) | 1 M | 1 mM | MilliQ-H ₂ O |

2.1.3 Herstellung von Spezialmedien

Um Wachstumsmedien von Kompost, Kraftfutter und Maissilage herzustellen, werden diese jeweils 1:10 (w/v) in MM suspendiert und für 4 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Suspensionen werden dann 1:1.000 (v/v) mit MM verdünnt und sterilfiltriert. Für die Herstellung von Schweinecaecum-Medium wird der frische Inhalt des Schweinecaecums 1:10.000 in MM suspendiert und sterilfiltriert. Vor der Verwendung mit den Teststämmen werden die Spezialmedien jeweils konditioniert, indem diese 1:1.000 mit der ÜNK des Stamms 14028 Δ reiD inokuliert und für 7 Tage bei 37 °C inkubiert werden. Danach werden die Medien sterilfiltriert.

2.1.4 Phagentransduktion

Die Phagentransduktion mittels des Phagens P22 dient der randomisierten Übertragung von chromosomalen Sequenzen von einem *S. Typhimurium* Stamm auf einen anderen. Die Methode gliedert sich in zwei Abschnitte: die Herstellung des Phagenlysats und die eigentliche Phagentransduktion.

| <u>Herstellung des Phagenlysats</u> | <u>Phagentransduktion</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - ÜNK bei 37 °C von Zellen (WT oder mit zu transduzierender AB-Resistenz = Donorzellen) in 3 ml LB (+ Kan) - 1:100 Verdünnung der ÜNK in 10 ml LB (+ Kan) in kleinen Kolben (100 µl der ÜNK) - bei 37 °C schütteln bis OD 0,15-0,2 - 5 ml in Reagenzglas überführen - Zugabe von 5 µl des P22(WT) - Weitere Inkubation bei 37 °C für 6 h (nicht schütteln!) - In 15 ml Falcon Tubes überführen - Zugabe von 50 µl Chloroform (5 °C) - Inkubation für 2 h im Kühlschrank - Zentrifugation (7.000 rpm, 4 °C, 10 min) | <ul style="list-style-type: none"> - ÜNK: 14028 WT in 3 ml LB bei 37 °C - 200 µl der ÜNK mit 10 µl Phagenlysat des Stammes mit der zu transduzierenden AB-Resistenz mischen - 1 h bei 37 °C inkubieren (ohne Schütteln) - Gesamten Ansatz auf LB-Platten + Kan ausplattieren - Negativkontrollen: <ul style="list-style-type: none"> ○ 100 µl nur WT Zellen ○ 50 µl nur Phagenlysat - Platten bei 37 °C ÜN inkubieren - Kolonien auf Green Plates + Kan - Platten bei 37 °C ÜN inkubieren <ul style="list-style-type: none"> ○ Weiße Kolonien: Phagen-frei |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - Überstand sterilfiltrieren (0,22 µm) - Lagerung bei 5 °C im Kühlschrank | <ul style="list-style-type: none"> ○ Dunkelgrüne Kolonien: sind noch mit Phagen infiziert - Alle Kolonien (weiß und dunkelgrün) nochmals auf Green Plates + Kan - Weiße Kolonien: Reinigungsausstrich auf LB+Kan - Ausgehend von Reinigungsausstrich: <ul style="list-style-type: none"> ○ Kolonie-PCR ○ Glycerinstock |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

2.1.5 Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung der Bakterienstämme wird von dem jeweiligen Stamm eine ÜNK gemacht. 900 µl davon werden am folgenden Tag mit 900 µl einer 50 % Glycerinlösung vermischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 6: Verwendete eukaryotische Zelllinie

| Zelllinie | Relevante Eigenschaften | Herkunft |
|-----------|--------------------------------------------------|----------------|
| Caco-2 | Humane, epitheliale Dickdarm-adenokarzinomzellen | ATCC: HTB-37TM |

2.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotische Zelllinie Caco-2 (Tab. 6) wird im Zellkulturschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C in Zellkulturmedium (RPMI 1640 medium (Gibco, Eggenstein, Deutschland) mit 10 % FCS (*fetal calf serum*, fötales Kälberserum) (Biochrom KG, Berlin)) kultiviert. Die Subkultivierung erfolgt in der Regel alle 2-3 Tage. Prinzipiell werden Puffer und Medien immer auf 37 °C in einem Wasserbad vorgewärmt.

2.2.3 Langfristige Lagerung der eukaryotischen Zellen

Um die Zellen langfristig zu lagern, werden diese in flüssigem Stickstoff bei mindestens -196 °C aufbewahrt. Dabei verwendet man 10 % DMSO als Gefrierschutzmittel gegen Kristallbildung und Dehydratation der Zellen.

Das Einfrieren erfolgt folgendermaßen:

- Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch 10 minütige Trypsinierung (siehe 2.2.4)
- Zentrifugation der Zellen
- Zellpellet in Lösung A (20 ml RPMI 1640, 5 ml FCS; je 1,5 ml pro 75 cm^2 -Zellkulturflasche) resuspendieren
- Lösung B (15 ml RPMI 1640, 5 ml FCS, 5 ml DMSO; je 1,5 ml pro 75 cm^2 -Zellkulturflasche) langsam unter ständigem Schwenken des Greiner-Röhrchens zugeben
- Jeweils 1,5 ml der Lösung in Kryoröhrchen aliquotieren
- Lagerung bei -80 °C in einer Zellkultur-Kryobox über Nacht
- Lagerung in flüssigem Stickstoff

Das Auftauen der Zellen wird folgendermaßen durchgeführt:

- Auftauen der Zellen im 37 °C -Wasserbad und sofort 10 ml Zellkulturmedium hinzufügen
- Abzentrifugieren der Zellsuspension und den Überstand verwerfen
- Aufnehmen der Zellen in frischem Zellkulturmedium und Überführen in eine Zellkulturflasche
- Weiteres Passagieren der Zellen nach Erreichen der Konfluenz (Monolayer)

2.2.4 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen

- Abnehmen der Kulturlösung und zweimaliges Waschen mit 10 ml PBS
- Die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA; pro 75 cm^2 -Kulturflasche) benetzen
- 3-5 min bei 37 °C inkubieren, das Ablösen der Zellen makroskopisch und mikroskopisch beobachten
- 10 ml Zellkulturmedium zugeben
- Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren und in Greiner-Röhrchen überführen
- 5 min bei 600 rpm zentrifugieren

- Resuspendieren des Zellpellets in frischem Zellkulturmedium durch Auf- und Abpipettieren
- Zellsuspension um den Faktor 4 mit Zellkulturmedium in neuen Zellkulturflaschen verdünnen
- Zellen durch leichtes Schwenken gleichmäßig in der Kulturflasche verteilen
- im Zellkulturbrutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubieren

2.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Trypanblau wird verwendet, um zwischen lebenden und toten Zellen differenzieren zu können. Tote Zellen erscheinen dabei blau, da der Farbstoff ungehindert durch deren defekte Zellmembran gelangen kann. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff hingegen nur langsam auf und erscheinen daher farblos.

Die Färbung wird folgendermaßen durchgeführt:

- 50 µl der resuspendierten Zellen werden mit 50 µl 0,1 %-iger Trypanblau-Lösung vermischt.
- In der Neubauer-Zählkammer werden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt.
- Der Mittelwert wird bestimmt und die Lebendzellzahl ermittelt.

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 Plasmide

Tab. 7: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Herkunft |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| pKD4 | <i>pir</i> -dependent, FRT sites; Kan ^R | CGSC, Yale (Datsenko & Wanner, 2000) |
| pKD46 | Lambda-Red Helfer Plasmid; Amp ^R | CGSC, Yale (Datsenko & Wanner, 2000) |
| pCP20 | FLP Rekombinase Plasmid; Cm ^R , Amp ^R | CGSC, Yale (Datsenko & Wanner, 2000) |
| pBR322 | Amp ^R , Tet ^R | (Bolivar <i>et al.</i> , 1977) |
| pBR- <i>reiD</i> | <i>reiD</i> wurde zusammen mit 300 bp seiner 5'-UTR <i>via</i> PstI in pBR322 kloniert; Tet ^R , Amp ^S | Diese Arbeit |
| pBR- <i>iolR</i> | <i>iolR</i> wurde zusammen mit 300 bp seiner 5'-UTR <i>via</i> EcoRI/SalI in pBR322 kloniert; Tet ^S , Amp ^R | (Kröger & Fuchs, 2009) |
| pTARA | Von pBAD33 abstammendes Plasmid, das die Gene für die T7 RNA Polymerase trägt; Amp ^R | Addgene, Cambridge, MA |
| pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) | Suizidplasmid, das von pUT mini-Tn5 <i>luxCDABE</i> KM2 (Winson <i>et al.</i> , 1998) abstammt; ohne Transposon und mit Kan ^R substituiert durch Cm ^R | (Starke <i>et al.</i> , 2013) |
| pUTs- <i>imal-lux</i> | pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) mit 335 bp intergenischen Fragment von <i>male</i> und <i>malk</i> ; kloniert <i>via</i> SacI | Diese Arbeit |

| | | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| pUTs- <i>imal-P_{ioIE}::lux</i> | pUTs- <i>imal-lux</i> plus 300 bp des P _{ioIE} - Fragments fusioniert mit <i>lux via</i> Sacl/KpnI | Diese Arbeit |
| pUTs-P _{reiD} :: <i>lux</i> | pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) mit 500 bp des P _{reiD} - Fragments fusioniert mit <i>lux via</i> Sacl/KpnI | Diese Arbeit |
| pUTs- <i>ioIX::lux</i> | pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) mit den jeweils letzten 500 bp von <i>ioIR</i> , <i>ioIT1</i> , <i>ioIT2</i> , <i>ioIG1</i> , <i>srfJ</i> , <i>ioII1</i> , <i>ioIC2</i> , <i>ioID2</i> oder <i>ioIH</i> fusioniert mit <i>lux via</i> Sacl/KpnI | Diese Arbeit |
| pUTs- <i>rssR::lux</i> | pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) mit den letzten 500 bp von <i>rssR</i> (bzw. <i>ioIB</i>) fusioniert mit <i>lux</i> <i>via</i> Sacl/KpnI | Diese Arbeit |
| pUTs- <i>sseA::lux</i> | pUTs- <i>lux</i> (Cm ^R) mit den letzten 500 bp von <i>sseA</i> fusioniert mit <i>lux via</i> Sacl/KpnI | Diese Arbeit |
| pDEW201 | Promotor-Reporter-Vektor, <i>luxCDABE</i> , Amp ^R | (Van Dyk & Rosson, 1998) |
| pDEW201-P _{ioIE} | pDEW201 mit 321 bp der 5'-UTR von <i>ioIE</i> (<i>STM4424</i>) | (Kröger & Fuchs, 2009) |
| pDEW201-P _{srfJ} | pDEW201 mit 250 bp der 5'-UTR von <i>srfJ</i> (<i>STM4426</i>) | Diese Arbeit |
| pDEW201-P _{argS} | pDEW201 mit 244 bp der 5'-UTR von <i>argS</i> (<i>STM1909</i>) | (Kröger & Fuchs, 2009) |
| pDEW201-P _{sseA} | pDEW201 mit 400 bp der 5'-UTR von <i>sseA</i> | Diese Arbeit |
| pET28b(+) | Expressionsvektor, C-terminaler His6- Tag, T7 Promotor, <i>lacI</i> ; Kan ^R | Novagen, Madison, WI |

| | | |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| pET- <i>ioIR</i> | <i>ioIR</i> kloniert in pET28b für IoIR Überexpression und Aufreinigung | (Kröger & Fuchs, 2009) |
| pET- <i>ioIE/ioIG1</i> | <i>ioIE/ioIG1</i> wurde ohne Promotor via NcoI/XhoI in pET28b kloniert | Diese Arbeit |
| pBAD/HisA(Tet ^R) | Von pBAD/HisA abstammender, Arabinose-induzierender Expressionsvektor mit N-terminalem 6xHis-tag, TetR | (Starke <i>et al.</i> , 2013) |
| pBAD- <i>ssrB_c</i> | 3'-Ende von <i>ssrB</i> , das für die letzten 137 C-terminalen Aminosäuren kodiert, wurde via NcoI/KpnI in pBAD/HisA(Tet ^R) kloniert | Diese Arbeit |
| pBAD-Myc/His- <i>reiD</i> | Plasmid pBAD-Myc/His C für <i>reiD</i> Überexpression, kloniert via NcoI/HindIII | Diese Arbeit |
| pZE12- <i>luc</i> | Vektor trägt <i>colEI</i> und den konstitutiv aktiven Promotor PLLacO-1; Amp ^R | Expressys, Rülzheim, Germany |
| pZE-control | Nicht-kodierendes Fragment GCCTTAAGGTCTAG wurde in pZE12- <i>luc</i> kloniert | Diese Arbeit |
| pZE- <i>STnc1740</i> | <i>STnc1740</i> kloniert in pZE12- <i>luc</i> | Diese Arbeit |
| pZE- <i>rssR</i> | <i>rssR</i> (<i>STnc2160</i>) kloniert in pZE12- <i>luc</i> | Diese Arbeit |
| pStHfq-6H | <i>hfq</i> wurde mit eigenem Promotor und His6-Tag in pJV300 (stammt von pZE12- <i>luc</i> ab) kloniert | (Sittka <i>et al.</i> , 2007) |

¹ 5'-UTR (5' untranslatierte Region)

2.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA

- 1,5 ml ÜNK pelletieren (3 min, 13.200 rpm)
- Resuspendieren in 400 µl Lyse-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0)
- Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml in Lyse-Puffer)
- 15 min Inkubation auf Eis
- Zugabe von 10 µl 10 % SDS (10 % (w/v) SDS)
- Zugabe von 5 µl Proteinase K (10 mg/ml)
- Inkubation über Nacht bei 55 °C
- Präzipitation der DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol
- Entnahme der DNA mittels Pipettenspitze
- Waschen der DNA in 96 % (v/v) Ethanol
- Waschen der DNA in 70 % (v/v) Ethanol
- Pelletierung (3 min, 13.200 rpm)
- Lufttrocknung des Pellets bei 37 °C
- Resuspendieren in 1 ml H₂O
- Zugabe von 1 µl RNase A (10 mg/ml)
- Inkubation bei 37 °C, 30 min
- Konzentrationsbestimmung der DNA (siehe 2.3.3.1) und Lagerung bei -20 °C

2.3.2.2 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *GenElute™ Plasmid MiniPrep Kits* von Sigma-Aldrich nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA wurde immer mit 50 µl MilliQ-H₂O durchgeführt und anschließend bei -20 °C gelagert. Das Prinzip dieser Plasmidisolierung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzelle, gefolgt von einer Aufreinigung des Plasmids über eine Anionenaustauschersäule.

2.3.2.3 Präparation von RNA aus *S. Typhimurium*

Die Präparation von RNA erfolgt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Dabei wird das *TRIzol® RNA Isolationi Reagent* (Invitrogen) verwendet, das aus Phenol und Guanidin-Isouthiocyanat besteht. In der organischen Phase verbleiben DNA, Lipide und Proteine, wohingegen sich in der wässrigen Phase die RNA befindet. Da RNasen ubiquitär vorkommen und schwer zu inaktivieren sind, ist bei der Präparation von RNA große Vorsicht geboten. Es sind stets Latex-Handschuhe zu tragen und diese müssen regelmäßig ausgetauscht werden. Zudem ist in noch höherem Maße auf die Sauberkeit des Arbeitsplatzes und der verwendeten Utensilien zu achten. Sofern nicht anders

beschrieben, werden während der RNA-Präparation alle Gefäße und Lösungen auf Eis gelagert; die Zentrifugen sind auf 4 °C gekühlt. Da RNA sehr schnell degradiert werden kann, wurde mit DEPC-behandeltem MilliQ-H₂O gearbeitet, um jegliche RNasen zu inaktivieren:

- 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) in 1 l MilliQ-H₂O geben
- Über Nacht rührend bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
- Inaktivierung des DEPC durch zweimaliges Autoklavieren (20 min, 121 °C)

Die RNA-Präparation wird folgendermaßen durchgeführt:

- 50 ml Kulturlösung werden bei 4 °C für 1 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert.
- Das Zellpellet wird in 1 ml TRIzol® vollständig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.
- Die Lösung wird in die Phase-Lock-Tubes (Phase Lock Gel Heavy 2 ml, 5Prime, Hilden) überführt, 400 µl Chloroform hinzugegeben und für 10 s geschüttelt.
- Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 15 min bei 13.200 rpm
- Die wässrige Phase wird entnommen und mit 450 µl Isopropanol vermischt.
- Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation für 30 min bei 20 °C bei 13.200 rpm
- Überstand verwerfen und 350 µl 70 % Ethanol hinzugeben
- Zentrifugation für 10 min bei 13.200 rpm
- Überstand verwerfen, das Pellet trocknen und in 50 µl DEPC-H₂O aufnehmen
- Inkubation für 10 min bei 65 °C, dabei mehrmals mischen
- Lagern der RNA-Lösung bei -20 °C

Um die verbliebene DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen, wird der DNase-Verdau folgendermaßen zweimal hintereinander durchgeführt:

- Die Konzentration der RNA-Lösung wird mit DEPC-H₂O auf 0,5 µg/µl eingestellt.
- 80 µl der Lösung werden für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis für 5 min abgekühlt.
- Danach werden 10 µl 10x DNase I-Puffer mit MgCl₂ (Thermo Fischer Scientific) und 10 µl DNase I (1U/µl) (Thermo Fischer Scientific) hinzugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert.
- Es werden 100 µl Roti-Aqua-P/C/I (Carl Roth) in ein Phase-Lock-Tube vorgelegt, der RNA-Ansatz hinzugegeben und für 15 s vermischt.
- Zentrifugation für 12 min bei 15 °C und 13.200 rpm

- Die wässrige Phase wird entnommen, mit dem 2,5-fachen Volumen der Präzipitationslösung (30:1 Gemisch von Ethanol mit 3 M Na-Acetat) vermischt und über Nacht bei -20 °C präzipitiert.
- Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 13.200 rpm
- Überstand verwerfen und Waschen des Pellets mit 350 µl 75 % Ethanol
- Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13.200 rpm
- Überstand verwerfen und Pellet trocknen
- Aufnehmen des Pellets in 40 µl DEPC-H₂O und Inkubation für 5 min bei 65 °C, dabei mehrmals mischen
- Der Erfolg des DNase-Verdau wird durch eine Standard-PCR mit negativem Befund, also ohne PCR-Produkt, bestätigt. Die Reinheit und Konzentration der RNA wird ebenso analysiert (2.3.3.1).

2.3.3 Analyse von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Parameter Konzentration und Reinheit von in Wasser gelöster DNA und RNA wurden mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers (ND-1000, Thermo Scientific) gemessen. Das Absorptionsmaximum A von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Zusätzlich wird die maximale Protein-Absorption A bei 280 nm bestimmt. Der Quotient von A_{260}/A_{280} ergibt somit den Reinheitsgrad, der bei DNA bei 1,8 und bei RNA bei 2,0 liegen sollte. Abweichungen davon weisen auf Kontaminationen mit Proteinen, Zuckern, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hin.

2.3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel wird die DNA nach ihrer Länge bzw. ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch den Vergleich mit einem Längenmarker kann die Größe eines Fragmentes bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde dazu *GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10.000 bp* (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Für die Auftrennung wurden 0,7-2 %-ige Agarosegele verwendet, die mit 1x TAE-Puffer hergestellt wurden. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fischer Scientific) im Verhältnis 1:5 vermischt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 5 -120 V (Electrophoresis Power Supply EPS 500/400, Pharmacia Biotech) für 30-60 min in 1x TAE-Puffer. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel zur Visualisierung der DNA für 10-20 min in einer GelRed™-Lösung gefärbt. Die DNA-Banden wurden anschließend in einem UV-Transilluminator (ImageMaster® VDS, GE Healthcare) visualisiert.

1x TAE-Puffer

20 mM Tris-Base

1 mM EDTA

Mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen

GelRed™-Färbelösung

GelRed™ (Biotium) 1:10.000 in Elix-Wasser

2.3.3.3 Northern Blot

Der Northern Blot dient dazu, RNA spezifisch und semiquantitativ zu detektieren. Dazu wurde das *DIG Northern Starter Kit* (Roche) verwendet. Wasser, das während der gesamten Prozedur in Kontakt zu RNA kommt, wurde zuvor stets mit DEPC behandelt (siehe 2.3.2.3).

- Herstellung des 7 %-igen Polyacrylamid-Gels (PAA) mit 8,3 M Harnstoff:

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| 3,5 ml | 30 % Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) |
| 1,3 ml | DEPC-H ₂ O |
| 10 ml | 12,45 M Harnstofflösung |
| 150 µl | 10 % APS (A mmonium p eroxodisulfat, frisch!) |
| 15 µl | TEMED (N,N,N',N'- T etramethylethylendiamin) |
- RNA Proben in 1x RNA Auftragepuffer bei 65 °C für 10 min inkubieren
- 5 µg der RNA auf das Gel auftragen
- 10 µl des *Low Range ssRNA Ladders* (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) auftragen
- Gelelektrophorese bei 120 V in 1x TBE_{DEPC}-Puffer bei Raumtemperatur durchführen
- Die RNA wird mittels des *Semi-Dry-Blotters* (Pegasus, PHASE, Lübeck) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare, Amersham, UK) transferiert und mittels Transilluminators (Fluo-Link) durch UV-Strahlen fixiert (30 s, 0,3 J/cm²).
- Membran in auf 62 °C vorgewärmtem *DIG Easy Hyb granules*-Puffer 1 h unter ständiger Bewegung vorhybridisieren
- 5 µl der *Riboprobe* (RNA-Sonde) werden für 5 min bei 95 °C denaturiert, danach für 5 min auf Eis gestellt und der vorhybridisierten Membran hinzugegeben.
- Die Hybridisierung findet über Nacht unter ständiger Bewegung statt.

- Danach wird der Hybridisierungspuffer verworfen und die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit Stringenzpuffer 1 und anschließend für zweimal 15 min mit Stringenzpuffer 2 gewaschen.
- Waschen der Membran für 5 min in Waschpuffer
- Inkubation der Membran für 30 min in 1x Blockpuffer
- Der Anti-DIG-Antikörper wird 1:10.000 in 1x Blockpuffer verdünnt und mit der Membran für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wird die Membran für zweimal 15 min in Waschpuffer gewaschen.
- Inkubation der Membran für 5 min in Detektionspuffer
- Danach wird die Membran mit CDP-Star-Lösung bedeckt und für 5 min in Dunkelheit inkubiert.
- Die Membran wird in Frischhaltefolie eingeschlagen und die Lumineszenzsignale mittels Fotofilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Amersham, UK) detektiert.

Herstellung der *riboprobe*

- Zu hybridisierenden Nukleotidsequenz wird mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Dabei enthält der Primer, der an den minus-Strang bindet, die RNA-Polymerase-Promotorsequenz.
- *In vitro* Transkription der DIG-markierten Sonde
 - o 10 µl des PCR-Produkts (20 ng/µl) werden mit 4 µl 5x *labelling buffer*, 4 µl 5x *transcription buffer* und 2 µl *T7 polymerase* vermischt.
 - o Inkubation für 1 h bei 42 °C
 - o Zugabe von 2 µl DNase I
 - o Inkubation für 15 min bei 37 °C
 - o Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0), um die Reaktion zu stoppen
 - o Die *riboprobe* kann bei -20 °C gelagert werden.

Folgende Puffer wurden verwendet:

2x SSC-Puffer

| | |
|-------|----------------|
| 0,3 M | NaCl |
| 30 mM | Natrium-Citrat |

Stringenzpuffer 1

2x SSC
0,1 % SDS

Stringenzpuffer 2

0,5x SSC
0,1 % SDS

Maleinsäurepuffer

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
Einstellen auf pH 7,5 mit NaOH-Pellets

Waschpuffer

Maleinsäurepuffer
0,3 % Tween-20

Blockpuffer

Maleinsäurepuffer
1:10 Blocking-Pulver

Detektionspuffer

0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
Einstellen auf pH 9,5

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**2.3.4.1 Standard PCR**

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) ist eine molekularbiologische Technik zur exponentiellen und selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Basis dieser Technik ist eine hitzestabile DNA-Polymerase, ein DNA-Template sowie ein zum Template komplementäres Primerpaar. Als Template diente hierbei chromosomale DNA (~100 ng), Plasmid-DNA (~50 ng) oder 6 µl einer in 100 µl

MilliQ-H₂O resuspendierten Einzelkolonie („Kolonie-PCR“). Ein 50 µl-PCR-Ansatz besteht aus:

| | |
|---------|---------------------------------|
| 37,5 µl | PCR-Mastermix |
| 1-10 µl | MilliQ-H ₂ O |
| 1 µl | Primer 1 (10 pmol) |
| 1 µl | Primer 2 (10 pmol) |
| 10-1 µl | Template |
| 0,5 µl | <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl) |

Der PCR-Mastermix besteht aus:

| | |
|---------|-------------------------------------------|
| 27,5 µl | MilliQ-H ₂ O |
| 5 µl | 10x Puffer Thermo Prime (ABGene) |
| 2 µl | dNTP Mix 20 mM (Thermo Fisher Scientific) |
| 3 µl | 25 mM MgCl ₂ |

Die verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind Tab. S1 im Anhang zu entnehmen.

Die Amplifizierung erfolgte in PCR-Cyclern (Biometra Uno II) unter folgenden Bedingungen (Tab. 8):

Tab. 8: Prozessschritte im Thermocycler bei der Standard-PCR

| Vorgang | Anzahl | Temperatur und Dauer |
|------------------------|-----------|--------------------------------|
| Initiale Denaturierung | 1 x | 95 °C, 5 min |
| Denaturierung | | 95 °C, 10 s |
| Annealing | 30 Zyklen | 55 °C*, 30 s |
| Elongation | | 72 °C, t _{Elongation} |
| Finale Elongation | 1 x | 72 °C, 8 min |

*Standard-Temperatur. Siehe im folgenden „Annealing“. t_{Elongation} entspricht der Dauer der Elongation entsprechend der Länge des PCR-Produktes in min: 1 kb = 1 min.

In den einzelnen PCR-Schritten geschieht Folgendes:

Denaturierung: Die doppelsträngige DNA (dsDNA, **double strand DNA**, Doppelstrang DNA) wird in zwei Einzelstränge (ssDNA, **single strand DNA**, Einzelstrang DNA) aufgeschmolzen.

Annealing: Die Primer lagern sich spezifisch an die ssDNA an. Die Temperatur wurde dabei standardmäßig bei 55 °C gewählt. Nur in Ausnahmefällen wurde davon unter Nutzung des Programms „OligoAnalyzer 3.1“ (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) abgewichen.

Elongation: Die *Taq*-DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang in 5'-3'-Richtung durch komplementäre Anlagerung der Nukleotide. Die Elongationszeit wurde abhängig von der zu amplifizierenden Fragmentlänge festgelegt. Dabei wurde pro 1 kb eine Minute Elongationszeit gewählt, da die *Taq*-DNA-Polymerase ca. 1 kb pro Minute synthetisieren kann.

Zur Erfolgskontrolle wurde nach der PCR 5 µl des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (siehe 2.3.3.2).

2.3.4.2 Quantitative real-time-PCR

Im Unterschied zur Standard-PCR ermöglicht es die qRT-PCR (**quantitative real-time PCR**, quantitative Echtzeit PCR), die während der Kettenreaktion amplifizierten DNA-Moleküle in Echtzeit zu detektieren. Dadurch können Rückschlüsse auf die relative Anzahl spezifischer DNA-Fragmente in einer Probe und somit auf die mRNA-Expression des jeweiligen Gens gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRTM Green (Quanta Biosciences, Gaithersburg, Maryland, USA) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert sehr spezifisch in die kleine Furche der dsDNA, wodurch er ca. 1.000-mal stärker als nicht gebundener Farbstoff nach der Anregung fluoresziert. Da SYBRTM Green jedoch nicht nur an die spezifisch während der PCR amplifizierte DNA bindet, sondern auch z. B. an unspezifische Primerdimere, wird als letzter Schritt die Temperatur auf 97 °C erhöht. Bei der Temperatur, bei der die dsDNA in zwei Einzelstränge denaturiert, ist ein starkes Absinken der Fluoreszenz messbar. Grund hierfür ist der Abfall des interkalierenden SYBRTM Greens von der DNA.

Die isolierte RNA (siehe 2.3.2.3) wird mittels der Reversen Transkriptase des *qScriptTM cDNA Super Mix* (Quanta BioSciences, Beverly, USA) in cDNA (**complementary DNA**, komplementäre DNA) umgeschrieben. Der Reaktionsansatz wird folgendermaßen angesetzt:

| | |
|---------|-----------------------------------------------|
| 1-15 µl | RNA (1 µg) |
| 4 µl | 5x <i>qScriptTM cDNA Super Mix</i> |
| 15-1 µl | DEPC-H ₂ O |

Für die Reaktion (Tab. 9) enthält der *qScriptTM cDNA Super Mix* bereits einzelsträngige Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz, die als randomisierte Primer fungieren.

Tab. 9: Prozessschritte zur cDNA-Synthese

| Vorgang | Temperatur | Dauer |
|-----------------------|------------|--------|
| Annealing | 25 °C | 5 min |
| Reverse Transkription | 42 °C | 30 min |
| Denaturierung | 85 °C | 5 min |

Nach der cDNA-Synthese wird der Ansatz mit 80 µl DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

Das Primerdesign für qRT-PCR-Primer erfolgt mit Hilfe der Software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012). Als Grenzwerte für die Primer werden dabei die Schmelztemperatur (54,5 °C ± 0,5 °C), der GC-Gehalt (40-60 %), die Anzahl der Nukleotide (20 nt bis 23 nt) sowie die Länge der zur amplifizierenden DNA-Sequenz (120 bis 150 bp) festgelegt. Für die qRT-PCR-Analysen wird PerfeCTa SYBR Green Fast-Mix (Quanta Biosciences, Gaithersbury, USA) und der SmartCycler (Peqlab, Erlangen) verwendet. Dabei wird nach Angabe des Herstellers vorgegangen und jede Messung als Duplikat durchgeführt:

| | |
|-------|-----------------------------------------------------------------|
| 10 µl | Reaktionsmix PerfeCTa SYBR Green FastMix |
| 5 µl | cDNA (50 ng) oder 5 µl DEPC-H ₂ O (Negativkontrolle) |
| 1 µl | Primer I |
| 1 µl | Primer I |
| 3 µl | DEPC-H ₂ O |

Bei der Messung des Referenz-RNA 16S rRNA wird die cDNA vor Zugabe zum qRT-PCR-Ansatz 1:10⁻² verdünnt.

Folgendes Programm des SmartCyclers wird verwendet (Tab. 10):

Tab. 10: Programm des SmartCyclers.

| Vorgang | Anzahl | Temperatur & Dauer |
|------------------------|-----------|---------------------------|
| Initiale Denaturierung | 1 x | 95 °C, 10 min |
| Denaturierung | | 95 °C, 20 s |
| Annealing | 40 Zyklen | 55 °C, 30 s |
| Elongation | | 72 °C, 30 s |
| Schmelzkurve | 1 x | 53 °C bis 97 °C; 0,2 °C/s |

Die qRT-PCR kann entweder zur relativen oder zur absoluten Quantifizierung von cDNA-Transkripten genutzt werden. Die absolute Quantifizierung der Transkriptmenge ist aufwendig, liefert aber exakte Werte über die tatsächliche Anzahl der Transkripte. Dagegen beziehen sich die Messwerte der relativen Quantifizierung auf die Menge eines speziellen Kontrollgens. Von diesem Kontrollgen sollten zu jeder Zeit und zu jeder Bedingung, der die Zelle ausgesetzt sein kann, in etwa gleich viele mRNA-Transkripte in jeder Zelle vorliegen. Daher eignen sich die s. g. Haushaltsgene dafür besonders gut. In der vorliegenden Arbeit wurde die 16S rRNA als Referenztranskript verwendet, auf dessen Menge in der jeweiligen Probe sich die analysierten Transkriptmengen anderer Gene beziehen. Um die Unterschiede zwischen einzelnen Proben zu berechnen und die jeweilige Primereffizienz mit in die Berechnung aufzunehmen, wird die REST-Software verwendet (**Relative Expression Software Tool**) (Pfaffl *et al.*, 2002). Die Expressionsunterschiede werden mit ihren Signifikanzlevels ausgegeben und die unterschiedliche Genexpression wird als $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert angegeben.

2.3.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte werden mit Hilfe des *QIAquick PCR-purification-Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 μl 37 °C warmem MilliQ-H₂O eluiert.

PCR-Ansätze, die neben dem gewünschten Fragment auch noch weitere unspezifische Fragmente enthalten, und restringierte Plasmide werden in einem präparativen Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und diese Gele gefärbt (siehe 2.3.3.2). Die entsprechenden Banden werden dann aus dem Gel geschnitten und in dem Puffer QG des Kits gelöst, bevor die Aufreinigung der Fragmente nach Herstellerangaben erfolgt. Hierbei wird das Fragment mit 50 μl 37 °C warmem MilliQ-H₂O von den Säulen eluiert.

2.3.5 Bestimmung des Transkriptionsstarts

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts der mRNA *reiD* wird die 5'-RACE verwendet (**R**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds, *schnelle Amplifikation von cDNA-Enden*). Dazu wird RNA isoliert (siehe 2.3.2.3) und cDNA mit Hilfe des spezifischen *revers*-Primers GSP1 (**G**enspezifischer **P**rimers) bis zum 5'-Ende der mRNA synthetisiert (siehe 2.3.4.2). Danach wird die RNA hydrolysiert und das cDNA-Fragment in der *tailing*-Reaktion am 3'-Ende mit dATP oder dCTP durch die **T**erminale **D**esoxynucleotidyl **T**ransferase (TDT; Thermo Fischer Scientific) ergänzt. Im Anschluss daran werden die komplementären Stränge der beiden cDNAs mittels der Primer GSP2 und A-AAP bzw. C-AAP (**A**bridged **A**nchor **P**rimers, verkürzter Anker Primer) in einer PCR synthetisiert. Die PCR-Produkte werden dann als Template in einer folgenden *nested*-PCR (verschachtelte PCR) mit den Primern GSP3 und A-AUAP bzw. C-AUAP (**A**bridged **U**niversal **A**mplification **P**rimers, verkürzter universeller Amplifikationsprimer) verwendet.

Die Durchführung gestaltete sich folgendermaßen (Tab. 11):

Tab. 11: Prozessschritte der 5'-RACE.

cDNA-Synthese

| | |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| 5 µg | RNA |
| 2,5 pmol | GSP1-Primer |
| ad. 13 µl | DEPC-H ₂ O |
| Denaturieren der RNA durch 1 min bei 70 °C | |
| 1 min auf Eis abkühlen | |

Zugabe von:

| | |
|--------|----------------------------------------------------|
| 5 µl | 5x Reaktionspuffer (Invitrogen) |
| 2,5 µl | 25 mM MgCl ₂ |
| 1 µl | 10 mM dNTP-Mix |
| 2,5 µl | 0,1 mM Dithiothreitol (DTT) |
| 1 µl | Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) |

Inkubation im Thermocycler mit folgendem Programm:

| | |
|--------|--------------------------------------------------------|
| 50 min | 45 °C (<i>cDNA-Synthese</i>) |
| 5 min | 85 °C (<i>Stopp der cDNA-Synthese</i>) |
| | Zugabe von 2 µl RNase A (500 µg/ml; Roche Diagnostics) |
| 45 min | 37 °C (<i>Abbau der RNA durch RNase A</i>) |

Um dNTPs und den Primer GSP1 aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wird das *QIAQuick PCR Purification-Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet (siehe 2.3.4.3). Das aufgereinigte cDNA-Fragment dient als Template für die anschließende *tailing*-Reaktion, bei der in zwei separaten Reaktionsansätzen eine poly-dA- oder poly-dC-Sequenz an das 3'-Ende der cDNA synthetisiert wird (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Prozessschritte der *tailing*-Reaktion.

tailing-Reaktion

| | |
|---------------|----------------------------------------|
| 1 µl | cDNA |
| 4 µl | 5x Reaktionspuffer (Thermo Scientific) |
| 1,3 µl/0,6 µl | dATP bzw. dCTP (0,1 mM) |
| 1,5 µl | TDT |
| Ad 20 µl | MilliQ-H ₂ O |
| 15 min | 37 °C (<i>tailing</i> -Reaktion) |
| 10 min | 70 °C (<i>Denaturierung der TDT</i>) |

An die *tailing*-Reaktion schließt sich eine Aufreinigung der beiden cDNAs (poly-A bzw. poly-C) mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification-Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben an. Jeweils 5 µl dieser Fragmentlösungen werden dann in einer nachfolgenden PCR als Templates eingesetzt (Tab. 13). Dabei werden die Primer GSP2 und A-AAP bzw. C-AAP verwendet. GSP2 bindet dabei an eine im Vergleich zum GSP1 eingerückte Position der cDNA und A-AAP bzw. C-AAP binden an dem A- bzw. C-Terminus.

Tab. 13: Prozessschritte zur Amplifizierung der 5'-RACE-Produkte.

| Vorgang | Anzahl | Temperatur & Dauer |
|------------------------|-----------|--------------------|
| Initiale Denaturierung | 1 x | 95 °C, 3 min |
| Denaturierung | | 95 °C, 30 s |
| Annealing | 30 Zyklen | 49 °C, 30 s |
| Elongation | | 72 °C, 1 min |
| Finale Elongation | 1 x | 72 °C, 3 min |

Die PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.3.3) und aus dem Gel eluiert (siehe 2.3.4.3). Danach werden die beiden jeweiligen PCR-Fragmente in einer zweiten PCR als Template eingesetzt, wobei die Primer GSP3 und A-AUAP bzw. C-AUAP verwendet werden. Das Programm des PCR-Cyclers wird identisch zur vorangegangenen PCR gewählt. Die beiden dabei synthetisierten 5'-RACE-Produkte werden auf einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und aus diesem eluiert (siehe 2.3.4.3). Die so aufgereinigten DNA-Fragmente werden bei GATC Biotech AG sequenziert und so der Transkriptionsstart bestimmt.

2.3.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.3.6.1 Spezifische Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme wurden von Thermo Scientific bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Ein Standard-Restriktionsverdau wird nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tab. 14):

Tab. 14: Prozessschritte des Standard-Restriktionsverdaus.

| | |
|-----------|-----------------------------------------------|
| 2 µl | 10x Puffer entsprechend des jeweiligen Enzyms |
| 1 µg | DNA |
| 1 µl | Restriktionsendonuklease (10 U/µl) |
| ad. 20 µl | MilliQ-H ₂ O |
| 37 °C | 4 h (<i>Restriktionsverdau</i>) |
| 80 °C | 20 min (<i>Inaktivierung des Enzyms</i>) |

Im Anschluss an den Restriktionsverdau wird das DNA-Fragment entweder mit dem *QIAquick PCR Purification-Kit* aufgereinigt oder über ein präparatives Gel aufgetrennt und die entsprechende DNA-Bande aufgereinigt (2.3.4.3).

In folgender Tab. 15 sind die in der vorliegenden Arbeit häufig verwendeten Restriktionsendonukleasen dargestellt.

Tab. 15: Häufig verwendete Restriktionsendonukleasen.

| Enzym | Restriktionsschnittstelle | Puffer |
|---------|---------------------------|------------------|
| EcoRI | GAATTC | 10x EcoRI-Puffer |
| HindIII | AAGCTT | 10x Puffer R |
| KpnI | GGTACC | 10x KpnI-Puffer |
| NcoI | CCATGG | 10x Puffer Tango |
| PstI | CTGCAG | 10x Puffer O |
| SacI | GAGCTC | 10x SacI-Puffer |
| XbaI | TCTAGA | 10x Puffer Tango |
| XhoI | CTCGAG | 10x Puffer R |

2.3.6.2 Ligation

DNA-Ligasen ligieren zwei DNA-Stränge miteinander, indem sie diese mit einer Phosphor-Diesterbindung kovalent verbinden. Diese Eigenschaft wird z. B. genutzt, um ein Ziel-DNA-Fragment in ein Plasmid zu integrieren.

Ein Standard-Ligationsansatz wird nach folgendem Protokoll (Tab. 16) durchgeführt:

Tab. 16: Prozessschritte der Standard-Ligation.

| | |
|-----------|-----------------------------------------|
| 4 µl | 5 x T4-Ligase-Puffer (Invitrogen) |
| 100 ng | linearisierte Plasmid-DNA |
| 300 ng | DNA-Fragment (<i>Insert</i>) |
| 1 µl | T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Invitrogen) |
| ad. 20 µl | MilliQ-H ₂ O |
| 16 °C | über Nacht (<i>Ligationsreaktion</i>) |

2.3.7 DNA-Transfer

2.3.7.1 Konjugation

Unter Konjugation versteht man die Übertragung von genetischem Material von einer Bakterienzelle (Donor) auf eine andere (Rezipient) durch den direkten Zell-Zell-Kontakt. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit der mobilisierbare Suizidvektor pUTs-*lux* (Cm^R) sowie dessen Derivate von *E. coli* SM10 λ *pir* (Kan^R) auf den Rezipienten *S. Typhimurium* 14028 (Str^R) transferiert. Dazu wurde die Methode der Plattenkonjugation verwendet:

Der Donor- sowie der Rezipientenstamm werden jeweils auf Selektivagar flächig ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wird der Zellrasen des Donorstamms mit einer Impföse abgenommen und auf einer etwa münzgroßen Fläche auf LB-Agar ausgestrichen. Dann wird die etwa vierfache Menge des Rezipienten abgenommen und mit dem Donor auf dem LB-Agar vermischt. Während der folgenden sechs Stunden Inkubation findet die Konjugation statt. Danach wird der Zellrasen der beiden gemischten Stämme in 1 ml LB-Medium resuspendiert und je 100 μ l der Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} und 10^{-2} auf Selektivagar (Cm^R, Str^R) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Unter anhaltendem Selektionsdruck werden die gewachsenen Kolonien vereinzelt und mit PCR auf die korrekte Integration des Suizidplasmid in das Genom von *S. Typhimurium* 14028 überprüft.

2.3.7.2 Transformation

Damit die in dieser Arbeit verwendeten Prokaryoten, *E. coli* und *S. Typhimurium*, freie DNA aufnehmen, wird die Methode der Elektroporation verwendet. Dazu werden die Zellen zuerst elektrokompotent gemacht und im Anschluss daran transformiert.

Herstellung elektrokompentener Zellen

Eine ÜNK des jeweiligen Stammes wird 1:20 in 200 ml LB-Medium, supplementiert mit entsprechendem Antibiotikum, gegeben und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte im Bereich von 0,4 bis 0,6 werden die Zellen bei 6.000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 50 ml 5 %-igem und auf Eis gelagertem Glycerin resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird insgesamt zwei Mal durchgeführt. Im Anschluss daran werden die Zellen in 5 ml 10 %-igem eiskaltem Glycerin resuspendiert, zu je 40 μ l aliquotiert und bis zur Elektroporation bei -80 °C gelagert.

Elektroporation

Die Aliquots werden auf Eis aufgetaut, mit 40 µl sterilem MilliQ-H₂O vermischt und die zu transformierende DNA hinzugegeben. Der Ansatz wird in sterile und vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand, Peqlab) überführt und im Elektroporator (Gene Pulser, BioRAD) einem Spannungspuls ausgesetzt. Die Einstellungen des Gene Pulsers sind: Kapazität 25 µF, Parallelwiderstand 200 Ω und 12,5 kV/cm Spannung. Der Ansatz wird sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Danach wird der Transformationsansatz auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.8 Genetische Modifikation von *S. Typhimurium*

2.3.8.1 Herstellung von Deletionsmutanten

Gendeletionen wurden in der vorliegenden Arbeit mit der Methode nach DATSENKO und WANNER (Datsenko & Wanner, 2000) durchgeführt. Der Kern dieser Methode ist die homologe Rekombination zwischen einer durch PCR konstruierten Resistenzkassette und einer definierten Genomsequenz. Diesen Austausch ermöglicht dabei das Rekombinationssystem des Phagen λ, das auf dem Plasmid pKD46 kodiert ist. Dieses wird für die Reaktion in die Zellen transformiert, um das Rekombinationssystem zu exprimieren.

Um ein Gen in *S. Typhimurium* 14028 zu deletieren, wird eine PCR mit speziellen Primern und dem Plasmid pKD4 durchgeführt. Auf diesem Plasmid ist eine Kanamycin-Resistenzkassette kodiert, die von Erkennungssequenzen einer Flippase (FLP)-Rekombinase flankiert wird. Diese Sequenzen wiederum flankierend binden die speziellen ca. 70 nt langen Primer mit ca. 20 nt ihres 3'-Endes. Die übrigen ca. 50 nt sind jeweils homolog zu den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens. Dieses PCR-Produkt wird in die *S. Typhimurium* 14028 Zellen transformiert, die das Plasmid pKD46 enthalten und die seit der Transformation mit diesem Plasmid bei 30 °C kultiviert und mit 1 mM L-Arabinose induziert wurden. Nach der Transformation des PCR-Produkts werden die Zellen für eine Stunde bei 30 °C und 180 rpm inkubiert, anschließend auf LB-Agar mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien werden am nächsten Tag unter Selektionsdruck vereinzelt und am darauf folgenden Tag mittels Kolonie-PCR auf den korrekten Austausch der Gensequenz gegen die Resistenzkassette hin überprüft. Durch das mehrfache Passagieren der Zellen bei 37 °C wird pKD46 aus den Zellen entfernt, da dieses Plasmid, wie auch das in einem nachfolgenden Schritt verwendete Plasmid

pCP20, einen temperatursensitiven ORI (*origin of replication*, Replikationsursprung) hat. Die Eliminierung der Plasmide ist bestätigt, sobald die Zellen nicht mehr resistent gegen Ampicillin bzw. Chloramphenicol sind.

Da das Rekombinationssystem des Phagen λ nicht nur die gewünschte homologe Rekombination zwischen PCR-Produkt und zu deletierendem Gen katalysiert, sondern auch zu weitreichenden Rekombinationen innerhalb des Chromosoms von 14028 führen kann, wurde eine Phagentransduktion durchgeführt. Dazu werden die Zellen, bei denen das Zielgen gegen die Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde, mit dem Phagen P22 infiziert. Das entstehende Phagenlysat wird verwendet, um den 14028 Wildtyp zu infizieren. Dadurch kommt es zu einem einmaligen Rekombinationsereignis in den Zellen und es kann in einem zweiten Schritt auf die übertragene Kanamycin-Resistenz selektiert werden. Aus den so erhaltenen Deletionsmutanten muss in einem dritten Schritt die Kanamycin-Resistenzkassette entfernt werden. Dazu werden diese mit dem Plasmid pCP20 transformiert, das neben einer Chloramphenicol-Resistenz auch für eine FLP-Rekombinase kodiert. Diese rekombiniert die beiden FRT-Erkennungssequenzen miteinander, die die Kanamycin-Resistenzkassette flankieren, sodass das Resistenzgen aus dem Genom entfernt wird. pCP20 wird im Anschluss daran mittels Kultivierung bei 37 °C aus dem Stamm entfernt. Der Erfolg der vollständigen Gendeletion wird nochmals mittels PCR und Sequenzierung bestätigt (siehe 2.3.9).

2.3.8.2 Herstellung von chromosomalen Reporterstämmen

Um die transkriptionelle Aktivität von Genen oder Genabschnitten zu quantifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit chromosomale Transkriptionsfusionen mit den Reporter genen *luxCDABE* hergestellt. Diese Genkassette kodiert für fünf Gene, die zusammen autark, also ohne Zugabe von weiteren Substraten, Licht emittieren können. Dadurch eignet sich dieses Konstrukt zur kontinuierlichen Messung der Genexpression einer Zellpopulation über verschiedene Wachstumsphasen hinweg. In Abhängigkeit von ATP (**A**denosin**T**riphosphat) katalysiert die Luciferase die oxidative Decarboxylierung von Luciferin, wodurch Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm emittiert wird (de Wet *et al.*, 1987). Die Intensität des gemessenen Lichts ist dabei proportional zu der Genexpression, sodass die Expressionen verschiedener Gene oder die Expression eines Genes unter verschiedenen Kulturbedingungen in Relation gesetzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Promotorfusionen (Transkriptionale Reporter) als auch Fusionen an dem 3'-Ende der Zielgene (Posttranskriptionale Reporter) hergestellt.

Zur Herstellung der Reporterstämme in *E. coli* und in *S. Typhimurium* wurde das Suizidplasmid pUTs-*lux* (Cm^R) (Starke *et al.*, 2013) verwendet, das mittels homologer Rekombination gezielt in das Genom der Zellen integriert. Dazu werden die 500 bp vor der Translationsstartsequenz oder vor dem Translationsstopp in einer PCR (2.3.4.1) amplifiziert und aufgereinigt (2.3.4.3). Diese DNA-Fragmente werden dann mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *KpnI* verdaut (2.3.6.1), in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor pUTs-*lux* ligiert (2.3.6.2) und in *E. coli* SM10 transformiert (2.3.7.2). Die dabei erhaltenen Chloramphenicol-resistenten Kolonien werden unter beständigem Selektionsdruck vereinzelt und mittels PCR auf das Vorhandensein des korrekten Suizidplasmids getestet. Bei der sich anschließenden Konjugation (2.3.7.1) wird das Plasmid in den Empfängerstamm übertragen. Die erhaltenen Exkonjuganten werden auf LB-Agar mit Chloramphenicol und Streptomycin (*S. Typhimurium* 14028 als Reporterstamm) oder Tetracyclin (*E. coli* XL-1 Blue als Reporterstamm) kultiviert. Die korrekte Integration des Plasmids wird mittels PCR überprüft.

2.3.9 Sequenzierung von DNA

Die Konzentration der DNA-Fragmente wird zur Sequenzierung auf 80 bis 100 ng/μl (Plasmid-DNA) oder 20 bis 80 ng/μl (PCR-Produkt) eingestellt. Davon werden 5 μl mit 5 μl Primer (5 pmol/μl) gemischt und die Proben an die GATC Biotech AG (Konstanz) geschickt. Die von GATC übermittelten Sequenzen werden dann mit den *in silico* erzeugten Konstrukten abgeglichen, wobei die Software CloneManager und BioEdit (siehe 2.3.10) genutzt werden.

2.3.10 Bioinformatische Methoden

In Tab. 17 sind die verwendeten bioinformatischen Programme aufgeführt:

Tab. 17: Verwendete bioinformatische Software.

| Name | Zweck | Herkunft |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| CloneManager Professional Suite, Version 8.03 | <i>In silico</i> Konstruktion von DNA- und Protein-Sequenzen | Scientific & Educational Software |
| BioEdit Version 7.1.9 | Homologievergleich von DNA- und Proteinsequenzen | Ibisi Biosciences |

| | | |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BLAST-Server (Basic Local Alignment Search Tool) | Homologievergleich von DNA- und Proteinsequenzen | NCBI (National Center for Biotechnology Information), (Altschul <i>et al.</i> , 1990, Altschul <i>et al.</i> , 1997)) |
| BPROM | Vorhersage putativer bakterieller Promotoren | www.softberry.com |
| RNAhybrid | Vorhersage von sRNA/RNA Interaktionen | (Rehmsmeier <i>et al.</i> , 2004) |
| Mfold | Berechnung der Sekundärstruktur von RNA | (Zuker, 2003) |
| sRNATarget 2.0 | Vorhersage putativer sRNA-Ziele | http://ccb.bmi.ac.cn/srna-target2/prediction.php |
| TraDis | Datenbank zur Genregulation während des Infektionsgeschehens in diversen Tiermodellen | http://www-tradis.vet.cam.ac.uk |
| ARNold: finding terminators | Vorhersage Rho-unabhängiger Transkriptionsterminatoren | http://rna.igmors.upsud.fr/toolbox/arnold |
| OligoAnalyzer 3.1 | Vorhersage der optimalen Annealing-Temperatur für Primer | http://eu.idtdna.com/calc/analyz |
| Primer3 | Primerdesign für qRT-PCR-Primer | (Untergasser <i>et al.</i> , 2012) |

2.3.11 Quantifizierung der Biolumineszenz

Zur Quantifizierung der Genexpression werden die *luxCDABE*-Gene als chromosomales Reportersystem verwendet (siehe 2.3.8.2). Dabei ist die Stärke des Lichtsignals proportional zur Expression des Gens. Das Lichtsignal wird dabei mit Hilfe des Mikrotiterplattenlesers Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, Waltham, USA) detektiert. Dazu werden ÜNK der zu messenden Reporterstämme unter Selektionsdruck in LB-Medium angesetzt, wobei pro Stamm jeweils drei biologische Replikate verwendet werden. Am folgenden Tag werden diese Kulturen 1:1.000 in dem entsprechenden Kulturmedium verdünnt und pro biologischem Replikat je drei Kavitäten einer weißen Mikrotiterplatte (μ Clear-Plate, Greiner Bio-One)

mit 200 µl der Kultur belegt. Die Mikrotiterplatten werden bei 37 °C je bei 800 rpm schüttelnd inkubiert. Dabei werden stündlich die optische Dichte und die Biolumineszenz der Zellen gemessen, bis die Kulturen die stationäre Phase erreichen.

Sofern die Biolumineszenz von *S. Typhimurium*-Reporterstämmen in MI-Medium gemessen werden soll, werden die in LB-Medium angesetzten ÜNK 1:1.000 in 10 ml MI-Medium verdünnt und in 15 ml Greiner-Röhrchen bei 37 °C stehend inkubiert. Sobald die Zellen in die logarithmische Wachstumsphase (log-Phase) übergehen, werden pro biologisches Replikat je drei Kavitäten einer weißen Mikrotiterplatte mit 200 µl der Kultur belegt. Die Mikrotiterplatten werden dann bei 37 °C stehend inkubiert und alle zwei Stunden die optische Dichte sowie die Biolumineszenz der Zellen gemessen, bis die Kulturen die stationäre Phase erreicht haben.

2.3.12 Herstellung von rekombinanten Plasmiden zur Überexpression von sRNA

Zur konstitutiven Überexpression von sRNA wird das Plasmid pZE12-*luc* (Expressys, Rülzheim, Deutschland) (siehe Tab. 7) nach der Methode von URBAN UND VOGEL verwendet (Urban & Vogel, 2007). Dafür wird eine PCR (2.3.4.1) mit den Primern PLLacoB und PLLacoD (siehe Tab. S1) durchgeführt, wobei pZE12-*luc* als Template dient. Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und anschließend mit XbaI verdaut, was in zwei Produkten mit ~2,2 kb und 1,7 kb resultiert (2.3.6.1). Das längere Fragment, das das Vektor-Rückgrat enthält, wird dann mit dem jeweiligen sRNA-Gen, das zuvor in einer PCR amplifiziert und auch mit XbaI geschnitten wurde, ligiert (2.3.6.2) und anschließend transformiert (2.3.7.2).

2.4 Proteinchemische Methoden

Um im Umgang mit Proteinen deren Degradation zu vermeiden, werden diese stets auf Eis gelagert, sofern nicht anders beschrieben. Daher werden die Proteinaufreinigung sowie die Gelmobilitätsstudien in einem Kühlschrank bzw. Kühlraum durchgeführt.

2.4.1 Überexpression und Präparation von Proteinen

2.4.1.1 Überexpression mittels pBAD-Myc/HisC, pBAD/HisA (Tet^R) oder pET28b

Um Gene überexprimieren zu können, werden die entsprechenden DNA-Sequenzen in entsprechende Plasmide kloniert. Dazu werden PCR-Produkte hergestellt, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und in die Vektoren pBAD-Myc/HisC, pBAD/HisA (Tet^R) oder pET28b ligiert und in *E. coli*-TOP10 Zellen transformiert.

Zur Überexpression wird eine ÜNK des jeweiligen Stammes am folgenden Tag 1:100 in 400 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach drei Stunden bzw. bei Erreichen einer OD von 0,5 bis 0,6 wird das Expressionssystem durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG (pET28b-Plasmide) oder 1 mM Arabinose (pBAD-Plasmide) induziert. Nach weiteren vier Stunden der Inkubation werden die Zellen bei 4 °C und 10.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.1.2 Zellaufschluss und Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Für den Zellaufschluss und die sich daran anschließende Ni-NTA-Affinitätschromatographie (**Nickel-Nitrilotriacetat**) wird das *Ni-NTA Fast Start Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Außer zur Aufreinigung des Proteins ReiD wurde dabei stets nach dem Protokoll zur nativen Aufreinigung von Proteinen vorgegangen. Das denaturierend aufgereinigte ReiD wurde in einem zweiten Schritt via Dialyse zurückgefaltet (2.4.1.3).

Für den Zellaufschluss wird das Zellpellet (2.4.1.1) in 4 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert und sechs Mal hintereinander auf Eis für jeweils 15 s bei einer Intervallzeit von 0,5 s bei 25 % Leistung mittels Ultraschall behandelt (Ultrasonic Converter tip UW 2200, Bandelin electronics, Berlin). Danach wird dem Zelllysat 1 mM des Proteasehemmers PMSF (**Phenylmethylsulfonylfluorid**), 10 µl Lysozym (10 mg/ml) und 10 µl DNase I (1 U/µl) zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden danach durch Zentrifugation für 10 min bei 13.200 rpm und 4 °C, Filtration mittels 0,22 µm Filter (Millipore, Eschborn) und einer zweiten Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird für die sich anschließende Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet.

Bei dieser Chromatographie enthält die Agarose des Säulenmaterials NTA, welches als Chelat-bildende Verbindung kovalent am Agarosepolymer gebunden und mit Nickel-Ionen komplexiert ist. Diese binden selektiv an die Histidin-Reste der His₆-Tag-Fusionsproteine. Alle anderen Proteine, die diesen His₆-Tag nicht besitzen, binden nicht an die Matrix und werden aus der Säule gewaschen. Eluiert wird mit Imidazol, welches kompetitiv das Histidin aus dem Chelatkomplex verdrängt.

Um Proteindegradation zu vermeiden, wird die Chromatographie in einem Kühlschrank bzw. einem Kühlraum durchgeführt. Dazu wird die Säule zweimal mit 4 ml Lysepuffer gewaschen und dann das Zelllysat zweimal über die Säule gegeben. Das Waschen der Säule erfolgt durch zweimalige Zugabe von je 4 ml Waschpuffer. Die Elution erfolgt mit

viermal 500 µl Elutionspuffer. Im Anschluss an die Aufreinigung wird die Säule viermal mit 4 ml 0,5 M NaOH gespült und in 30 %-igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.4.1.3 Rückfaltung des unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Proteins ReiD via Dialyse

Um das denaturierend aufgereinigte Protein ReiD für weitere Versuche (siehe 2.4.2.5) wieder in den nativen Zustand zu überführen, wird eine Dialyse durchgeführt. Dazu wird 1 ml des Eluats (siehe 2.4.1.2) in einem mit Rückfaltungspuffer durchtränkten Visking-Dialyseschlauch (Medicell International, London, UK) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 3 kDa pipettiert. Dieser wird verschlossen, in 1 l Rückfaltungspuffer gegeben und unter ständigem Rühren für 36 Stunden bei 4 °C inkubiert. Der Rückfaltungspuffer setzt sich folgendermaßen zusammen: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 10 % [v/v] Glycerol und 69,68 g/l L-Arginine.

2.4.2 Analyse von Proteinen

2.4.2.1 Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wird die photometrische Methode nach BRADFORD (Bradford, 1976) im Mikrotiterplattenformat verwendet. Dabei wird die Roti[®]-Nanoquant-Lösung (Carl Roth) eingesetzt. Der darin enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 kann in zwei unterschiedlichen Zuständen vorkommen. Bindet der Farbstoff an Proteine, dort hauptsächlich an basische Aminosäuren, geht er von dem kationischen Zustand (Absorption bei 470 nm) in den anionischen Zustand (Absorption bei 595 nm) über. Da diese Absorptionsänderung in gewissen Konzentrationen proportional erfolgt, kann über eine Standardkurve die Proteinkonzentration in Probenlösungen bestimmt werden.

Dabei werden 50 µl der Probe mit 200 µl der Bradford-Arbeitslösung (2 Teile 5x Roti-Nanoquant und 5,5 Teile MilliQ-H₂O) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die OD₆₀₀ im Plattenleser *Wallac Victor*³ gemessen. Über eine Standardkurve mit BSA (*Bovine Serum Albumin*, Rinderserumalbum) in Konzentrationen von 0 bis 100 µg/ml kann die exakte Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden. Alle Messungen werden parallel in Triplikaten durchgeführt.

2.4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (**S**odium**d**odecyl**s**ulfat-**P**oly**a**crylamid**g**e**e**lektrophorese) wird verwendet, um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen. SDS dient dabei der Denaturierung der Proteine und verleiht diesen eine negative Ladung, sodass es zu

einem weitgehend konstanten Ladung-Masse-Verhältnis kommt. Zusätzlich führt die reduzierende Wirkung von Mercaptoethanol zur Auflösung aller Disulfidbrückenbindungen. Dadurch ist die Geschwindigkeit, mit der die Proteine durch das Gel wandern, unabhängig von deren nativer Ladung und nativer Konformation und somit nur abhängig von deren Masse.

Die SDS-Gele bestehen dabei aus einem 6 %-igen Sammelgel und einem 12,5 %-igen Trenngel:

| <u>12,5 %-iges Trenngel</u> | | <u>6 %-iges Sammelgel</u> | |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1,66 ml | MilliQ-H ₂ O | 1,6 ml | MilliQ-H ₂ O |
| 1,875 ml | 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) | 300 µl | 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) |
| 710 µl | Glycerin (99 %) | 550 µl | Acrylamidlösung (30 %) |
| 3,125 ml | Acrylamidlösung (30 %) | 25 µl | 15 % SDS-Lösung |
| 50 µl | 15 % SDS-Lösung | 5 µl | TEMED |
| 5 µl | TEMED | 25 µl | 10 % APS-Lösung (frisch!) |
| 75 µl | 10 % APS-Lösung (frisch!) | | |

Zuerst werden die Glasplatten, Silikontrenner und Kämmen mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Nachdem die Gelkammern zusammengebaut sind, wird das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, wobei der Kamm luftblasenfrei eingesetzt wird. Nach der Polymerisation wird das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit den Proben beladen. Diese werden zuvor mit 5x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Danach werden sie kurz abzentrifugiert und pro Tasche 25 µl aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wird bei jeder SDS-PAGE der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (10-170 kDa, Thermo Scientific) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in der vertikalen Gelkammer (Biometra Minigel-Twin, Analytik Jena, Jena) mit 1x SDS-Laufpuffer, einer Spannung von 120 V und 18 mA Stromstärke pro Gel.

Die folgende Zusammensetzung haben die verwendeten Puffer:

5x Laemmli-Puffer

| | |
|--------|-----------------------|
| 100 mg | Bromphenolblau |
| 3,5 ml | Glycerin (99 %) |
| 1,5 g | SDS |
| 3,2 ml | 1 M Tris-HCL (pH 6,8) |
| 2,5 ml | 2-Mercaptoethanol |

10x-SDS Laufpuffer

| | |
|-----------|-------------------------|
| 30,3 g/l | Tris-Base |
| 144,1 g/l | Glycin |
| 10 g/l | SDS |
| ad. 1 l | MilliQ-H ₂ O |

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel entweder mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt oder für einen Western Blot verwendet (2.4.2.3).

Die Färbung des Gels wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Trenngel für 5 min mit MilliQ-H₂O waschen, um das restliche SDS zu entfernen
- Trenngel mit Färbelösung überschichten und für 3-6 h schüttelnd inkubieren
- Zweimal für je 5 min mit MilliQ-H₂O waschen
- Trenngel mit Entfärbelösung überschichten und 2-3 h schüttelnd inkubieren, dabei wird Küchenrollenpapier mit in das Behältnis gegeben, um freiwerdendes Coomassie aufzunehmen
- Dreimaliges Waschen des Gels für je 10 min in MilliQ-H₂O

Folgende Lösungen wurden zur Gelfärbung verwendet:

Färbelösung

| | |
|-------|--------------------------------------|
| 20 ml | Methanol |
| 20 ml | 5x Roti®-Blue (Carl Roth, Karlsruhe) |
| 60 ml | MilliQ-H ₂ O |

Entfärberlösung

| | |
|-------|-------------------------|
| 20 ml | Methanol |
| 80 ml | MilliQ-H ₂ O |

2.4.2.3 Western Blot

Um mit der SDS-PAGE (2.4.2.2) aufgetrennte Proteine spezifisch detektieren zu können, werden diese mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und dort immunochemisch (2.4.2.4) nachgewiesen.

Dazu wird das Proteingel für 10 min in 1x Blotpuffer äquilibriert und die zugeschnittene PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) (Hybond-P, GE Healthcare, Amersham, UK) für 15 s in Methanol inkubiert. Danach wird diese für 5 min in MilliQ-H₂O gewaschen und für 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Das Übertragen der Proteine von dem Proteingel auf die Membran erfolgt mittels eines *Semi-Dry-Blotters* (Pegasus, PHASE, Lübeck). Die Blotapparatur wird aufgebaut, indem drei Lagen in 1x Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere (Whatman, Dassel) auf die Kathode gelegt werden. Das Proteingel wird aufgelegt und die Membran auf dem Gel positioniert. Darauf werden wiederum drei Lagen getränkte Whatmanpapiere gelegt und die Anode platziert. Beim Aufbau der Blotapparatur ist darauf zu achten, dass sich keinerlei Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befinden. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt für 10-60 min bei 12 V und 120 mA. Danach wird die Membran mit Blockpuffer überschichtet und für 1 h schüttelnd inkubiert. Danach wird die Membran für die immunochemische Proteindetektion eingesetzt (2.4.2.4).

Folgende Puffer kommen beim Western Blot zum Einsatz:

10x Blotpuffer

| | |
|---------|--------|
| 143 g/l | Glycin |
| 30 g/l | Tris |
| 10 g/l | SDS |

1x Blotpuffer

| | |
|--------|-------------------------|
| 100 ml | 10x Blotpuffer |
| 200 ml | Methanol |
| 700 ml | MilliQ-H ₂ O |

10x TBS

| | |
|--------|------------------|
| 100 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| 1,5 M | NaCl |

1x TBS-T

| | |
|--------|-------------------------|
| 100 ml | 10x TBS |
| 1 ml | Tween 20 |
| 899 ml | MilliQ-H ₂ O |

Blockpuffer

| | |
|--------|-------------------------|
| 100 ml | 10x TBS |
| 1 ml | Tween 20 |
| 100 ml | FCS |
| 899 ml | MilliQ-H ₂ O |

2.4.2.4 Immunochemische Detektion

Der Blockpuffer (2.4.2.3) sättigt unspezifische Bindungsstellen der PVDF-Membran ab. Nach diesem Schritt wird die Membran zweimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Danach wird der Primärantikörper, bei dem es sich um einen monoklonalen Anti-His₆-Tag-Antikörper (Dianova, Hamburg) aus der Maus handelt, 1:10.000 in 10 ml Blockpuffer verdünnt und für 1 h schüttelnd mit der Membran inkubiert. Der Antikörper wird abgegossen und kann bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Die Membran wird zweimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper ist ein Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Dieser wird 1:10.000 in 10 ml TBS-T verdünnt und für 1 h schüttelnd mit der Membran inkubiert. Danach wird die Membran erneut zweimal mit TBS-T für 10 min gewaschen und anschließend für 2 min in AP-Puffer (**A**lkalische **P**hosphatase) äquilibriert. Der Puffer wird abgegossen und die frisch hergestellte Detektionslösung wird auf die Membran gegeben. Die Inkubation im Dunklen wird gestoppt, sobald eine ausreichende Färbung eintritt. Dazu wird die Detektionslösung abgegossen und gegen eine 3 %-ige TCA-Lösung ausgetauscht (*trichloroacetic acid*, Trichloressigsäure). Die Membran wird danach auf Whatmanpapier getrocknet, in Klarsichtfolie eingeschlagen und unter Lichtabschluss aufbewahrt.

2.4.2.5 Gelmobilitätsstudien

Zur Untersuchung von Protein-DNA-Bindungen werden GMSA (**G**elelectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay, Gelmobilitätsstudien) durchgeführt. Da ungebundene DNA schneller durch ein Gel wandert als proteingebundene DNA, können Protein-DNA-Bindungen nachgewiesen werden.

Spezifische PCR-Produkte (2.3.4.1) werden aufgereinigt (2.3.4.3) und davon jeweils 100 ng mit 100 ng Kompetitor-DNA und 4 µl 5x TBE-Puffer (**T**ris-**B**orat-**E**DTA) vermischt. Dazu wird in steigender Konzentration das aufgereinigte Protein (2.4.1) hinzugegeben und die Ansätze werden auf 20 µl mit MilliQ-H₂O aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur werden die Proben mit 4 µl 6x *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) vermischt und auf ein 9,6 %-iges native Polyacrylamidgel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung wird bei 4 °C im Kühlschrank mit vorgekühltem 1x TBE-Puffer und einer Spannung von 120 V durchgeführt. Danach werden die Gele gefärbt und die DNA-Banden detektiert (2.3.3.2).

Folgende Puffer und Lösungen kommen beim GMSA zum Einsatz:

5x TBE-Puffer

| | |
|----------|---------------------|
| 54 g/l | Tris |
| 27,5 g/l | Borsäure |
| 20 ml/l | 0,5 M EDTA (pH 8,0) |

Natives GMSA-Gel

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| 4,8 ml | 30 % Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) |
| 3 ml | 5x TBE |
| 7 ml | MilliQ-H ₂ O |
| 150 µl | 10 % APS (A mmonium p eroxodisulfat, frisch!) |
| 15 µl | TEMED (N,N,N',N' - T etramethylethylendiamin) |

3 Ergebnisse

3.1 Abundanz und transkriptionelle Organisation der genomischen Insel GEI4417/4436

In diesem Abschnitt wird die Verbreitung und Diversität der genomischen Insel GEI4417/4436 insbesondere innerhalb der Gattung *Salmonella* untersucht. Des Weiteren wird die transkriptionelle Organisation der Insel, aufbauend auf den Ergebnissen von KRÖGER weitergehend betrachtet (Kröger & Fuchs, 2009).

3.1.1 Bioinformatische Untersuchung zur Abundanz der GEI4417/4436

Es konnte bereits gezeigt werden, dass homologe Bereiche der GEI4417/4436 auch in anderen Spezies vorkommen, so z. B. in dem grampositiven Bakterium *B. subtilis*, und den gramnegativen Arten *Y. enterocolitica* und *K. pneumoniae* (Kröger & Fuchs, 2009). Um Aussagen über das Vorkommen der genomischen Insel GEI4417/4436 in der Gattung *Salmonella* treffen zu können, wurde mittels BLAST Analyse in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Stand 04.09.2014) nach Homologen der auf der genomischen Insel GEI4417/4436 kodierten Genprodukte gesucht. Dabei wurde die *TBLASTN*-Funktion genutzt, bei der mit der jeweiligen Proteinsequenz, für die die Gene der GEI4417/4436 kodieren, gegen translatierte Nukleotidsequenzen gesucht wird. Insgesamt wurden dabei 53 *S. enterica* Serovare bestimmt, die über die GEI4417/4436 verfügen (Tab. 18). Die Aminosäuresequenzen waren dabei zu 99-100 % identisch. Von den zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten *Salmonella*-Genomsequenzen trugen 26 *S. enterica* Stämme sowie *S. bongori* keine Gene der GEI4417/4436. Dies zeigt, dass die Fähigkeit zum Abbau von MI nicht allgemein bei Salmonellen verbreitet ist. Neben dem Stamm 14028, der in dieser Arbeit als Modell für *S. Typhimurium* verwendet wurde, tragen sowohl die häufig verwendeten Laborstämme LT2, ST4/74 und SL1344 als auch der epidemiologisch relevante Serovare Enteritidis sowie Paratyphi B, als ein Vertreter der typhösen Salmonellen, die komplette genomische Insel. Außerhalb der Gattung *Salmonella* wurde eine homologe Sequenz zur GEI4417/4436 nur in dem Stamm *E. coli* ED1a (NC 011754), der aus humanem Darminhalt isoliert wurde, gefunden (Clermont *et al.*, 2008). Bei diesem wird die GEI4417/4436, bei der die Gene *iolI2* und *iolH* fehlen, von zwei Transposase-kodierenden Genen flankiert, was vermuten lässt, dass die genomische Insel mittels HGT innerhalb der gramnegativen Bakterien verbreitet wird.

Tab. 18: Auflistung der *S. enterica* Serovare, deren Genomsequenz auf das Vorhandensein der GEI4417/4436 hin untersucht wurde.

GEI4417/4436 vorhanden:

| <u><i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i></u> | | | |
|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------|--------------|
| <u>Serovar</u> | <u>Stamm</u> | <u>Serovar</u> | <u>Stamm</u> |
| Typhimurium | 14028S, LT2, ST4/74, SL1344 | Bareilly | CFSAN000189 |
| Agona | SL483, 24249 | Hvittingfoss | A4-620 |
| Hadar | RI_05P066 | Bovismorbificans | 3114 |
| Paratyphi B | SPB7 | Havana | CFSAN001082 |
| Saintpaul | SARA29, SARA23 | Enteritidis | SARB17, 3402 |
| Virchow | SL491 | Rissen | 150 |
| Weltevreden | HI_N05-537, 2007-60-3289-1 | Manhattan | 111113 |
| Montevideo | 507440-20 | Muenster | 660 |
| Give | S5-487 | Worthington | ATCC 9607 |
| Infantis | SARB27 | Muenchen | ATCC 8388 |
| Wandsworth | A4-580 | Rubislaw | ATCC 10717 |
| Cubana | 76814, CFSAN002050 | Meleagridis | 0047 |
| Alachua | R6-377 | Kentucky | ATCC 9263 |
| Gaminara | A4-567 | Indiana | ATCC 51959 |
| Inverness | R8-3668 | Chester | ATCC 11997 |
| Baildon | R6-199 | Derby | 626 |
| 4,5,12:i:- | CVM23701, 08-1736 | Albany | ATCC 51960 |
| Thompson | RM6836 | Nchanga | CFSAN001091 |
| Namur | 05-2929 | Norwich | CFSAN001077 |
| Tennessee | TXSC_TXSC08-19 | Braenderup | ATCC BAA-664 |
| Aqua | NVSL2001 | Ohio | CFSAN001079 |
| Bredeney | CFSAN001080 | Copenhagen | 0084 |

GEI4417/4436 liegt nicht vor:

| <u>Spezies/Subspezies</u> | <u>Serovar</u> | <u>Stamm</u> |
|-------------------------------------------|---------------------|---------------|
| <i>S. bongori</i> | | |
| <i>S. enterica</i> ssp. <i>salamae</i> | 3588/07 | |
| <i>S. enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> | 62:z4,z23:- | RSK2980 |
| <i>S. enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i> | 60:r:e,n,x,z15 | 01-0170 |
| <i>S. enterica</i> ssp. <i>houtenae</i> | | ATCC BAA-1582 |
| <i>S. enterica</i> ssp. <i>indica</i> | 6,14,25:z10:1,(2),7 | 1121 |

| <u><i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i></u> | | | |
|------------------------------------------------|---------------------|----------------|---------------|
| <u>Serovar</u> | <u>Stamm</u> | <u>Serovar</u> | <u>Stamm</u> |
| Typhi | CT18, Ty2, P-stx-12 | Newport | SL254 |
| Paratyphi | A/C | Pomona | ATCC 10729 |
| Dublin | CT_02021853 | Poona | ATCC BAA-1673 |

| | | | |
|---------------------|-------------|-------------|----------|
| Gallinarum | 287/91 | Senftenberg | SS209 |
| Heidelberg | SL476, B182 | Kentucky | CVM29188 |
| Choleraesuis | SC-B67 | Mississippi | A4-633 |
| Gallinarum/pullorum | RKS5078 | Uganda | R8-3404 |
| Javiana | CFSAN001992 | Cerro | 818 |
| Schwarzengrund | CVM19633 | Hartford | 06-0676 |

3.1.2 Physiologische Untersuchungen zur Abundanz des MI-Metabolismus bei Salmonellen

Da zum Zeitpunkt der bioinformatischen Untersuchung zur Verbreitung des MI-Metabolismus bei Salmonellen nur 80 Genomsequenzen öffentlich zugänglich waren, wurden weitere Laboruntersuchungen durchgeführt. Dabei wurden 33 *Salmonella*-Isolate aus der Weihenstephaner Mikroorganismen-Sammlung sowie 65 Infektions- und Umweltisolate der Stammsammlung des Robert-Koch-Instituts, Wernigerode, auf das Vorkommen essentieller Gene der GEI4417/4436 sowie die Fähigkeit zum Wachstum mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle hin getestet (Tab. S2). Die Stämme wurden dazu mittels PCR auf das Vorhandensein von *iolR*, *reiD*, *iolE*, *iolG1* und *srjJ* hin überprüft. Die Kultivierung der Stämme erfolgte für 96 h auf MI-Agar. Danach wurden die Phänotypen hinsichtlich Wachstum, Bistabilität und Pigmentbildung ausgewertet. Bei beiden Versuchsteilen diente der Stamm 14028 als Positivkontrolle und *E. coli* DH5 α als Negativkontrolle. Dabei war zu beobachten, dass von den 98 Stämmen 43 auf MI-Agar wachsen konnten. Davon zeigten wiederum 21 Stämme ein bistabiles Wachstum. Bis auf 3 Stämme zeigten alle der 43 wachsenden Kulturen eine deutliche Pigmentbildung: *S. enterica* Derby (21), *S. salamae* 13,23:z:1,5 (51) und ein weiteres *S. salamae* 13,23:z:1,5-Isolat (61). Die beiden Isolate (79) und (80) des anderen *S. salamae*-Serotyps 9:l,w:e,n,x, die ebenfalls in der Untersuchung getestet wurden, zeigten hingegen keinerlei Wachstum. Bei allen vier *S. salamae*-Isolaten war zudem weder bistabiles Wachstum noch ein Signal bei den PCR-Analysen zu beobachten.

Insgesamt wurden von der Art *S. arizonae* sechs Isolate untersucht. Diese zeigten weder ein Wachstum auf MI-Agar noch ein positives Signal bei PCR-Analysen. Das gleiche Ergebnis trifft mit einer Ausnahme auf *S. diarizonae* zu. Von dieser Art befanden sich sieben Isolate in dem Stammset. Nur das Isolat *S. diarizonae* 48:l,v:1,5,7 (63) zeigte Wachstum und eine braun pigmentierte Kultur. Jedoch war auch bei diesem Stamm keinerlei PCR-Signal zu beobachten.

Von der Art *S. houtenae* befanden sich fünf Isolate unter den Stämmen. Von diesen zeigte nur das Isolat (84), welches das Rauh-Antigen trägt, Wachstum, Pigmentierung und PCR-Signale für alle 5 getesteten Gene. Die anderen 4 Stämme waren in Bezug auf die untersuchten Merkmale unauffällig.

Von den 76 *S. enterica*-Isolaten zeigten insgesamt 39 Stämme Wachstum, wobei bei 21 Isolaten ein bistabiler Phänotyp zu beobachten war. Bei den wachsenden Stämmen waren bis auf die Ausnahme *S. Enteritidis* (40) PCR-Signale zu detektieren. In diesen Fällen konnten dann mindestens *ioIR* und *ioIG1* nachgewiesen werden. In elf Isolaten konnte *reiD* mittels PCR nicht detektiert werden, obwohl die beiden oben genannten Gene sowie Wachstum vorhanden waren. Eine Besonderheit zeigten sieben Stämme, bei denen die PCR-Produkte für alle getesteten Gene sichtbar waren, die jedoch keinerlei Wachstum auf MI-Agar zeigten: 11, 24, 48, 50, 60, 78 und 96.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass von den getesteten *Salmonella*-Subspezies II, IIIa, IIIb und IV, deren natürliches Habitat exotherme Tiere und die Umwelt darstellen (Brenner *et al.*, 2000), nur *S. salamae* 13,23:z:1,5 (51) und (61), *S. diarizonae* 48:l,v:1,5,7 (66) sowie *S. houtenae* (84) mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können, was 18 % entspricht. Letzteres Isolat war von diesen das einzige, bei dem die Gene *ioIR*, *reiD*, *ioIE*, *ioIG1* und *srfJ* nachgewiesen wurden. Dagegen zeigen 51,3 % der Isolate von *S. enterica*, welche endotherme Wirbeltiere als Habitat bevorzugen (Brenner *et al.*, 2000), die Fähigkeit zum Wachstum auf MI-Agar.

3.1.3 Die transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 ist dynamisch

Die transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 ist im Vergleich zu anderen genomischen Inseln, die für Enzyme und Regulatoren des MI-Metabolismus kodieren, weiterer gramnegativer sowie grampositiver Prokaryoten sehr komplex (Kröger & Fuchs, 2009). Die GEI4417/4436 kodiert für den taxonomisch verbreiteten Repressor *ioIR* und den taxonomisch auf Salmonellen begrenzten Induktor *ReiD*. Zudem trägt die Insel zwei Gene, die für die MI-Transporter *ioIT1* und *ioIT2* kodieren, sowie fünf Operons: *ioIA/ioIB*, *ioIE/ioIG1*, *ioIC1/ioIC2*, *ioID1/ioID2/ioIG2* und *ioII2/ioIH*. Die entsprechenden Gene sind bis auf die drei letztgenannten essentiell für das Wachstum in MI-Medium. Zusätzlich sind auf der Insel weitere Gene unbekannter Funktion konserviert, die nicht essentiell für den MI-Metabolismus sind: *srfJ*, *ioII1*, *STM4428* und *STM4434*. Um die transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 vollständig aufzuklären, wurde eine mögliche polycistronische Operonstruktur folgender Gene untersucht: *ioIE/ioIG1/srfJ/ioII1*, *srfJ/ioII1*, *ioIC1/ioIC2/STM4428* und

ioID1/ioID2/ioIG2/STM4434. Da bereits mehrere genomweite Studien einen Einfluss von SsrB auf die Expression von *srfJ* zeigen konnten, wurde dessen transkriptionelle Organisation gesondert untersucht (Worley *et al.*, 2000, Husain *et al.*, 2010, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Für die Untersuchung der anderen Operonstrukturen wurde wie bereits beschrieben vorgegangen (Kröger & Fuchs, 2009). Dazu wurde *S. Typhimurium* 14028 in MI-Medium kultiviert und bei Erreichen der optischen Dichte $OD_{600} = 0,3$ wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die Abwesenheit von DNA in den RNA-Proben wurde durch den zweimaligen DNase-Verdau und die anschließende Kontrolle mittels PCR überprüft. Danach wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und für PCR-Analysen eingesetzt. Dazu wurden Primerpaare verwendet, die intragenisch und genübergreifend binden (Abb. 9).

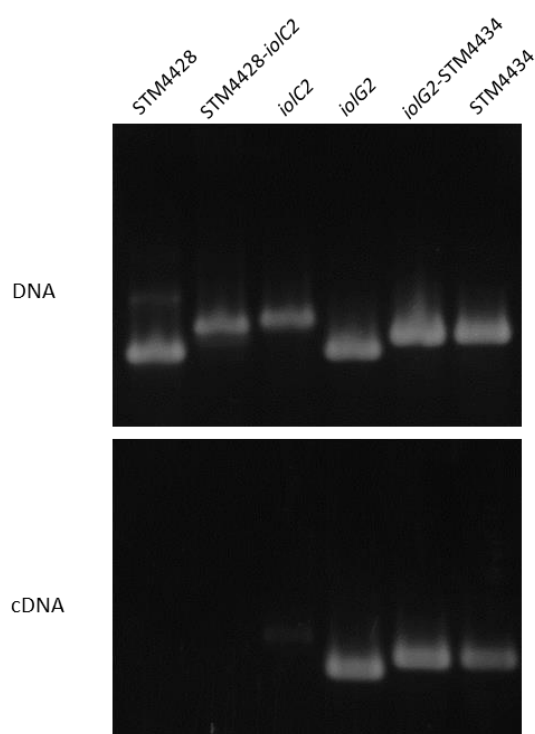


Abb. 9: Transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 mit Fokus auf *STM4428* und *STM4434*. *S. Typhimurium* 14028 wurde in MI-Medium kultiviert und die Gesamt-RNA bei $OD_{600} = 0,3$ isoliert, in cDNA umgeschrieben und für PCR-Analysen eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare binden intragenisch oder genübergreifend. In MI-Medium war die mRNA von *ioIC2* (schwaches Signal) sowie mRNA, die sowohl von *ioIG2* als auch von *STM4434* kodiert wurde, nachweisbar. mRNA von *STM4428* oder *STM4428/ioIC2* war nicht nachweisbar.

Es zeigte sich, dass das bereits beschriebene Operon *ioIC1/ioIC2* in MI-Medium nicht zusammen mit dem Gen *STM4428*, welches für einen putativen Transporter kodiert, transkribiert wird. Das Operon *ioID1/ioID2/ioIG2* reicht hingegen bis zum ebenfalls putativen Transporter *STM4434* und ist somit tetracistronisch unter MI-Bedingungen.

Von dem Gen *srfJ* ist bekannt, dass es für eine putative lysosomale Glykosylceramidase kodiert und durch den SPI-2 Virulenzregulator SsrB reguliert wird, woher auch die Bezeichnung SrfJ (*SsrB-regulierter Faktor J*) stammt (Worley *et al.*, 2000). Um zu klären, ob *srfJ* mit *ioII1* ein gemeinsames Operon bildet und ob *srfJ* einen eigenen Promotor besitzt oder zusammen mit *ioIE/ioIG1* von P_{ioIE} reguliert wird, wurde der Stamm 14028

in MI-Medium und auch in LPM-Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ kultiviert und RNA isoliert. LPM ist ein Mg-reduziertes Minimalmedium, das zu Induktion von SsrB verwendet werden kann (Coombes *et al.*, 2004). Die isolierte und DNA-freie RNA wurde in cDNA umgeschrieben und für PCR-Analysen eingesetzt (Abb. 10).

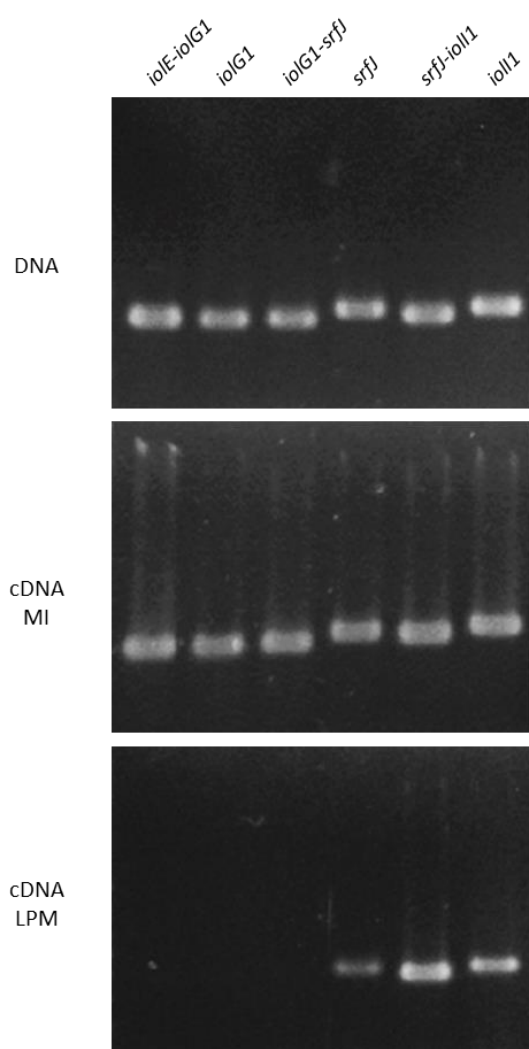


Abb. 10: Transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 mit Fokus auf *srfJ* und *ioII1*. *S. Typhimurium* 14028 wurde in MI-Medium sowie in LPM-Medium kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde jeweils bei $OD_{600} = 0,3$ isoliert, in cDNA umgeschrieben und für PCR-Analysen eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare binden intragenisch oder genübergreifend. In MI-Medium lag eine mRNA vor, die für *ioIE*, *ioIG1*, *SrfJ* und *ioII1* kodiert. Wurden die Zellen in LPM-Medium kultiviert, welches den Virulenzregulator SsrB induziert, wurde nur die mRNA *srfJ/ioII1* transkribiert. Abbildung entnommen aus Esselborn (2011).

Es konnte gezeigt werden, dass die Operonstruktur von *ioIE/ioIG1/srfJ/ioII1* von den jeweiligen Umwelteinflüssen abhängt, denen die Zellen ausgesetzt sind. Während des Wachstums in MI-Medium wurden die vier Gene tetracistronisch transkribiert. Die beiden weiter 3'-gelegenen Gene *srfJ* und *ioII1* können aber auch unabhängig von P_{ioIE} reguliert werden, wenn der Virulenzregulator SsrB induziert wird. Dies bestätigt die bisher publizierten Ergebnisse, dass eine Überexpression von SsrB zu einer Induktion von *srfJ* führt (Worley *et al.*, 2000) bzw. eine Deletion von SsrB die Repression von *srfJ* bewirkt (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Ergänzt werden diese Daten um das Ergebnis der RT-PCR, dass *ioII1* ebenfalls von SsrB reguliert wird, da beide Genprodukte von derselben mRNA kodiert werden. Zudem zeigt die Abb. 10, dass *srfJ* über einen

eigenen Promotor verfügen muss, da unter diesen Wachstumsbedingungen keine transkriptionelle Kopplung zum 5'-gelegenen Gen *ioIG1* vorliegt. Die weiterführenden Experimente zum Einfluss von SsrB auf *srfJ* und die GEI4417/4436 werden in Abschnitt 3.4.2 dargelegt.

3.2 Funktionelle Analyse von *reiD* und ReiD

In diesem Abschnitt wird die taxonomische Verbreitung der GEI4417/4436 sowie des Regulators ReiD näher betrachtet. Des Weiteren werden die Regulation von P_{reiD} sowie die Funktion von ReiD untersucht.

3.2.1 Das Produkt des Gens *reiD* hat Homologien zu AraC-ähnlichen Regulatoren mit DNA-Bindedomäne

Um Aussagen über das Vorkommen der genomischen Insel GEI4417/4436 in der Gattung *Salmonella* treffen zu können, wurde mittels BLAST Analyse in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach Homologen der ganzen genomischen Insel GEI4417/4436 sowie im Besonderen des Gens *reiD* gesucht. Dabei wurde festgestellt, dass *reiD* stets innerhalb von GEI4417/4436 und dort immer an der identischen Stelle vorliegt. Es wurden weder Stämme mit *reiD* und ohne GEI4417/4436 noch Stämme mit GEI4417/4436 und ohne *reiD* gefunden (Tab. 18).

Bioinformatische Analysen von *reiD* sagten zwei Domänen bei dem vorhergesagten Protein voraus: C-terminal befindet sich eine AraC-ähnliche Domäne mit einem HTH-Motiv (**H**elix-**T**urn-**H**elix), das eine Bindung des Proteins an DNA ermöglicht. Am N-Terminus wird eine Cupin-2-Domäne in Form eines β -Fass vorhergesagt, die funktionell sehr vielseitig sein kann (Dunwell *et al.*, 2004). Von AraC-ähnlichen Proteinen ist bekannt, dass sie als Transkriptionsfaktor induzierend auf ihre Zielgene wirken und oftmals als Dimere vorkommen (Egan, 2002, Schleif, 2003). Die in der NCBI-Datenbank annotierte DNA-Sequenz von *reiD* umspannt im sequenzierten Stamm LT2 die Basen 4.665.886 bis 4.666.710 und kodiert somit für ein 31,5 kDa großes Protein. Da dieses Gen jedoch mit einem untypischen TTG-Startcodon beginnen würde und 51 bp in 5'-Richtung zudem ein ATG-Startcodon liegt, welches homolog zu den Startcodons der *reiD*-Homologen in den übrigen *Salmonella*-Stämmen ist, wurde *reiD* in LT2 neu annotiert. Dieses befindet sich nun an Position 4.665.835 bis 4.666.710 und kodiert für ein 33,5 kDa großes Protein, welches aus 291 Aminosäuren besteht.

Die erfolgreiche Expression dieses Proteins konnte durch SDS-PAGE und Western Blot Analysen gezeigt werden (Abb. 11). Dabei wurde *reiD* in den Vektor pBAD-Myc/His

kloniert, sodass das induzierte Protein ReiD einen His₆-Tag trug, der detektiert werden konnte. Dabei entspricht die Größe des nachgewiesenen Proteins der zuvor berechneten Größe von ReiD.

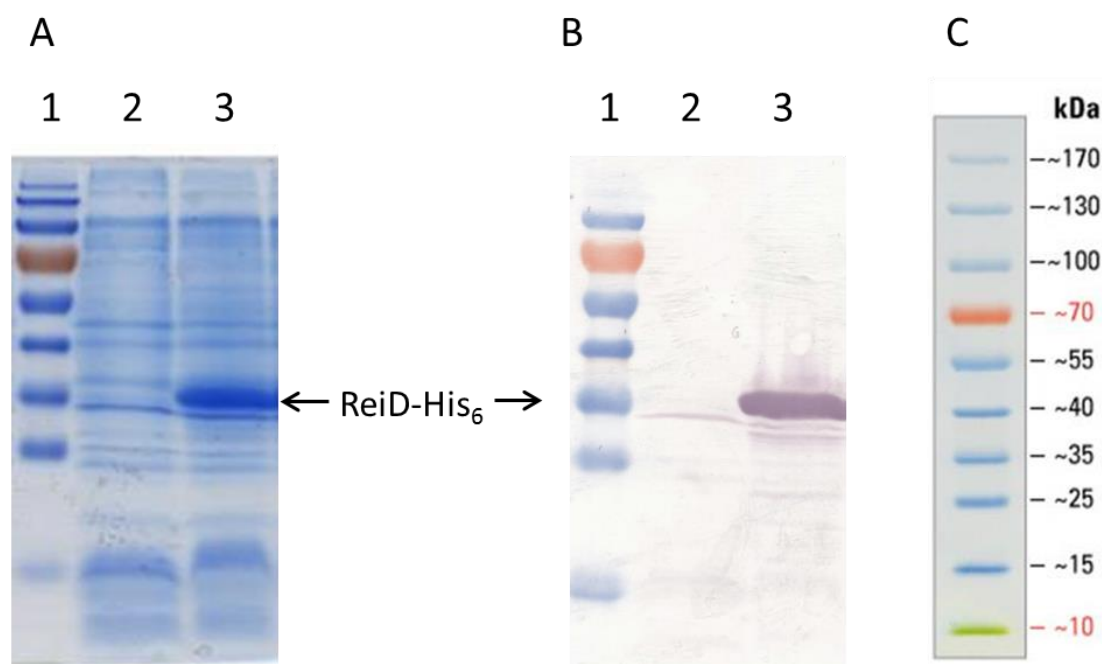


Abb. 11: Überexpression von ReiD-His₆ mittels pBAD-Myc/His-*reiD*. (A) Coomassie Färbung eines 12,5 %-igen SDS-PAGE-Gels. 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2: Lysat von *E. coli* TOP10 pBAD-Myc/His-*reiD* unter nicht induzierenden Bedingungen; 3: Lysat von mit 1 mM Arabinose induzierten Zellen. (B) korrespondierender Western Blot zur SDS-PAGE mit Antikörper anti- α -His₆-Tag. (C) PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Die Pfeile bezeichnen die Banden, die ReiD-His₆ darstellen. Abbildung entnommen aus Broadley (2011).

3.2.2 ReiD ist essentiell für das Wachstum mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle

Die Deletion von *reiD* verhindert, wie bereits von Kröger (2010) gezeigt und in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, das Wachstum von 14028 in Minimalmedium mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle. Mittels pBR-*reiD* konnte dieser Phänotyp komplementiert werden. Neben dem wiederhergestellten Wachstum wurde dabei eine deutliche Verkürzung der lag-Phase auf 25 h im Vergleich zum Wildtyp mit 50 h beobachtet (Abb. 12 A). Dies könnte durch die leichte Überexpression oder Deregulation von *reiD* durch die Anzahl der Plasmidkopien hervorgerufen werden. Auch zeigte der Komplementationsstamm keinerlei bistabiles Wachstum mehr auf MI-Agarplatten (Abb. 12 B). Unter Standardbedingungen in LB-Medium war keinerlei Wachstumsunterschied zwischen dem Wildtyp 14028 und 14028 Δ *reiD* feststellbar (Abb. 12 C).

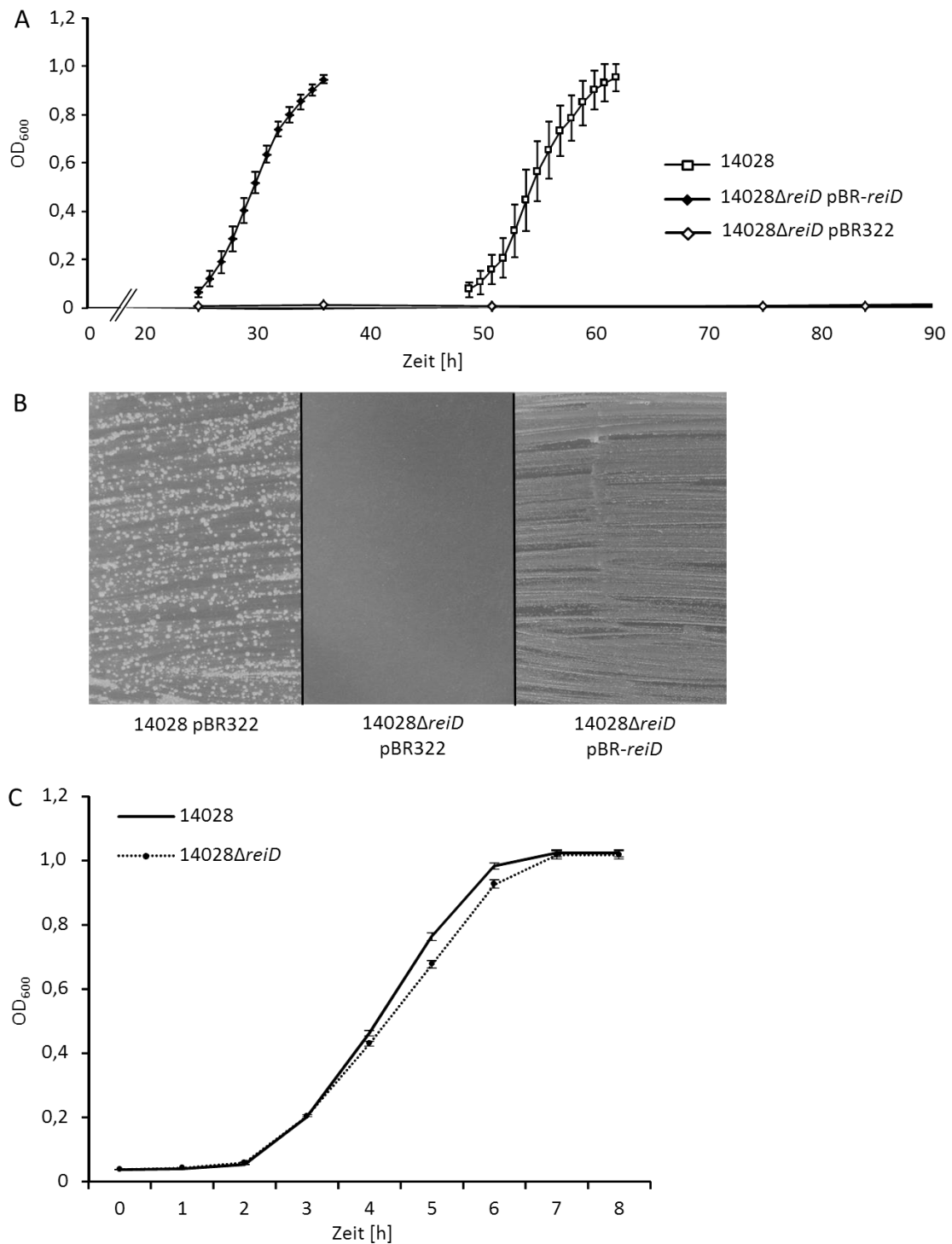


Abb. 12: *reiD* ist essentiell für das Wachstum von 14028 mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle. (A) Wachstum der Stämme 14028, 14028Δ*reiD* und 14028Δ*reiD* pBR-*reiD* in MI-Medium. Stamm 14028Δ*reiD* zeigte keinerlei Wachstum für mindestens 170 h. Abbildung entnommen von Broadley (2011). (B) Der Stamm 14028 pBR322 entsprach dem wildtypisch bistabilen Wachstumsphänotyp auf MI-Agar (links). Der Stamm 14028Δ*reiD* pBR322 konnte nicht auf MI-Agar wachsen (Mitte). Die episodale Expression von *reiD* mittels pBR-*reiD* komplementierte erfolgreich das Wachstumsdefizit der *reiD*-Deletion. Der bistabile Phänotyp wurde dadurch jedoch aufgehoben (rechts); (C) Wildtypstamm 14028 und die Deletionsmutante 14028Δ*reiD* in LB-Medium. Abbildungen entnommen aus Broadley (2011) sowie Rothhardt *et al.* (2014).

3.2.3 Die Deletion von *reiD* hat Einfluss auf das Wachstum von 14028 unter ökologisch relevanten Kulturbedingungen

Um die biologische Relevanz des MI-Metabolismus zu untersuchen, wurden die Stämme 14028 und 14028 Δ *reiD* in verschiedenen konditionierten Medien (siehe 2.1.3) kultiviert und die Generationszeiten verglichen. Die Konditionierung der Medien erfolgte jeweils durch Inokulation mit dem Stamm 14028 Δ *reiD*, eine 7 tägige Inkubation bei 37 °C und Sterilfiltration. Dies sollte den Katabolismus aller Metabolite ermöglichen, die nicht von der Funktion von *reiD* abhängen.

Für die Versuche wurden Medien aus Kompost, Kraftfutter, Maissilage oder dem Inhalt von Schweinecaecum verwendet, wobei LB-Medium als Kontrolle diente. Von diesen wurde erwartet bzw. ist es bekannt, dass sie hohe Konzentrationen an Inositolen enthalten (Reddy, 2002, Matsumoto *et al.*, 2012). Die Anzahl der Zellen wurden jeweils zu Beginn und nach Inkubation für 24 h bei 37 °C mittels Ausplattierens bestimmt und der Generationszeitenindex $t_{d(i)}$ [$t_{d(i)} = t_{d(\text{Mutante})}/t_{d(\text{Wildtyp})}$] berechnet (Abb. 13). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Generationszeit von 14028 Δ *reiD* in den Medien aus Kompost (+18,7 %; $p \leq 0,05$), Maissilage (+23,4 %; $p \leq 0,05$) und Schweinecaecuminhalt (+14,3 %; $p \leq 0,01$). Kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsmutante war im Kraftfuttermedium messbar.

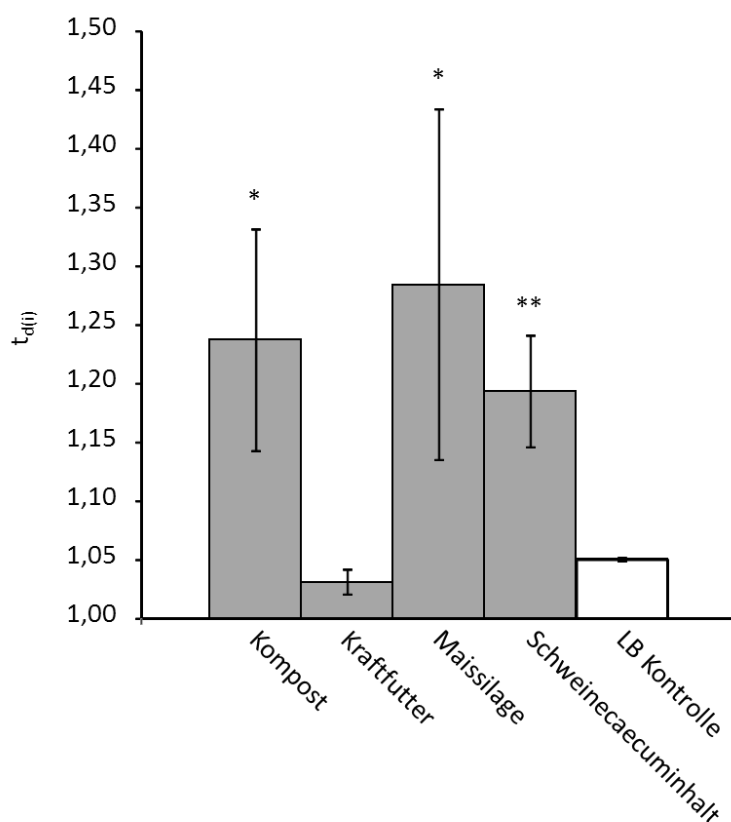


Abb. 13: Die Deletion von *reiD* verringert das Wachstum von 14028 in konditioniertem Medium von Kompost, Maissilage und Schweinecaecuminhalt. Der Wildtyp 14028 und die Mutante 14028 Δ *reiD* wurden für jeweils 24 h in den Medien kultiviert. Der Generationszeitenindex $t_{d(i)}$ wurde für jedes Medium berechnet und auf seine Signifikanz gegenüber der LB-Kontrolle hin mit dem T-Test überprüft. Sowohl die Standardabweichungen als auch die Signifikanzniveaus sind gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Jedes Experiment und jede Ausplattierung zur Zellzahlbestimmung wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

3.2.4 Die Überexpression von *ioIE* und *ioIG1* entkoppelt den MI-Abbau von *reiD*

Wie durch KRÖGER gezeigt werden konnte, befinden sich 259 bp in 3'-Richtung von *reiD* die beiden transkriptionell gekoppelten Gene *ioIE* und *ioIG1* (Kröger & Fuchs, 2009). Diese sind essentiell für den MI-Metabolismus und werden zwar durch IoIR reguliert, $P_{ioIE/ioIG1}$ wird jedoch nicht von IoIR gebunden (Kröger & Fuchs, 2009). Um zu testen, ob der Nullwachstums-Phänotyp von $14028\Delta reiD$ in MI-Medium darauf beruht, dass *ioIE/ioIG1* nicht mehr exprimiert werden, wurde das Plasmid pET-*ioIE/ioIG1* konstruiert und in folgende Stämme transformiert: 14028, $14028\Delta reiD$, $14028\Delta ioIE\Delta ioIG1$ und $14028\Delta reiD\Delta ioIE\Delta ioIG1$. Die Stämme 14028 pET28b und $14028\Delta reiD$ pET28b dienen als Kontrolle. Alle Stämme enthielten zudem das Plasmid pTARA, welches das Gen trägt, das für die T7 RNA Polymerase kodiert.

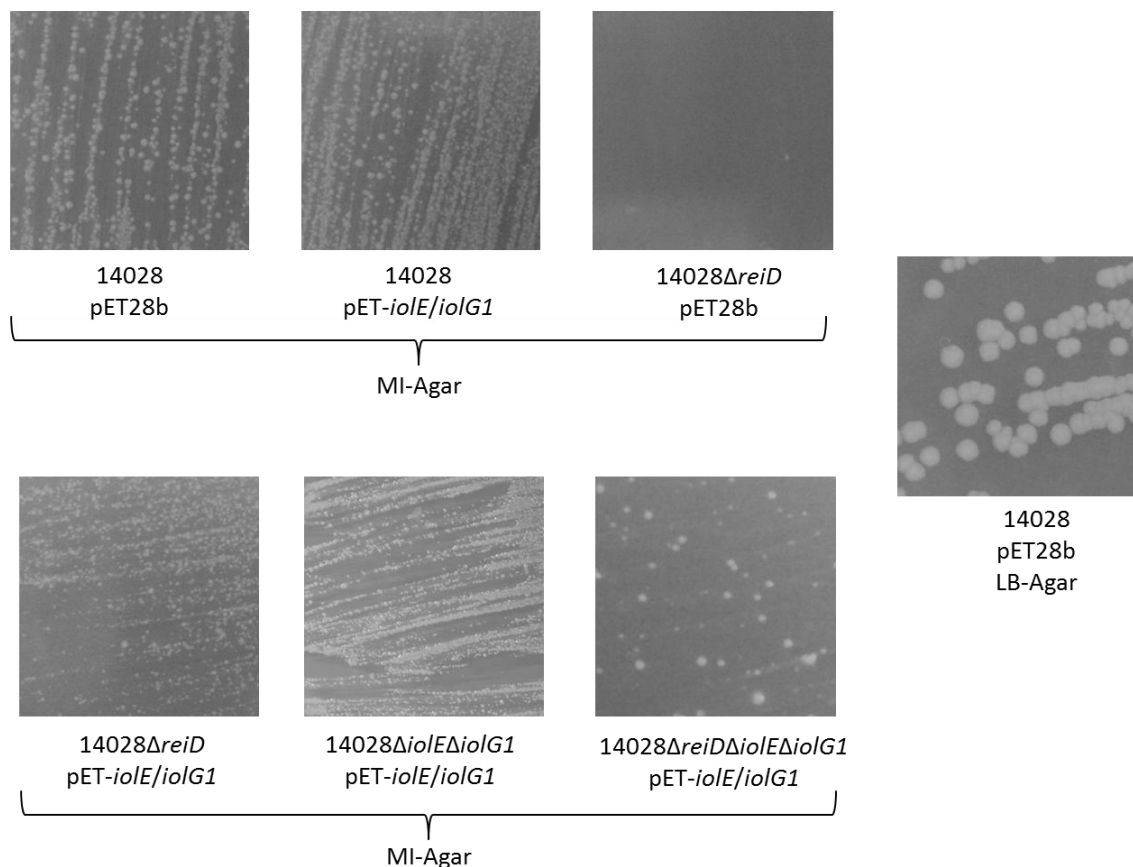


Abb. 14: Die Überexpression von *ioIE* und *ioIG1* komplementiert die Deletion von *reiD* auf MI-Agar. Die Stämme 14028, $14028\Delta reiD$, $14028\Delta ioIE\Delta ioIG1$ und $14028\Delta reiD\Delta ioIE\Delta ioIG1$ wurden dazu mit dem Helferplasmid pTARA sowie mit pET28b bzw. pET-*ioIE/ioIG1* transformiert und für 72 h bei 37 °C auf MI-Agar mit Kanamycin und Ampicillin inkubiert. IPTG wurde aufgrund der Grundexpression des Promotors nicht hinzugegeben. Das Wachstum wurde nur bei den Deletionsstämmen beobachtet, die das komplementierende Plasmid pET-*ioIE/ioIG1* enthielten. Diese Stämme zeigten zudem den bistabilen Phänotyp. Der Kontrollstamm $14028\Delta reiD$ pET28b wies keinerlei Wachstum auf MI-Agar auf. Der Stamm 14028 pET28b zeigte wildtypisches Wachstum auf LB-Agar als Kontrolle für homogenes Wachstum. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

Sowohl auf MI-Agar (Abb. 14) als auch in MI-Medium (Abb. 15) konnte Wachstum bei den Mutanten gemessen werden, die pET-*ioIE/ioIG1* trugen. Dies macht deutlich, dass

die essentielle Funktion von *reiD* durch die künstliche Expression von *iolE* und *iolG1* substituiert werden kann. Alle Stämme, außer 14028 Δ *reiD* pET28b, zeigten in dem Experiment einen bistabilen Phänotyp auf dem MI-Agar. In Flüssigkultur betrug die längste lag-Phase ca. 5 Tage bei dem Stamm 14028 pET28b, wohingegen die kürzeste lag-Phase bei Stamm 14028 pET-*iolE/iolG1* zu beobachten war (Abb. 15).

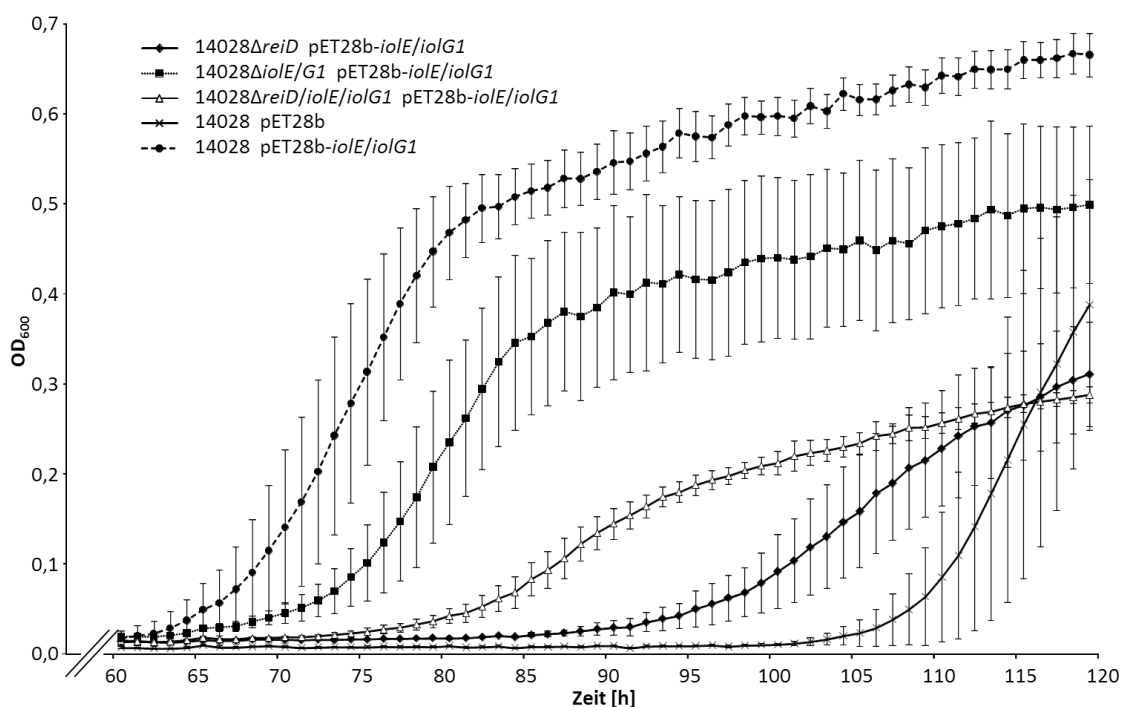


Abb. 15: Die Überexpression von *iolE* und *iolG1* komplementiert die Deletion von *reiD* in MI-Medium. Wachstumskurven der Stämme 14028 Δ *reiD* pET28b-*iolE/iolG1* (lag-Phase: 90 h), 14028 Δ *iolEΔiolG1* pET28b-*iolE/iolG1* (lag-Phase: 66 h), 14028 Δ *reiDΔiolEΔiolG1* pET28b-*iolE/iolG1* (lag-Phase: 78 h), 14028 pET28b (lag-Phase: 107 h) und 14028 pET28b-*iolE/iolG1* (lag-Phase: 64 h) in MI-Medium in Mikrotiterplatten. Alle Stämme enthalten das Helferplasmid pTARA. Die Inkubation und Messungen wurden automatisiert im Bioscreen C durchgeführt. Pro Zeitpunkt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens 6 Wells pro Stamm dargestellt. Die Dauer der lag-Phase in Mikrotiterplatten unterscheidet sich prinzipiell von der in Flaschenkulturen. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

Der offensichtliche Unterschied in der Dauer der lag-Phase zu vorherigen Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wie auch zu den Ergebnissen von KRÖGER ist sowohl mit der Kultivierung und Messung mittels des automatischen Messgerätes Bioscreen C als auch mit der Verwendung von zwei Antibiotika zur Stabilisierung von pTARA und pET28b zu erklären (Kröger, 2010). Die lange lag-Phase von ca. 4 Tagen bei Stamm 14028 Δ *reiD* pET-*iolE/iolG1* kann durch die weiter unten folgenden Ergebnisse (siehe 3.2.6) erklärt werden, bei denen nach den Interaktionen von *ReiD* mit weiteren *iol*-Genen gefragt wurde. Die beiden Deletionsstämme 14028 Δ *reiD* pET28b-*iolE/iolG1* und 14028 Δ *reiDΔiolEΔiolG1* pET28b-*iolE/iolG1*, die im Vergleich zu den drei übrigen Stämmen kein *reiD* tragen, zeigen ein deutlich geringeres Wachstum.

3.2.5 ReiD aktiviert die Transkription von P_{ioIE} in einem heterologen System

Um zu untersuchen, ob ReiD die Transkription von $ioIE/ioIG1$ in einem heterologen System induzieren kann, wurde ein chromosomaler P_{ioIE} -Reporter im *E. coli*-Stamm XL-1 hergestellt. Dieser weist keinerlei Gene zum Abbau von MI auf. Die $P_{ioIE}::lux$ -Fusion wurde in den Zellen mittels des *imal*-Fragmentes inseriert, welches in Abwesenheit von Maltose nicht transkribiert wird. Der resultierende Stamm XL-1 *imal-P_{ioIE}::lux* sowie der Kontrollstamm *imal::lux*, wurden mit pBR-*reiD* und pBR322 als Kontrolle transformiert. Die Zellen wurden dann auf LB-Agar bei 37 °C kultiviert und die Aktivität der Luciferase mittels IVIS (*in vivo* imaging systems, *in vivo* Bildgebungssystem) gemessen. Die Aktivierung von $P_{ioIE}::luxCDABE$ konnte dabei nur in Gegenwart von ReiD beobachtet werden (Abb. 16 A). Um die transkriptionelle Antwort von P_{ioIE} auf ReiD zu quantifizieren, wurden die Stämme in LB-Medium in Mikrotiterplatten kultiviert und die OD₆₀₀ als auch die Biolumineszenz während des Wachstums gemessen (Abb. 16 B). Der Stamm XL-1 *imal-P_{ioIE}::lux* pBR322 zeigte dabei eine maximale Biolumineszenz von $1,6 \times 10^3$ RLU/OD₆₀₀ (relative light units, *relative Lichteinheiten*), wohingegen der Stamm XL-1 *imal-P_{ioIE}::lux* pBR-*reiD* mit konstitutiver *reiD* Expression eine ca. 375-mal höhere Transkription von 6×10^5 RLU/OD₆₀₀ aufwies.

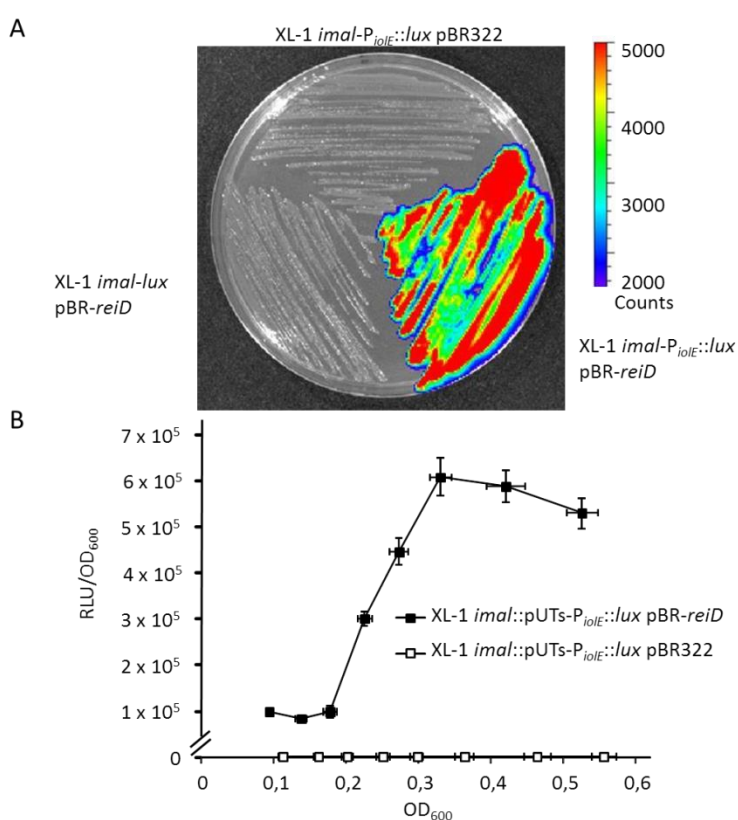


Abb. 16: Induktion von P_{ioIE} durch ReiD in *E. coli*. (A) Die Aktivierung von P_{ioIE} wurde mittels IVIS detektiert. Die Skala zeigt die relative Signalstärke an. Ein starkes Signal wurde vom Stamm XL-1 *imal-P_{ioIE}::lux* pBR-*reiD* emittiert. (B) Der Zusammenhang zwischen RLU und OD₆₀₀ ist als Funktion der Wachstumsphasen dargestellt. 90 min nach Inokulation wurden die Messungen gestartet und alle 30 min wiederholt. Der Stamm XL-1 *imal-P_{ioIE}::lux* pBR-*reiD* zeigte die maximale P_{ioIE} Aktivität von 6×10^5 RLU/OD₆₀₀. Der Kontrollstamm XL-1 *imal-P_{ioIE}::lux* pBR322, der nicht das komplementierende Plasmid trug, zeigte als höchste Luciferase-Aktivität 1×10^3 RLU/OD₆₀₀. Die Versuche wurden jeweils viermal voneinander unabhängig durchgeführt. Abbildung entnommen aus Broadley (2011).

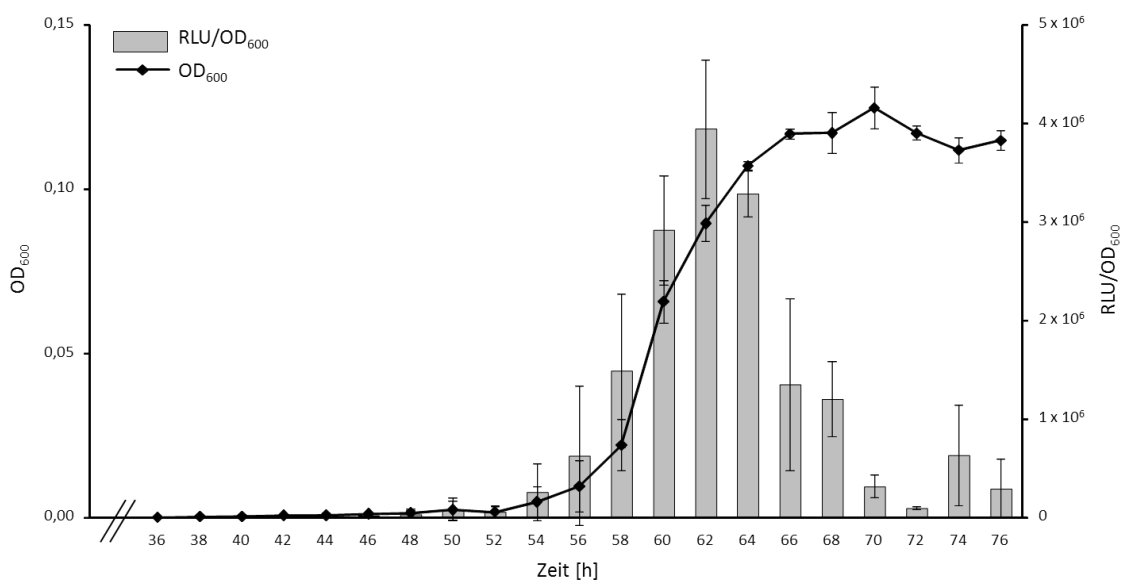


Abb. 18: Transkriptionsaktivität von P_{reiD} des Reporterstammes 14028 $P_{reiD}::lux$ während des Wachstums in MI-Medium. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Kulturen wurden die ersten 36 Stunden in Greiner-Röhrchen stehend inkubiert, bevor sie in Mikrotiterplatten zur weiteren Inkubation und zweistündlichen Messung überführt wurden.

Da für AraC-ähnliche Transkriptionsfaktoren autoregulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Hamilton & Lee, 1988, Porter *et al.*, 2004, Morin *et al.*, 2010), wurde im Folgenden untersucht, ob und wie P_{reiD} auf eine Überexpression des AraC-ähnlichen $ReiD$ reagiert. Dazu wurde der Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ mit $pBR-reiD$ transformiert und in LB-Medium kultiviert. Dabei war eine 6,6-fache Erhöhung der Promotoraktivität von $reiD$ im Vergleich zum Kontrollstamm zu beobachten (Abb. 19), was die Hypothese der Autoregulation bestärkt. In MI-Medium wiesen die Stämme 14028 $P_{reiD}::lux$ $pBR-reiD$ ($9,5 \times 10^5$ RLU/OD₆₀₀ \pm 5,5 %) und 14028 $P_{reiD}::lux$ nur einen geringen Unterschied in Ihrer Signalstärke auf. Dies lässt vermuten, dass die Transkription von $reiD$ in MI-Medium bereits im Bereich des maximal Möglichen liegt und eine weitere, künstliche Erhöhung der $ReiD$ -Konzentration keinen Einfluss auf dessen Transkription bewirkt.

Um die Bedeutung von $ReiD$ für die Regulation der weiteren Gene der genomischen Insel GEI4417/4436 zu untersuchen, wurden Reporterstämme mit chromosomalen $luxCDABE$ -Fusionen für alle iol -Gene hergestellt. Dazu wurden die Enden der polycistronischen iol -Operons oder iol -Gene mit dem lux -Reporter fusioniert, um auch intragenische Bindung von Regulationsfaktoren detektieren zu können. Die Stämme wurden anschließend mit $pBR-reiD$ transformiert und deren Wachstum und Biolumineszenz in LB-Medium gemessen.

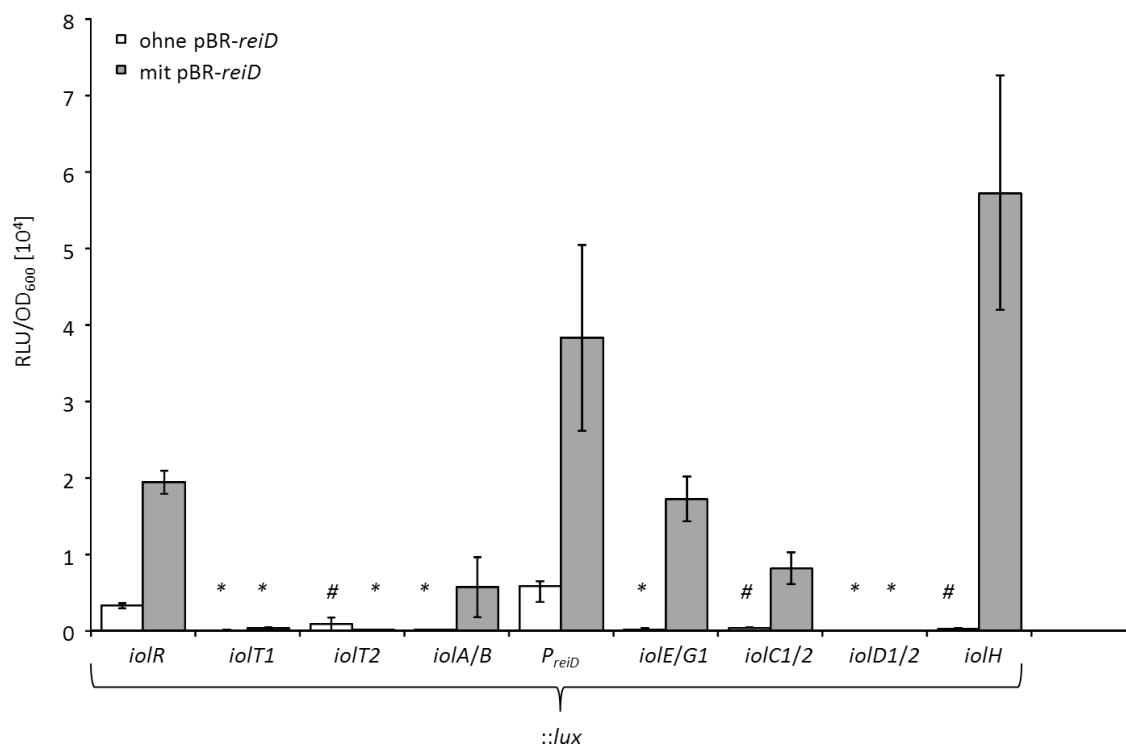


Abb. 19: *ReiD* induziert die eigene Transkription sowie die von *iolR*, *iolA/iolB*, *iolE/iolG1*, *iolC1/iol2* und *iolI2/iolH*. Zur Herstellung der Reporterstämme wurde die Luciferase-Kassette direkt hinter die jeweiligen *iol*-Gene in das Chromosom integriert. Zur Analyse der *reiD* Transkription wurde *luxCDABE* mit dem *reiD* Promotor fusioniert. Die mit pBR-*reiD* transformierten Stämme wurden dann in LB-Medium mit Chloramphenicol in Mikrotiterplatten schüttelnd inkubiert. Zuvor durchgeführte Plattierungsexperimente zeigten, dass pBR-*reiD* auch ohne Tetracyclin stabil in den Zellen bleibt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der maximalen RLU/OD₆₀₀-Werte, die während des exponentiellen Wachstums dreier biologischer Replikate mit je drei technischen Replikaten gemessen wurden. Werte unter dem Kontroll-Grenzwert von 200 RLU/OD₆₀₀ sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Werte unter 10³ RLU/OD₆₀₀ sind durch eine Raute (#) markiert. Abbildung modifiziert nach Rothhardt *et al.* (2014).

Unter Standardbedingungen in LB-Medium liegt die Biolumineszenz aller Reporter, außer von den beiden Regulatoren *iolR* und *reiD*, unter dem Schwellenwert von 10³ RLU/OD₆₀₀. Unter diesen Bedingungen bindet der Repressor *IoIR* an die Promotoren aller polycistronischen *iol*-Operons und *iol*-Gene, außer an $P_{iolE/iolG1}$ und $P_{iolI2/iolH}$ (Kröger, 2010) (siehe auch 3.2.8 und 3.4.1). Durch die erhöhte Expression von *reiD* stieg die Expression von *iolA/iolB* um den Faktor 38 und von *iolC1/iolC2* um das 19-Fache. Die stärksten Expressionssteigerungen waren bei *iolE/iolG1* mit dem Faktor 90 sowie bei der 213-fachen Induktionserhöhung von *iolI2/iolH* zu messen. Diese Daten zeigen deutlich, dass *ReiD* nicht nur P_{iolE} aktiviert, sondern auch die Expression von *iolA/iolB* und *iolC1/iol2* induziert und somit relevant für die Regulation von sechs essentiellen *iol*-Genen ist. Die höchste Induktion war bei dem Transkript *iolI2/iolH* zu messen, wobei weder diese beiden Gene essentiell sind noch P_{iolI2} von *IoIR* gebunden wird (Kröger & Fuchs, 2009). Neben den beiden MI-Transportern *iolT1* und *iolT2* zeigte auch *iolD1/iolD2* keinerlei Expressionsänderung in Gegenwart von pBR-*reiD*.

Interessanterweise wurde auch eine Induktion von *ioIR* durch die Überexpression von *reiD* gemessen, was einen Rückkopplungskreislauf möglich erscheinen lässt.

3.2.7 ReiD bindet an P_{ioIE} und an seinen eigenen Promotor

Um die direkte Interaktion zwischen ReiD und den Promotoren P_{ioIE} und P_{reiD} zu untersuchen, wurde der Regulator mittels pBAD-Myc/His-*reiD* in *E. coli* TOP10 überexprimiert, aufgereinigt und in GMSA verwendet. Dazu wurden jeweils 300 bp lange PCR-Produkte hergestellt, die die Promotorregionen von *ioIE* bzw. *reiD* trugen. Das PCR-Produkt, das mit 200 bp Länge die Promotorregion von *argS* trug, diente dabei als kompetitive Negativkontrolle (Abb. 20).

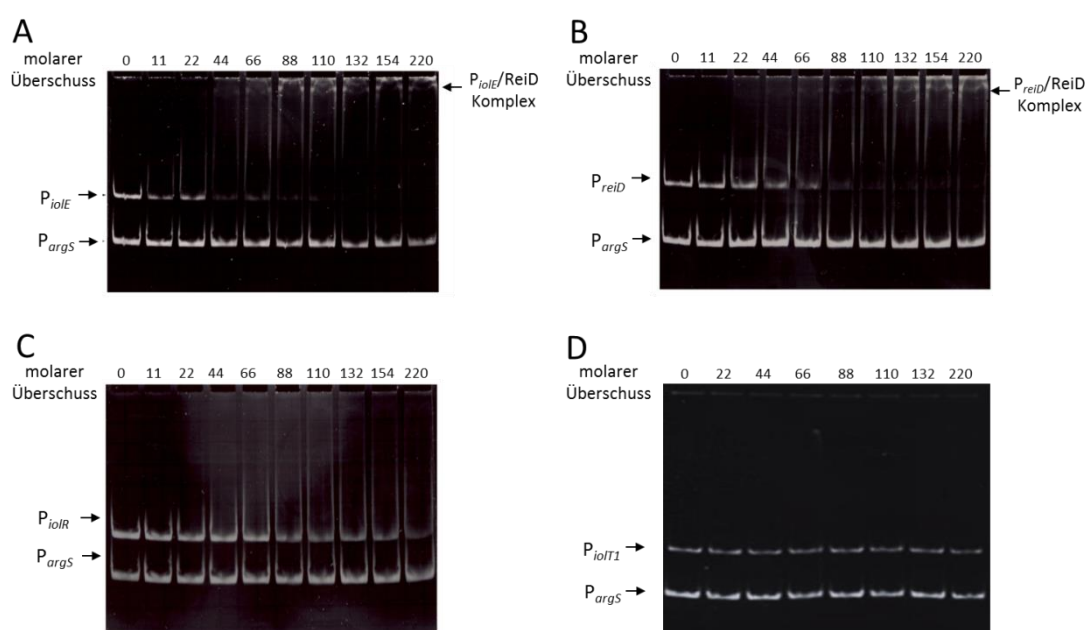


Abb. 20: GMSA zur Bindung von ReiD an P_{ioIE} und P_{reiD} . Ansteigende Mengen des aufgereinigten ReiD wurden jeweils mit 100 ng der 300 bp langen Promotorfragmente von *ioIE/G1* (A), *reiD* (B), *ioIR* (C) und *ioIT1* (D) gemischt. Als Kontrolle dienten 100 ng des 200 bp langen P_{argS} -Fragmentes. Die Bildung eines spezifischen Protein/DNA-Komplexes bestätigte die Bindung von ReiD an P_{ioIE} und P_{reiD} . Den Ansätzen, die mit einem molaren Überschuss von 0 gekennzeichnet sind, wurde kein ReiD hinzugegeben. Abbildung entnommen aus Broadley (2011).

Die GMSA mit P_{ioIE} (Abb. 20 A) und P_{reiD} (Abb. 20 B) zeigten eine deutliche Komplexbildung zwischen diesen Promotoren und ReiD bei einem molaren Überschuss von ReiD von 44 bzw. 88. Dies bestätigt die Hypothese der Autoregulation von ReiD und der direkten Induktion von *ioIE/ioIG1*. Um die Bindung von ReiD an die übrigen Promotoren relevanter Gene der GEI4417/4436 zu untersuchen, wurden GMSA auch mit den Promotorfragmenten von *ioIR*, *ioIT1*, *ioIT2*, *ioIA*, *ioIC1*, *ioID1* und *ioII2* durchgeführt (siehe dazu auch Broadley (2011)). Abb. 20 C zeigt dabei eine sehr schwache Bindung von ReiD an P_{ioIR} , was ein weiteres Indiz für die Hypothese des Rückkopplungskreislaufs zwischen den beiden Regulatoren ist. Die übrigen getesteten

Promotoren zeigten keinerlei Interaktion mit ReiD. Als repräsentatives Ergebnis ist der GMSA von P_{ioIT1} dargestellt (Abb. 20 D). Das Ergebnis, dass ReiD auch nicht an die Promotoren von *ioIA* und *ioIC1* bindet, entspricht nicht den Erwartungen aus den vorangegangenen Ergebnissen (Abb. 19). Würde hier von einer sehr schwachen Bindung ausgegangen werden, so korreliert es jedoch mit der relativ geringen transkriptionellen Antwort der beiden entsprechenden Reporter auf die ReiD-Überexpression.

3.2.8 Die Transkription von *reiD* wird durch IoIR reprimiert

Es wurde bereits von KRÖGER gezeigt, dass die Promotoren aller Gene der GEI4417/4436, die für Enzyme des MI-Katabolismus kodieren, sowie der Promotor von *ioIR* von IoIR gebunden und reprimiert werden (Kröger, 2010). Diese Repression wird jedoch unter MI-Kulturbedingungen aufgehoben, sodass die jeweiligen Gene transkribiert werden. Da die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinwiesen, dass *reiD* abhängig von MI im Kulturmedium reguliert wird, wurden GMSA zur Analyse der Interaktion von IoIR und P_{reiD} durchgeführt. Dazu wurde IoIR mittels pET-*ioIR* in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert, aufgereinigt und zusammen mit dem 300 bp langen PCR-Produkt, das P_{reiD} trug, für GMSA eingesetzt (Abb. 21).

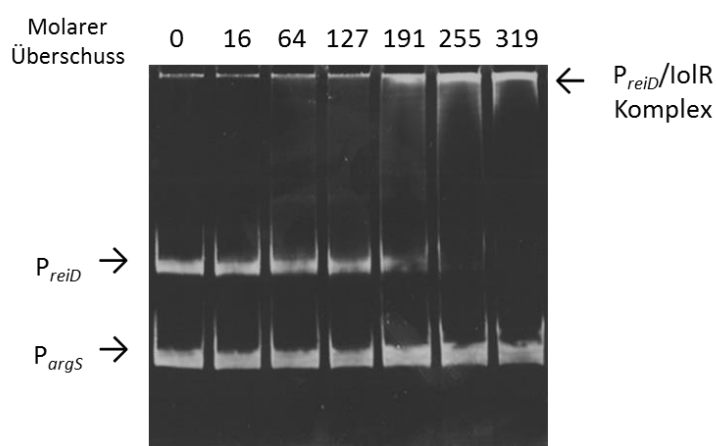


Abb. 21: GMSA zur Bindung von IoIR an P_{reiD} . Ansteigende Mengen von IoIR wurden jeweils mit 100 ng des 300 bp langen Promotorfragmentes von *reiD* gemischt. 100 ng des 200 bp langen P_{argS} -Fragments dienten als negative und kompetitive Kontrolle. Ab einem molaren ReiD-Überschuss von ca. 200 ist die Bildung des P_{reiD} /IoIR-Komplexes zu beobachten. Der molare Überschuss von 0 entspricht einem Ansatz ohne ReiD. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

Die Gelmobilitätsstudie zeigt deutlich eine Bindung von IoIR an den Promotor von *reiD* bei einem molaren Überschuss von annähernd 200. Um die Hypothese zu bestätigen, dass IoIR durch diese Bindung die Expression von *reiD* reprimiert, wurde der chromosomale $P_{reiD}::luxCDABE$ -Reporter in den Stamm 14028 $\Delta ioIR$ integriert. Der daraus resultierende Stamm 14028 $\Delta ioIR$ $P_{reiD}::lux$ sowie der Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ wurden dann in LB-Medium kultiviert und die Promotoraktivitäten von P_{reiD} miteinander verglichen (Abb. 22).

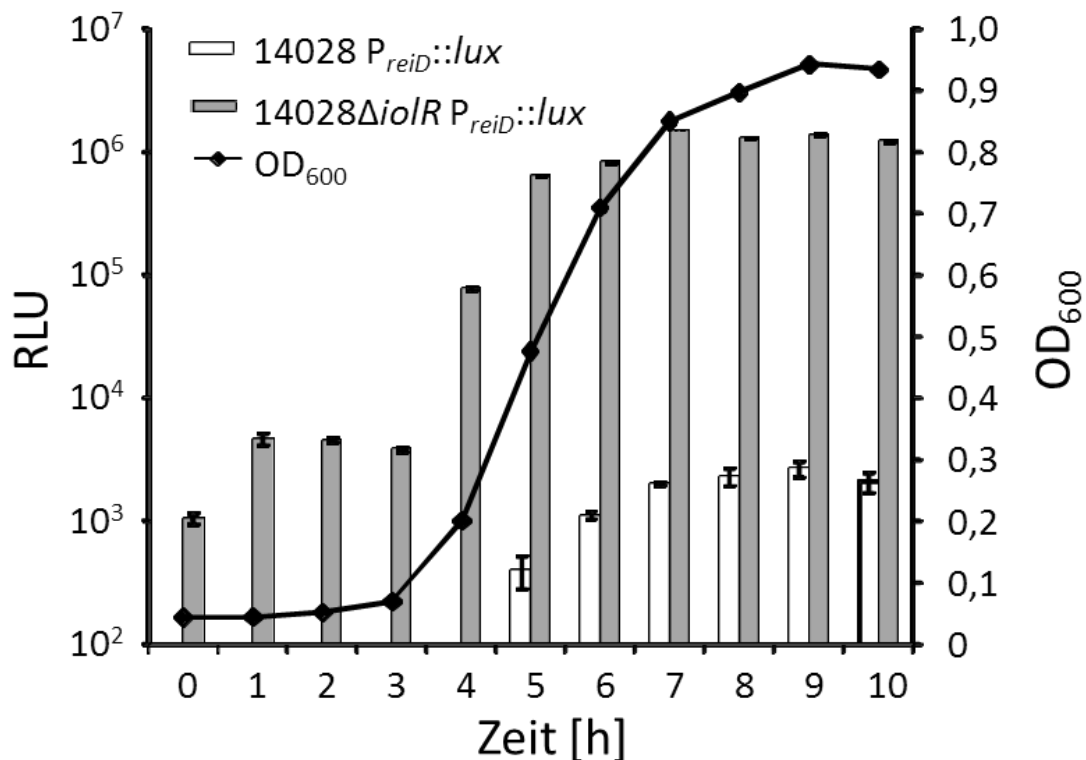


Abb. 22: Transkriptionelle Aktivität von P_{reiD} in 14028 und 14028 $\Delta iolR$ in LB-Medium. Die Wachstumskurven beider Stämme waren identisch, sodass nur die OD₆₀₀-Messwerte des Stamms 14028 $P_{reiD}::lux$ dargestellt sind. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander in Mikrotiterplatten mit je drei technischen Replikaten durchgeführt. Dargestellt sind somit die Mittelwerte und Standardabweichungen von insgesamt 9 Kulturen pro Messpunkt. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

Durch die Deletion von $iolR$ stieg die maximale Aktivität des $reiD$ -Promotors von $3,6 \times 10^3$ RLU/OD₆₀₀ ($\pm 18,7\%$) auf $1,5 \times 10^6$ RLU/OD₆₀₀ ($\pm 2,1\%$), was einer Induktion um den Faktor 553 entspricht. Dieser Phänotyp konnte wiederum durch die Komplementation von $iolR$ im Stamm 14028 $\Delta iolR$ $P_{reiD}::lux$ pBR- $iolR$ auf $4,7 \times 10^4$ RLU/OD₆₀₀ ($\pm 3,2\%$) reduziert werden. Im Gegensatz zu Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ war der Reporter im $\Delta iolR$ -Hintergrund bereits in der lag-Phase aktiv. Die leichte Überexpression von $iolR$ im Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ pBR- $iolR$ reduzierte die Promotoraktivität von $reiD$ nur leicht auf $2,4 \times 10^3$ RLU/OD₆₀₀ ($\pm 3,9\%$) im Vergleich zu $3,6 \times 10^3$ RLU/OD₆₀₀ von Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ in LB-Medium. Das deutet darauf hin, dass die Transkription von $reiD$ unter LB-Bedingungen im Wildtyp bereits nahezu maximal von $iolR$ reprimiert wird.

Während des Wachstums in MI-Medium zeigte der Stamm 14028 $\Delta iolR$ $P_{reiD}::lux$, neben der bereits beschriebenen verkürzten lag-Phase und fehlenden Bistabilität (Kröger *et al.*, 2011), eine maximale P_{reiD} -Aktivität von $1,2 \times 10^6$ RLU/OD₆₀₀ ($\pm 2,4\%$). Diese ist vergleichbar hoch mit der von Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ pBR- $reiD$ ($9,5 \times 10^5$ RLU/OD₆₀₀) und 14028 $P_{reiD}::lux$ ($3,9 \times 10^6$ RLU/OD₆₀₀) in MI-Medium. Dadurch erhärtet sich die Annahme, dass künstlich erhöhte Mengen von $ReiD$ keinerlei induzierenden Effekt auf

die Transkription von *reiD* unter MI-Bedingungen haben. Die Feststellung, dass die transkriptionelle Aktivität von P_{reiD} durch pBR-*reiD* nur um das 6,6-Fache in LB-Medium induziert wird (siehe 3.2.6), führt zu der Annahme, dass IoLR und ReiD um die Bindung an P_{reiD} in der Abwesenheit von MI konkurrieren. Diese Vermutung ist dahingehend plausibel, da der stärkste Effekt der ReiD Überproduktion auf die Transkription von *iolE/iolG1* und *iolI2/iolH* gemessen wurde (siehe 3.2.6) und die Promotoren dieser beiden Transkripte als Einzige der GEI4417/4436 nicht von IoLR gebunden werden (Kröger & Fuchs, 2009).

3.2.9 Test verschiedener Kulturbedingungen zur Stimulierung der *iol*-Promotoren

Wie gezeigt werden konnte, stimuliert MI-Medium die Aktivität von P_{reiD} und aller anderen Gene und Operons der GEI4417/4436. Neben MI als Signal für die Expressionsaktivierung wurden in weiteren Experimenten verschiedene Kulturbedingungen getestet, um weitere Stimulanzen der *iol*-Genexpression zu identifizieren.

Auf LB-Medium reagierte keiner der chromosomalen Reporter mit starken Signalen (siehe Abb. 19 und Tab. 20). Dies bestätigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen, die mit pDEW201 als episomalen *lux*-Reporter durchgeführt wurden (Kröger & Fuchs, 2009). Da CO₂ bzw. Bicarbonat die Dauer der lag-Phase in MI-Medium deutlich reduzieren (Kröger *et al.*, 2011), wurde die transkriptionelle Aktivität aller essentiellen Gene bzw. polycistronischen Operons der genomischen Insel mittels chromosomaler *lux*-Reporter in der Gegenwart von 5 % CO₂ bzw. 0,1 % Natriumhydrogencarbonat in LB-Medium gemessen. Auch unter diesen Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied zu den Standardbedingungen in LB-Medium beobachtet werden. Um zu prüfen, ob die lag-Phasendauer verkürzende Wirkung von CO₂ durch ReiD vermittelt wird, wurde der Stamm 14028 Δ *reiD* pET-*iolE/iolG1* in MI-Medium mit und ohne CO₂ inkubiert. Dabei war der massive Effekt von CO₂ auf die Dauer der lag-Phase weiterhin vorhanden. So zeigte der Stamm ohne CO₂ eine lag-Phase von 76 h, wohingegen mit CO₂ nur 36 h bis zum Beginn der log-Phase vergingen. Der Einfluss verschiedener weiterer Kulturbedingungen auf die Aktivität von P_{reiD} wurde mit LB-Medium pH 6,0, LB-Medium mit 0,3 M NaCl, Dünndarm-simulierendem Medium (SIEM), Dickdarm-simulierendem Medium (SCEM) oder SPI-2 induzierendem LPM-Medium getestet (Abb. 23).

Es konnte keine signifikante Induktion von P_{reiD} in den verschiedenen Kulturbedingungen gegenüber LB-Medium beobachtet werden. Dies zeigt, dass ein entsprechender Stimulus zur Induktion von P_{reiD} unter diesen Bedingungen fehlt. Um

den Einfluss von SsrA/SsrB auf den MI-Metabolismus zu untersuchen, wurden die Reporterstämme der essentiellen *iol*-Gene in LPM-Medium pH 5,8 kultiviert, da dieses Medium SsrB induziert und aktiviert (Deiwick *et al.*, 1999, Coombes *et al.*, 2004).

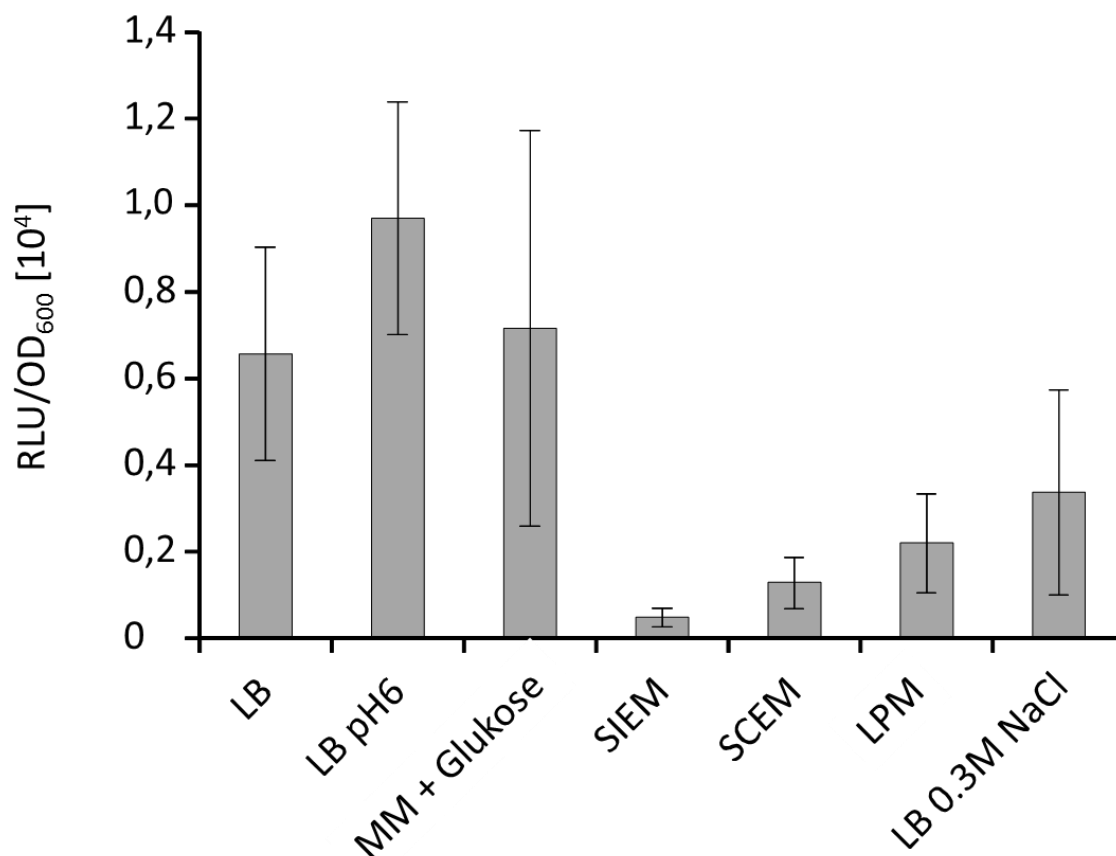


Abb. 23: Transkriptionelle Aktivität von P_{reiD} unter verschiedenen Kulturbedingungen. Stamm 14028 $P_{reiD}::lux$ wurde in Mikrotiterplatten in den genannten Kulturmedien schüttelnd inkubiert. Aus den maximal gemessenen RLU/OD_{600} -Werten pro Well wurden Mittelwerte und Standard-abweichungen berechnet. Pro Kulturbedingung wurden drei biologische Replikate in jeweils 3 Wells gemessen. Gegenüber den LB-Standardbedingungen wurde keine Induktion von P_{reiD} beobachtet. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

Im Gegensatz zur Positivkontrolle 14028 $sseA::lux$, die eine Aktivität von $7,4 \times 10^6$ RLU/OD_{600} ($\pm 8,9\%$) aufwies, änderte kein Gen der GEI4417/4436 signifikant sein Expressionslevel unter den beschriebenen Bedingungen im Vergleich zu LB-Medium. Diese Ergebnisse werden auch durch Zellkulturversuche unterstützt. Dabei wurden Caco-2 Zellen mit den Reporterstämmen 14028 $pDEW-P_{ioIE}$ oder 14028 $pDEW-P_{sseA}$ infiziert und die Biolumineszenz und Replikation von *S. Typhimurium* gemessen (Abb. 24). *sseA* wurde als Positivkontrolle gewählt, da dieses Gen Teil der SPI-2 ist und sein Promotor von dem SPI-2 Hauptregulator SsrB gebunden und induziert wird (Walthers *et al.*, 2007).

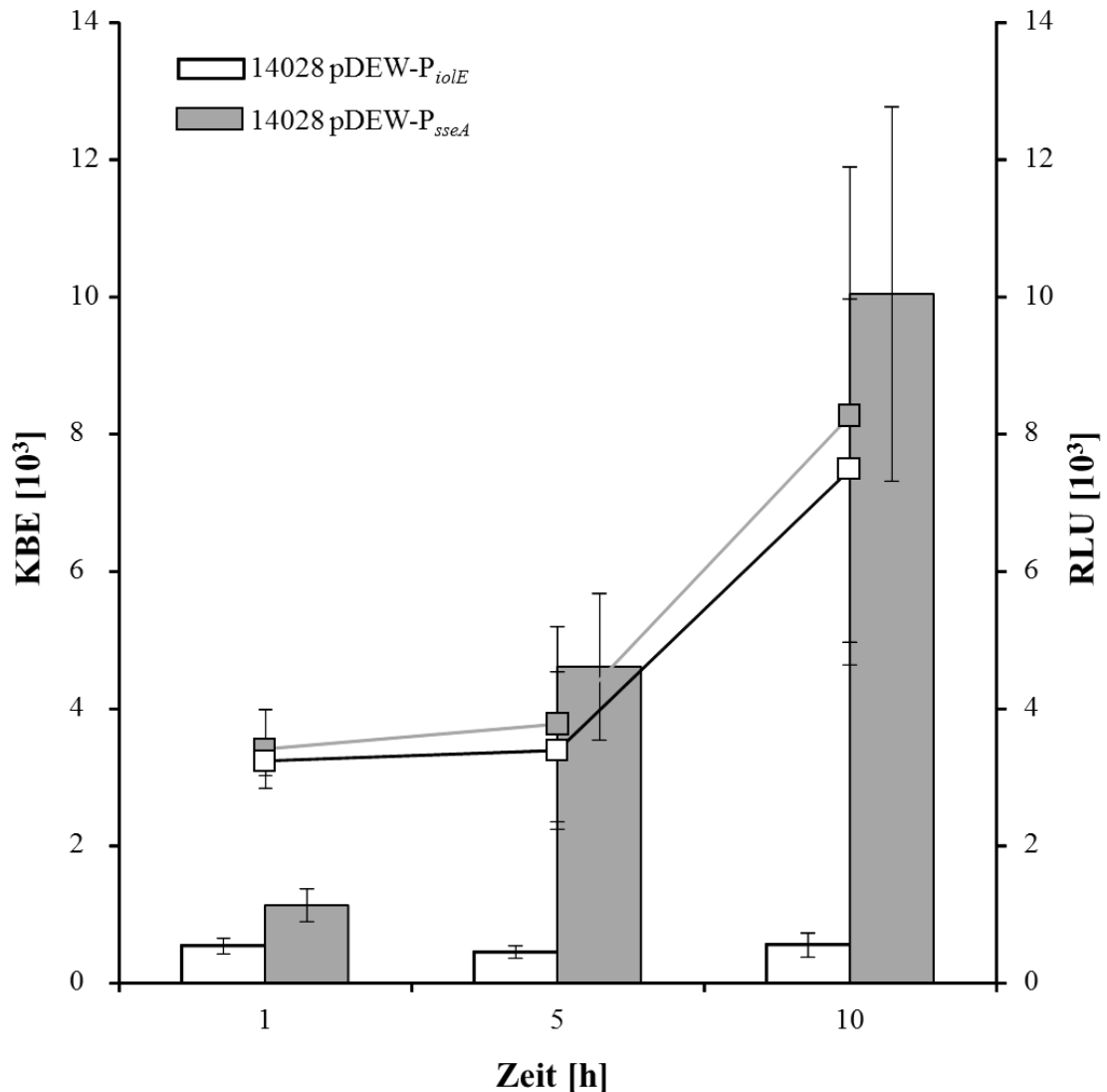


Abb. 24: Proliferation und Promotoraktivität von 14028 pDEW-P_{icolE} und 14028 pDEW-P_{sseA} in Caco-2 Zellen. Die *S. Typhimurium*-Stämme wurden im Verhältnis 10:1 auf die Caco-2 Zellen gegeben und für 10 h kultiviert. Nach 1, 5 und 10 h wurde die Biolumineszenz der Kulturen gemessen. Danach wurden die eukaryotischen Zellen lysiert und das Lysat auf LB-Agar zur Bestimmung der KBE ausplattiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 3 biologischen Replikaten pro Zeitpunkt. Die Bestimmung der KBE erfolgte ebenfalls in Triplikaten. Abbildung entnommen aus Rothhardt *et al.* (2014).

Die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) verdoppelte sich im Zeitraum zwischen der 5. und 10. Stunde der Inkubation. Die Aktivität von P_{sseA} nahm über den gesamten Messzeitraum von 9 Stunden um den Faktor 8,9 auf $1,0 \times 10^4$ RLU/Well zu. Die Aktivität von P_{icolE} blieb hingegen stets bei 5×10^2 RLU/Well. Dies legt nahe, dass die Expression des für den MI-Katabolismus essentiellen *icol*-Gens innerhalb der ersten 10 Stunden des Infektionsgeschehens nicht stattfindet. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression der *icol*-Gene und von *reiD* unter *in vitro*-Bedingungen nur in MI-Medium induziert wird.

3.3 Die sRNA RssR wird von SsrB induziert und ist durch die Stabilisierung der mRNA *reiD* Teil des Regulons des MI-Metabolismus in *S. Typhimurium*

In diesem Abschnitt wird die Identifizierung und phänotypische Charakterisierung der sRNA RssR beschrieben sowie deren Regulation und Funktion untersucht.

3.3.1 Identifizierung von zwei sRNAs, die auf der GEI4417/4436 kodiert sind

In einer auf RNA-seq-basierenden Transkriptomanalyse konnten 280 sRNAs in dem *S. Typhimurium* Stamm 4/74 identifiziert werden (Kröger *et al.*, 2012, Kröger *et al.*, 2013). Von diesen liegen die zwei sRNAs *STnc1740* (180 nt) und *STnc2160* (64 nt) mit 123 bp dicht nebeneinander innerhalb der GEI4417/4436 und sind in Position und Sequenz zu 100 % konserviert im Vergleich zu den gängigen Laborstämmen LT2, SL1344 und 14028. Durch ihre Lage und ihre strenge Assoziation mit der genomischen Insel wurde die Hypothese aufgestellt, dass *STnc1740* und *STnc2160* Einfluss auf den MI-Katabolismus haben. Dies wurde im Folgenden untersucht. Wie bereits gezeigt werden konnte, weisen *STnc1740* und *STnc2160* unter 22 verschiedenen *in vitro* Wachstumsbedingungen unterschiedliche Expressionsmuster auf (Kröger *et al.*, 2013). *STnc1740* wurde unter allen Bedingungen exprimiert (Abb. 25). In LB-Medium war die Expression von *STnc1740* in der log-Phase hochreguliert, wohingegen in der frühen stationären Phase eine Abnahme des Expressionsniveaus messbar war. Das höchste Expressionslevel erreichten sowohl *STnc1740* als auch *STnc2160* durch den anaeroben Schock (Abb. 25). Im Gegensatz zu *STnc1740* wurde *STnc2160* auch mittels colP (*co-immunoprecipitation, Ko-Immünpräzipitation*) und FLAG-markiertem Hfq detektiert (Chao *et al.*, 2012, Kröger *et al.*, 2012). Die Bindung von Hfq an *STnc2160* weist darauf hin, dass die sRNA an der post-transkriptionellen Regulation einer *trans*-kodierten mRNA beteiligt sein könnte. Die phylogenetisch starke Restriktion der beiden sRNAs zur GEI4417/4436 verstärkte die Vermutung, dass die Ziel-mRNA von der genomischen Insel stammt. Die Sequenz von *STnc2160* befindet sich zum größten Teil in der 3'-UTR (3'-untranslatierten Region) von *iolB* und weist einen Überhang von 12 nt zu diesem essentiellen *iol*-Gen auf. Der Promotor von *STnc2160* befindet sich vermutlich innerhalb der kodierenden Region von *iolB* (Abb. 25). *STnc1740* liegt hingegen in der intergenischen Region zwischen *iolT2* und *iolB* und weist zwei Transkriptionsstartpunkte auf, die 43 bp voneinander entfernt sind (Kröger *et al.*, 2013). Aufgrund der im Folgenden beschriebenen Experimente wurde *STnc2160* als RssR benannt, da diese sRNA eine *reiD* mRNA-stabilisierende sRNA ist.

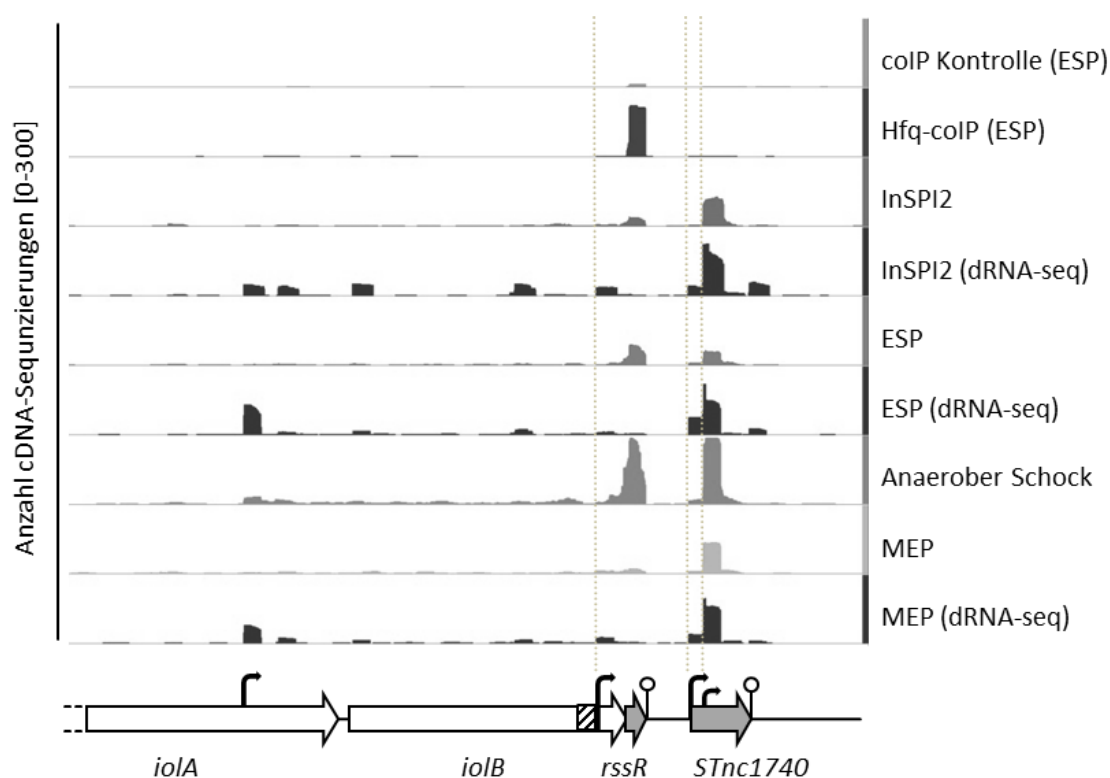


Abb. 25: Identifizierung von *STnc1740* und *rssR* innerhalb der GEI4417/4436 nach Kröger (Kröger *et al.*, 2012, Kröger *et al.*, 2013). Die normalisierten und gegen die DNA-Sequenz des minus-Strangs zugeordneten cDNA-Kopien sind für den Bereich der Gene *iolA* und *iolB* der GEI4417/4436 mit Hilfe des Integrated Genome Browsers dargestellt (Nicol *et al.*, 2009). Die Skala (0-300) entspricht der Anzahl der cDNA-Sequenzierungen. dRNA-seq: differenzierende RNA-seq. Bei dieser Methode wird die Probe vor der Sequenzierung mittels Terminator Exonuklease (TEX) verdaut, um selektiv die RNA mit 5'-Monophosphat (primäre Transkripte) zu degradieren. Die bereits prozessierte RNA (sekundäre Transkripte) ist durch das 5'-Triphosphat vor diesem Verdau geschützt, so dass durch die Sequenzierung beider Proben zwischen primären und sekundären Transkripten differenziert werden kann. Die Wachstumsbedingungen waren: InSPI2 (SPI-2-induzierendes Medium: PCN-Medium (pH 5,8; 0,4 mM P_i) OD 0,3 (Lober *et al.*, 2006)); ESP (frühe stationäre Phase: Kultivierung in LB-Medium bis OD 2,0); Anaerober Schock (Wachstum in LB-Medium bis OD 0,3, dann 50 ml in Greinerröhrchen überführen und 30 min bei 37 °C stehend inkubieren); MEP (Mittlere exponentielle Phase, Kultivierung bis OD 0,3); Hfq-coIP und coIP Kontrolle (Kultivierung in LB-Medium bis OD 2,0 (Chao *et al.*, 2012)). Proteinkodierende Gene sind weiß, die der sRNAs grau dargestellt. Die abgerundeten Pfeile stellen die potentiellen Transkriptionsstarts dar. Kreise stehen für ρ -unabhängige Terminatoren, die durch den TransTermHP Algorithmus vorhergesagt wurden (Kingsford *et al.*, 2007). Die SsrB Binderegion, die mittels CHIP identifiziert wurde, ist mit schwarzer Schraffur dargestellt (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010).

Um die Bedeutung von *RssR* und *STnc1740* für den MI-Katabolismus in Stamm 14028 zu untersuchen, wurde zuerst die Expression der beiden sRNAs in MI-Medium und MM-Glukose gemessen. Dazu wurde der Wildtyp-Stamm 14028 jeweils in den beiden Medien kultiviert und die Gesamt-RNA zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums isoliert. Mittels Northern Blots erfolgte danach die Detektion der beiden sRNAs (Abb. 26).

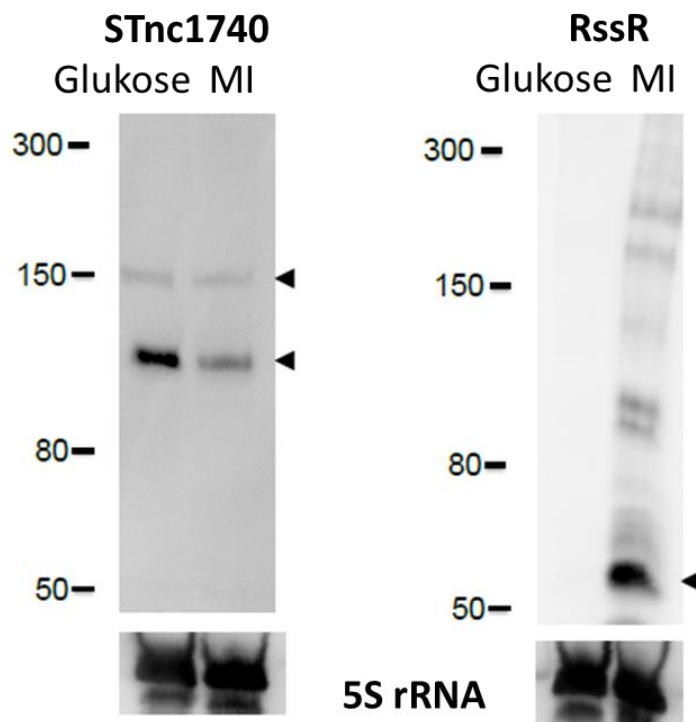


Abb. 26: Northern Blot von Stnc1740 und RssR. Die RNA wurde bei OD = 0,3 von Kulturen isoliert, die in MM-Glukose oder MI-Medium wuchsen. 5 µg Gesamt-RNA wurde in die Geltaschen des 7 %-igen Harnstoff-PAA gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die RNA auf eine Nylonmembran geblottet und mittels einzelsträngiger DIG-markierter Sonden STnc1740 (95 nt), RssR (64 nt) sowie 5S rRNA (als Ladekontrolle) detektiert. Die Pfeile zeigen die intensivsten Banden an. Der Größenmarker der RNA-Banden ist jeweils neben den Gelen dargestellt.

Unter Verwendung der RssR-Sonde wurde bei der RNA, die aus Zellen in MI-Medium isoliert wurde, eine ~64 nt große Bande detektiert. Dies entspricht der in der RNA-seq Studie bestimmten Größe der sRNA (Kröger *et al.*, 2012). Bei der RNA von den Zellen, die in MM-Glukose kultiviert worden waren, wurden hingegen mit derselben Sonde keine Hybridisierungssignale detektiert. Das Signal der 5S rRNA war in beiden RNA-Proben vergleichbar intensiv, sodass diese Kontrolle die Validität des Ergebnisses bestätigte. Wurden die beiden RNA-Proben mit der Sonde gegen STnc1740 hybridisiert, so waren jeweils zwei Banden mit ~150 nt und mit ~100 nt deutlich zu erkennen. Dies bestätigt das Vorhandensein der beiden STnc1740-Promotoren. Die Hybridisierungssignale der beiden Proben unterschieden sich jedoch in der Intensität. Die Expression des kleinen STnc1740-Transkripts war deutlich stärker in MM-Glukose als in MI-Medium. Die Expression des längeren STnc1740-Transkripts war hingegen unter beiden Bedingungen vergleichbar intensiv. Die vorhergesagte Länge von STnc1740 beträgt 180 nt (Kröger *et al.*, 2012). Der Grund für die verkürzten Banden könnte ein weiterer Terminator sein, der sich 5'-gelegen des vorhergesagten Terminators befindet.

3.3.2 STnc1740 und STnc2160 beeinflussen das Wachstumsverhalten von *S. Typhimurium* in MI-Medium

Um einen möglichen Einfluss von RssR auf die Nutzung von MI durch *S. Typhimurium* zu untersuchen, wurde die nicht-polare Deletionsmutante 14028 Δ *rssR* konstruiert, bei der die mit *iolB* überlappenden Nukleotide im Chromosom erhalten wurden (siehe Abb. 27).

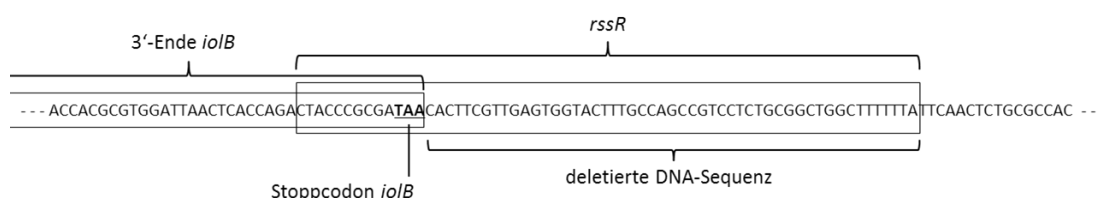


Abb. 27: Darstellung der Deletionsmutante 14028 Δ *rssR*. Das 3'-Ende von *iolB* überlappt mit den ersten 13 bp der 64 bp langen DNA-Sequenz von *rssR*. 14028 Δ *rssR* wurde durch die Deletion der markierten DNA-Sequenz konstruiert. Somit ist die DNA-Sequenz von *iolB* weiterhin intakt, wohingegen *rssR* deletiert wurde.

Dieser Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in der Generationszeit während des Wachstums in LB-Medium (Tab. 19).

Tab. 19: Generationszeit der sRNA-Mutanten in LB-Medium.

| Stamm | Generationszeit t_d [h] | SD [%] |
|---------------------------------------------|---------------------------|--------|
| 14028 | 1,15 | 1,65 |
| 14028 Δ <i>rssR</i> | 1,17 | 0,20 |
| 14028 Δ <i>rssR</i> pZE- <i>rssR</i> | 1,10 | 2,32 |
| 14028 Δ STnc1740 | 1,13 | 4,45 |
| 14028 Δ STnc1740 pZE-STnc1740 | 1,12 | 2,49 |

Wurden die beiden Stämme in MI-Medium kultiviert, so war eine signifikant (** $p \leq 0,01$) verlängerte Generationszeit der Mutante ($t_d (\Delta_{rssR}) = 6,62 \text{ h} \pm 10,2 \%$) im Vergleich zum Wildtypstamm ($t_d (14028) = 3,44 \text{ h} \pm 13,0 \%$) zu messen (Abb. 28). Die konstitutive Überexpression von RssR mittels pZE-*rssR* komplementierte die Deletion der sRNA, sodass die Generationszeit wieder auf das Niveau des Wildtypstammes sank ($t_d (\Delta_{rssR} \text{ pZE-}rssR) = 2,93 \text{ h} \pm 5,5 \%$). Die Überexpression von RssR im Wildtyp zeigte eine vergleichbar geringe Generationszeit ($t_d (14028 \text{ pZE-}rssR) = 2,95 \text{ h} \pm 12,3 \%$) (Abb. 28).

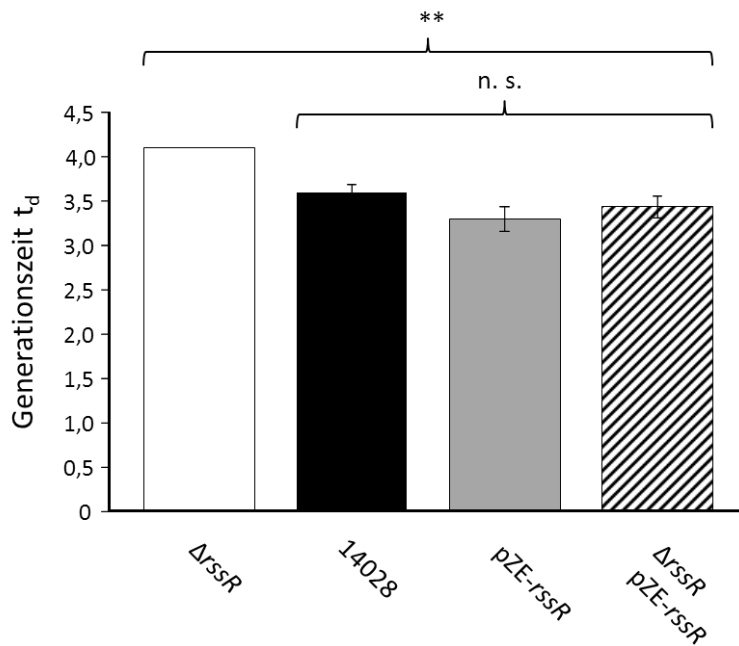


Abb. 28: Generationszeiten der *rssR*-Mutanten in MI-Medium. Die vier Stämme wurden in MI-Medium kultiviert und die Generationszeiten berechnet. **, $p \leq 0,01$; n.s., Unterschiede sind nicht signifikant

In beiden Stämmen, in denen RssR überexprimiert wurde, konnte eine höhere maximale optische Dichte OD_{600} im Vergleich zu den übrigen Stämmen detektiert werden (Abb. 29). Diese Daten zeigen, dass RssR einen positiven Effekt auf die Nutzung von MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle besitzt.

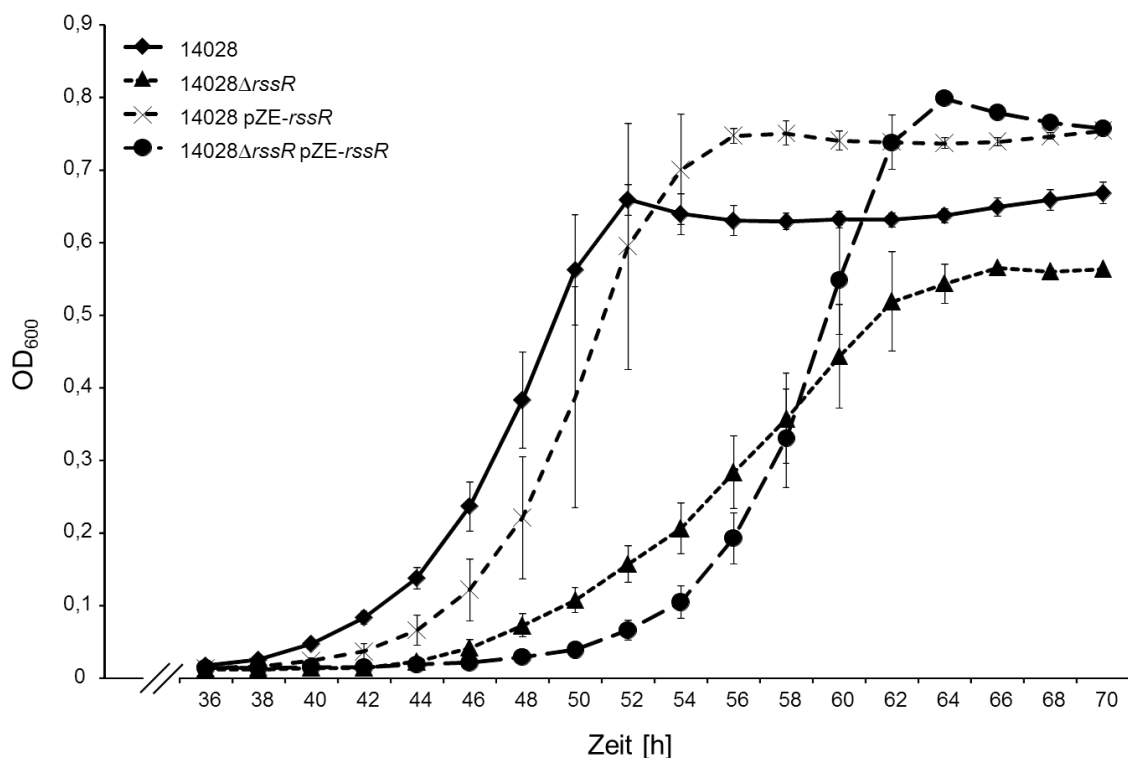


Abb. 29: Wachstum der *rssR*-Mutanten in MI-Medium. Die vier Stämme wurden in MI-Medium inokuliert, bei 37 °C stehend inkubiert und das Wachstum der Kulturen zweistündlich gemessen. Die konstitutive Überexpression von RssR bewirkte eine deutlich höhere optische Dichte in der stationären Phase. Die Komplementation mittels pZE-*rssR* stellte die wildtypische Generationszeit wieder her, die verzögerte lag-Phase des Deletionsstammes konnte hingegen nicht vollständig komplementiert werden.

Zur Untersuchung von *STnc1740* wurde identisch verfahren, wobei *STnc1740* basengenau vollständig deletiert wurde. Die Generationszeiten von 14028, *14028 Δ Stnc1740* und *14028 Δ STnc1740* pZE-*STnc1740* in LB-Medium unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab. 19). In MI-Medium war hingegen ein signifikanter Unterschied der Generationszeiten messbar: $t_d(14028) = 3,15 \text{ h} \pm 16,4 \%$; $t_d(14028\Delta Stnc1740) = 3,01 \pm 11,5 \%$ und $t_d(14028 \text{ pZE-}STnc1740) = 4,74 \text{ h} \pm 15,6 \%$ (Abb. 30). Die Deletionsmutante und der Wildtyp unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Beide Stämme zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,01$) in der Generationszeit im Vergleich zum Überexpressionsstamm *14028* pZE-*STnc1740*. Auch die Dauer der lag-Phase war in diesem Stamm deutlich verlängert, wohingegen die Deletion von *STnc1740* zu einer leichten Reduktion der Phasendauer führte (Abb. 30).

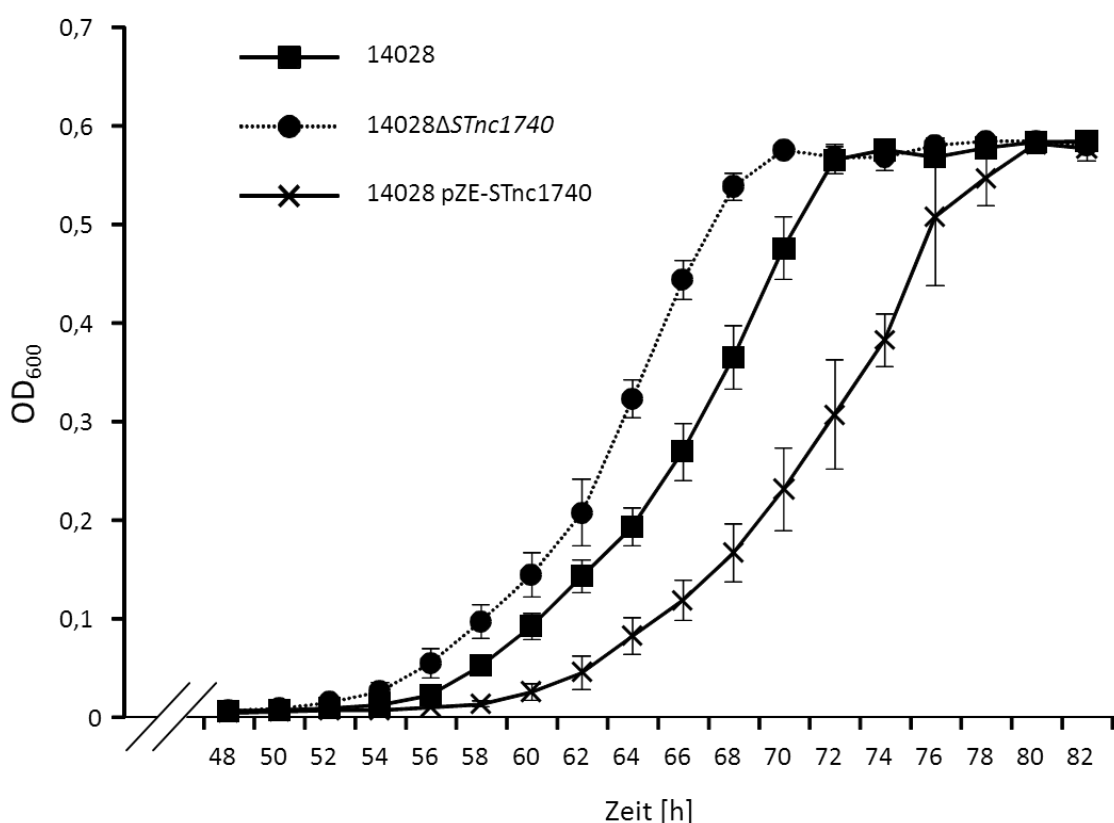


Abb. 30: Wachstum der *STnc1740*-Mutanten in MI-Medium. Die vier Stämme wurden in MI-Medium inokuliert, bei 37 °C stehend inkubiert und das Wachstum der Kulturen zweistündlich gemessen. Die konstitutive Überexpression von *STnc1740* bewirkte eine Verlängerung der lag-Phase (von 56 h auf 60 h) und der Generationszeit t_d .

Der Effekt von *Stnc1740* scheint somit, bezogen auf die Generationszeit, konträr zu dem von *RssR* zu sein. Im Fokus der weiteren Experimente lag die Untersuchung von *RssR*, da diese sRNA unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen exprimiert wird (Kröger *et al.*, 2013), einen positiven Effekt auf das Wachstum von *S. Typhimurium* in MI-Medium aufweist und eine Interaktion dieser sRNA mit Hfq beschrieben ist (Chao *et al.*, 2012).

3.3.3 SsrB bindet an P_{rssR} und induziert dessen Aktivität

Die Analyse der potentiellen Promotorregion von *rssR* ergab einen Hinweis darauf, dass der SPI-2-Hauptregulator SsrB an eine 60 bp lange DNA-Sequenz innerhalb von *iolB* bindet, die sich 76 bp 5'-gelegen von *rssR* befindet (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Da mehrere Hinweise auf eine Verbindung zwischen MI-Metabolismus und Virulenz in *S. Typhimurium* vorliegen (siehe 1.4.3), sollte geklärt werden, ob und wie *RssR* durch SsrB reguliert wird.

Unter Verwendung der Software *Neural Network Promoter Prediction Version 2.2* konnte eine 50 bp lange Promotorregion identifiziert werden, die 113 bp vor dem Transkriptionsstart von *rssR* beginnt (Reese, 2001). Zudem ergab die Analyse mittels der Software *BPROM* als wahrscheinlichste Bindestelle für einen Transkriptionsfaktor eine 8 bp lange Sequenz, die 120 bp 5'-gelegen von *rssR* liegt (Solovyev & Salamov, 2011). Diese beiden Ergebnisse bestärkten den Verdacht, dass es sich bei der mittels ChIP-on-chip-Untersuchung identifizierten SsrB-Bindestelle innerhalb von *iolB* tatsächlich um einen Promotor handeln könnte (siehe Abb. 31).

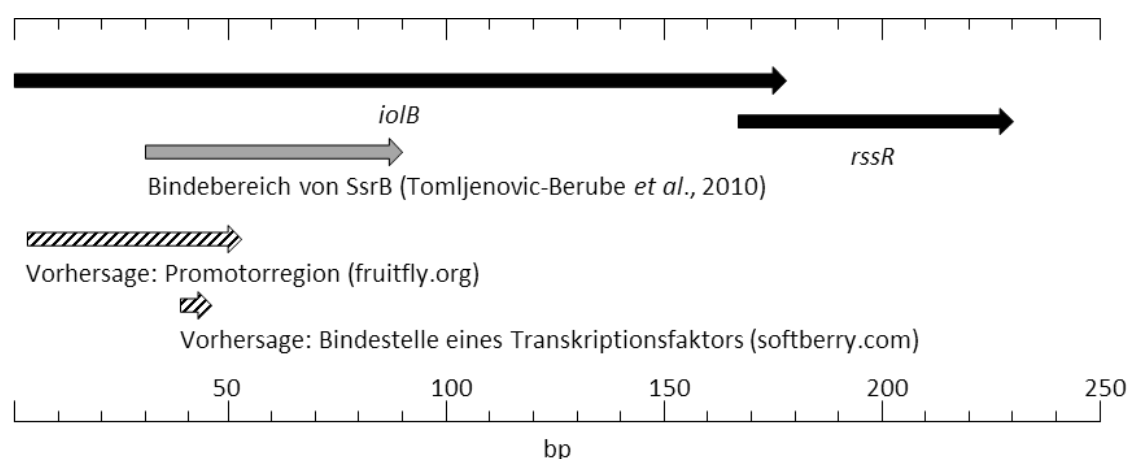


Abb. 31: Bioinformatische Verifizierung des postulierten Promotors P_{rssR} . Dargestellt sind die letzten 178 bp von *iolB* sowie die vollständige Position von *rssR* in schwarz. Die von Tomljenovic-Berube *et al.* (2010) in der genomweiten ChIP-on-chip Untersuchung identifizierte SsrB-Bindestelle innerhalb der Sequenz von *iolB* ist in grau vermerkt. Die 400 bp, die sich 5'-gelegen von *rssR* befinden, wurden mittels des *Neural Network Promoter Prediction*-Programms 2.2 (fruitfly.org) sowie durch das *BPROM-Prediction of bacterial promoters*-Programm (softberry.com) analysiert. Die Ergebnisse sind in schwarz-weißer Schraffur dargestellt.

Um die vorhergesagte Bindung von SsrB an den Promotor von *rssR* zu verifizieren, wurden Reporterstudien durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid $pBAD-ssrB_c$ konstruiert, das der Überexpression des C-Terminus von SsrB dient. Diese Domäne kann an DNA binden und die Transkription aktivieren, ohne dass SsrA zuvor eine Konformationsänderung hervorrufen muss (Feng *et al.*, 2004). Als Positivkontrolle

wurde der Stamm 14028 *sseA::lux* konstruiert, der eine chromosomale Fusion des Luciferase-Reporters mit *sseA* trägt. Dieser Stamm sowie 14028 *P_{rssR}::lux* wurden dann mit pBAD-*ssrB_c* oder pBAD/HisA(Tet^R) transformiert und in LB-Medium ohne und mit 1 mM Arabinose kultiviert. Die Aktivität von *sseA::lux* in Stamm 14028 *sseA::lux* pBAD-*ssrB_c* stieg durch die Induktion mittels Arabinose von $6,6 \times 10^3$ RLU/OD₆₀₀ \pm 5,9 % auf $6,5 \times 10^6$ RLU/OD₆₀₀ \pm 1,4 %. Das zeigt deutlich die Funktionalität von SsrB_c in diesem Reportersystem. Der Stamm 14028 *P_{rssR}::lux* pBAD-*ssrB_c* zeigte unter induzierenden Bedingungen im Vergleich zum nicht induzierten Stamm 14028 *P_{rssR}::lux* pBAD/HisA(Tet^R) eine um den Faktor 15,0 höhere RLU/OD₆₀₀ (Abb. 32).

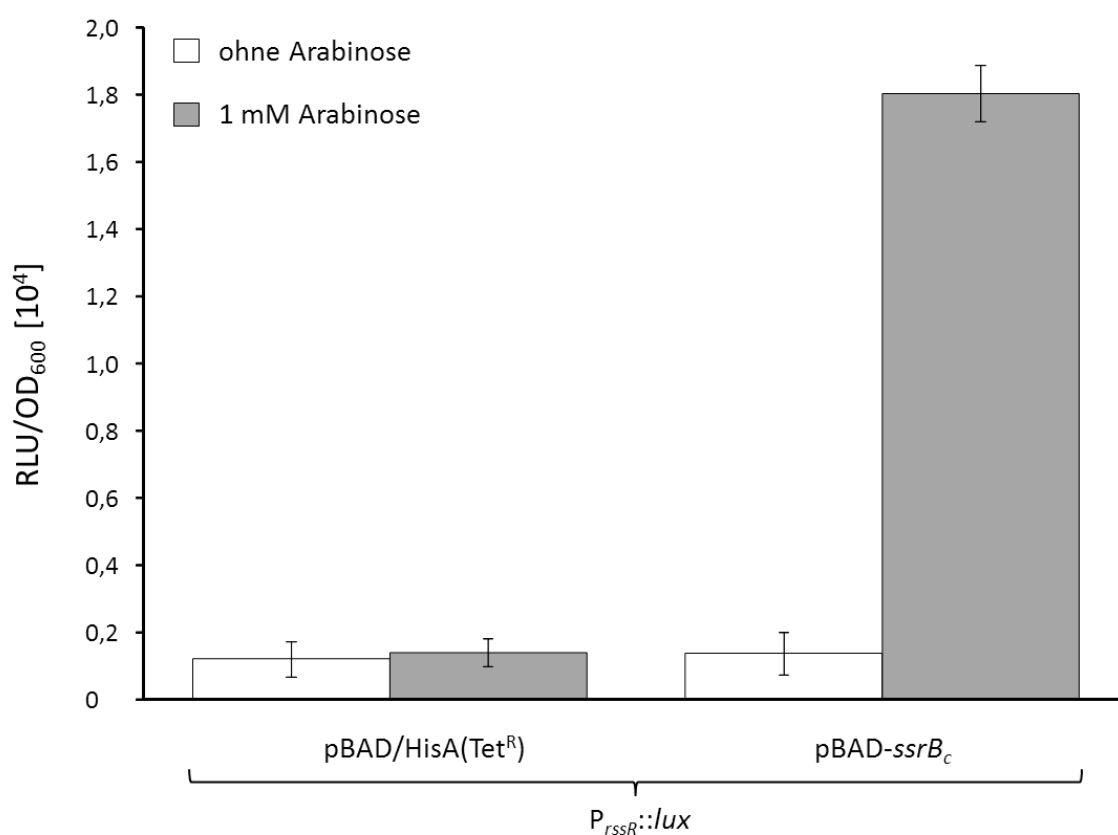


Abb. 32: Physiologische Wirkung von SsrB_c auf den Promotor von *rssR*. Der Reporterstamm 14028 *P_{rssR}::lux* wurde mit pBAD/HisA(Tet^R) oder pBAD-*ssrB_c* transformiert und in LB-Medium ohne oder mit 1 mM Arabinose kultiviert. Dargestellt sind die maximalen RLU/OD₆₀₀-Werte und Standardabweichungen von drei unabhängigen biologischen Replikaten zu je 3 Kavitäten.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden GMSAs mit *P_{rssR}* und SsrB_c durchgeführt. Dazu wurde SsrB_c mittels pBAD-*ssrB_c* in *E. coli* KB3 überexprimiert und isoliert. Dieser Stamm weist kein H-NS (Histon-ähnliches Nucleoid Strukturprotein) und H-NS-ähnliches Protein StpA auf (Böhme *et al.*, 2012), wodurch ausgeschlossen werden sollte, dass diese Proteine zusammen mit SsrB_c aufgereinigt wurden. Als kompetitive Negativkontrolle diente *P_{argS}* (Kröger & Fuchs, 2009). Wie Abb. 33 zeigt, bindet SsrB_c an

P_{rssR} bei dem gleichen molaren Verhältnis wie die Positivkontrolle P_{sseA} . Bei einem vergleichbar hohen molaren Verhältnis wurde auch die Negativkontrolle P_{reiD} getestet. Hier war hingegen keinerlei Verschiebung der P_{reiD} -Bande zu beobachten. In diesem Versuchsaufbau fällt auf, dass vergleichsweise hohe molare Verhältnisse verwendet werden mussten, um eine Verschiebung der DNA-Banden zu beobachten. Da es sich bei P_{sseA} jedoch um eine gängige und gut dokumentierte Positivkontrolle für GMSAs mit SsrBc handelt und die Kontrollen bei diesen hohen molaren Verhältnissen die erwarteten Ergebnisse geliefert haben, sind die Resultate als valide zu betrachten (Walthers *et al.*, 2007, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Daher wurde abschließend geschlussfolgert, dass SsrB spezifisch an P_{rssR} bindet und die Transkription von $rssR$ induziert.

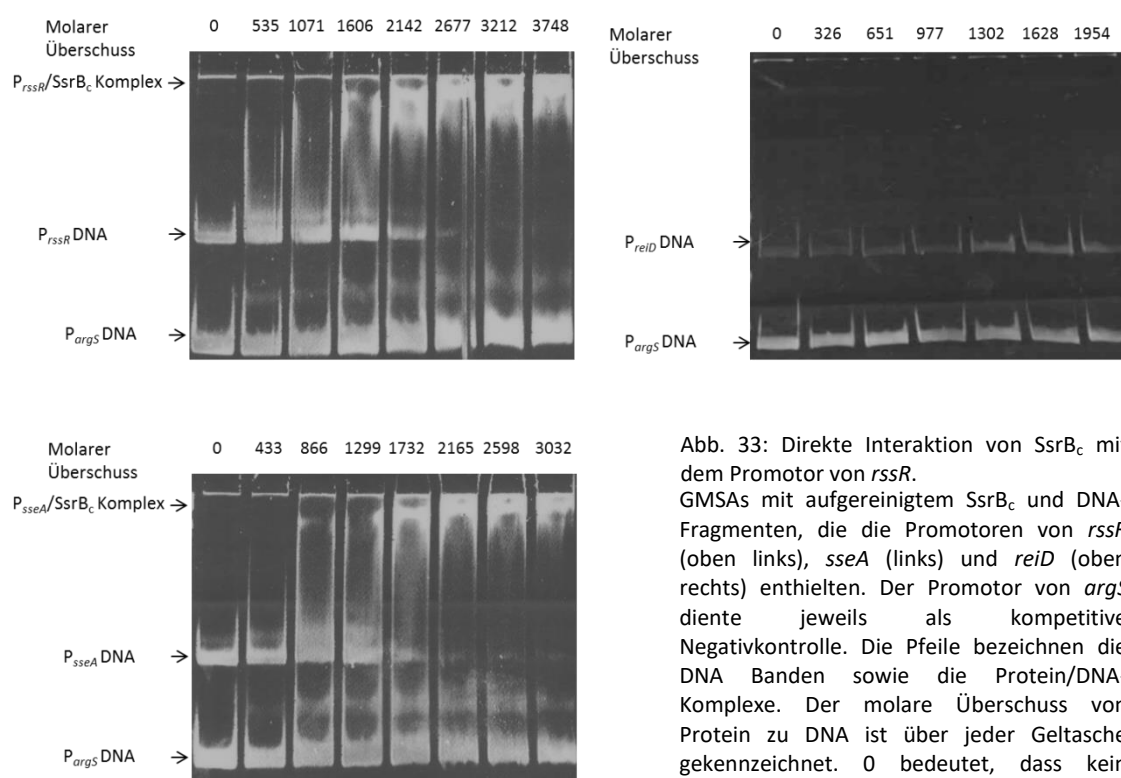


Abb. 33: Direkte Interaktion von SsrB_c mit dem Promotor von $rssR$. GMSAs mit aufgereinigtem SsrB_c und DNA-Fragmenten, die die Promotoren von $rssR$ (oben links), $sseA$ (links) und $reiD$ (oben rechts) enthielten. Der Promotor von $argS$ diente jeweils als kompetitive Negativkontrolle. Die Pfeile bezeichnen die DNA-Banden sowie die Protein/DNA-Komplexe. Der molare Überschuss von Protein zu DNA ist über jeder Geltasche gekennzeichnet. 0 bedeutet, dass kein Protein hinzugegeben wurde.

3.3.4 RssR erhöht die Menge der $reiD$ mRNA

Die konstitutive episodale Expression von $rssR$ änderte den Wachstumsphänotyp von *S. Typhimurium* in MI-Medium (siehe 3.3.2). Dieser Befund bestärkte die Annahme, dass die sRNA RssR eine mRNA reguliert, die auf der GEI4417/4436 kodiert ist (siehe 3.3.1). Zur weiteren Untersuchung wurden Luciferase-Reporterstämme konstruiert, indem die *luxCDABE*-Kassette jeweils mit dem 3'-Ende der jeweiligen polycistronischen Operons bzw. Gene der GEI4417/4436 chromosomal fusioniert wurde: *iolR*, *iolT1*, *iolT2*, *iolB*, *reiD*, *iolG1*, *srfJ*, *iolI1*, *STM4428*, *iolC2*, *iolD2*, *iolG2*, *STM4434* und *iolH* (siehe

3.2.6). Diese Stämme wurden dann mit pZE-*rssR* oder pZE-control transformiert, um RssR konstitutiv zu exprimieren. Die Messungen der Biolumineszenz und optischen Dichte OD₆₀₀ erfolgten stündlich während des Wachstums dieser Stämme in LB-Medium. Es konnte bis auf zwei Ausnahmen keinerlei signifikante Änderung der transkriptionellen Aktivität der Reporter im Vergleich der Kontrollen gegenüber der Überexpression von *rssR* gemessen werden. Nur die Stämme 14028 P_{*reiD*}::*lux* und 14028 *reiD*::*lux* zeigten einen signifikanten Unterschied in ihrer Reporteraktivität (Abb. 34).

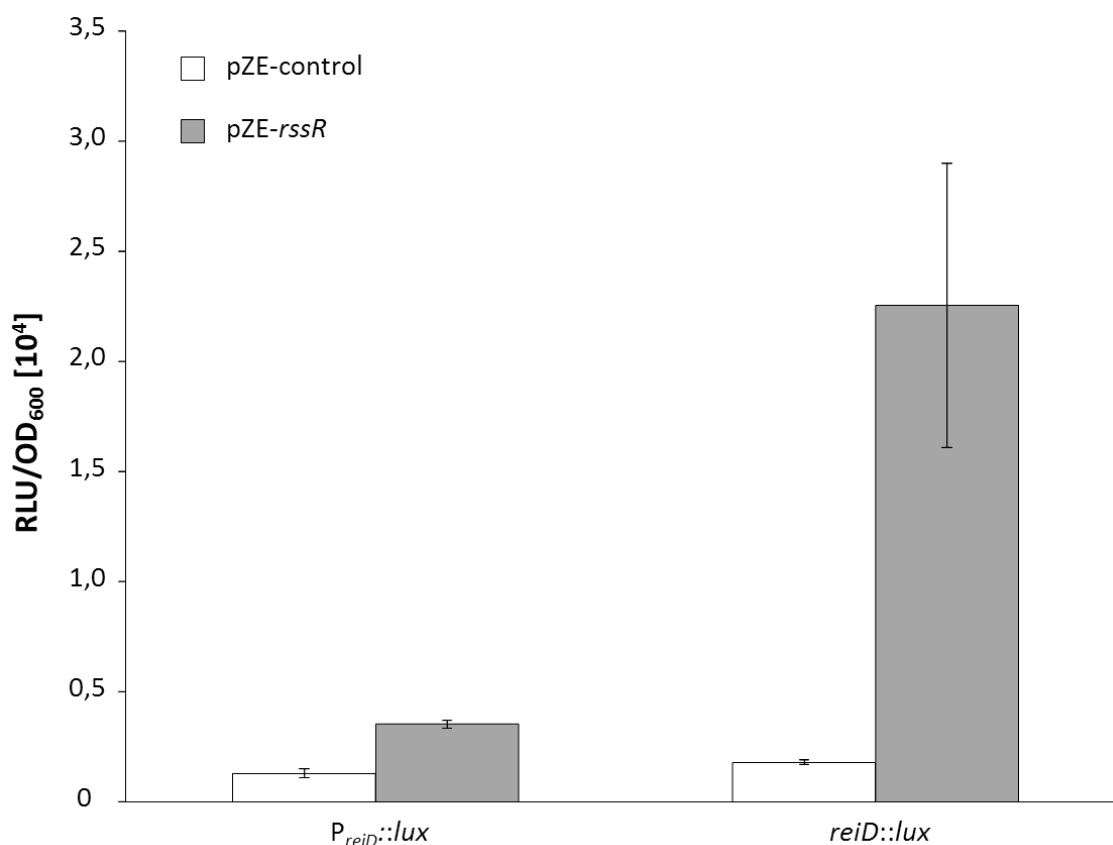


Abb. 34: Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *reiD* durch RssR. Die Stämme wurden in LB-Medium kultiviert und die Biolumineszenz der Reporter und das Wachstum der Stämme stündlich gemessen. Das Kontrollplasmid pZE-control trägt ein nicht-kodierendes 14 bp langes Fragment. Pro Stamm wurden je drei unabhängige Kulturen zu je drei Kavitäten gemessen. Aus den größten pro Kultur gemessenen RLU/OD₆₀₀-Werten wurden die Mittelwerte und Standard-abweichungen berechnet. Die Mittelwerte der beiden Stämme der jeweiligen Reporter unterscheiden sich dabei signifikant voneinander ($p \leq 0,01$).

Zu beobachten war dabei, dass die Reporterfusion, die am 3'-Ende von *reiD* chromosomal integriert wurde, durch pZE-*rssR* eine 11-fach höhere Expression als die Kontrolle aufwies. Dagegen wurde bei Stamm 14028 P_{*reiD*}::*lux* pZE-*rssR* lediglich eine 2,7-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Somit lag zwar bei beiden Stämmen, die pZE-*rssR* trugen, eine signifikant höhere Reporteraktivität gegenüber den Kontrollstämmen vor; der deutlich größere Effekt war jedoch bei Stamm 14028 *reiD*::*lux* zu beobachten. Dies führte zu der Hypothese, dass RssR innerhalb der

kodierenden Region der mRNA *reiD* interagiert und so zu einer Stabilisierung dieses mRNA-Transkriptes führt. Dass die Überexpression von RssR jedoch nur Einfluss auf *reiD::lux* bzw. in geringerem Maße auf $P_{reiD::lux}$ hat, zeigt, dass die Erhöhung der Transkriptmenge von *reiD* nicht notwendigerweise auch zu einer direkten Erhöhung der ReiD-Konzentration in LB-Medium bzw. MI-freiem Medium führen muss. Ein weiterer posttranskriptioneller Regulationsprozess an der mRNA *reiD*, der die Translation reguliert, kann daher nicht ausgeschlossen werden.

3.3.5 Die Deletion von *rssR* führt zur Destabilisierung der *reiD* mRNA

Um die Hypothese einer *reiD* mRNA-stabilisierenden Funktion von RssR zu prüfen, wurde der relative Abbau dieser mRNA zwischen den Stämmen 14028, 14028 Δ *rssR* und 14028 Δ *rssR* pZE-*rssR* verglichen. Dazu wurden die drei Stämme jeweils in MI-Medium bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,3$ kultiviert und die Transkription durch die Zugabe von 500 μ g/ml Rifampicin inhibiert. Dadurch unterlag die mRNA-Menge in den Zellen nur noch dem natürlichen Abbau und keiner neuen Synthese. Von diesen Kulturen wurden insgesamt zwei Proben genommen, um die RNA zu isolieren: 2 min (-2) vor und 8 min (+8) nach der Zugabe von Rifampicin. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR (**quantitative Realtime-PCR**, quantitative Echtzeit-PCR) eingesetzt. Dabei wurden die relativen Mengen der mRNA von *reiD* sowie von *ioIT1* als Kontrolle gemessen und gegen die jeweilige Menge der 16S rRNA normalisiert. Dabei wurde beobachtet, dass die relative Menge der mRNA *reiD* zwischen den beiden Zeitpunkten -2 und +8 um den Faktor 13,5 im Wildtyp abnahm ($p \leq 0,01$) (Abb. 35). In der gleichen Zeit wurde die Menge der mRNA *reiD* in der *rssR*-Mutante um den Faktor 55 ($p \leq 0,01$) reduziert. Dies zeigt deutlich, dass RssR die Degradation der mRNA *reiD* verzögert. Bestätigt werden konnte dies durch den Komplementationsstamm 14028 Δ *rssR* pZE-*rssR*, bei dem die relative Menge der mRNA *reiD* zwischen den beiden Messpunkten nur um den Faktor 4,1 abnahm ($p \leq 0,01$). Das Plasmid pZE-*rssR* kompensierte dabei die chromosomale *rssR*-Deletion sehr deutlich und führte sogar zu einer höheren Stabilität der mRNA *reiD* gegenüber dem Wildtyp ($p \leq 0,01$). Die Stabilität der verwendeten Kontroll-mRNA *ioIT1* zeigte keinerlei signifikante Änderung zwischen den drei verwendeten Stämmen, wodurch der Effekt von RssR auf die Stabilität der mRNA *reiD* als spezifisch einzuordnen ist.

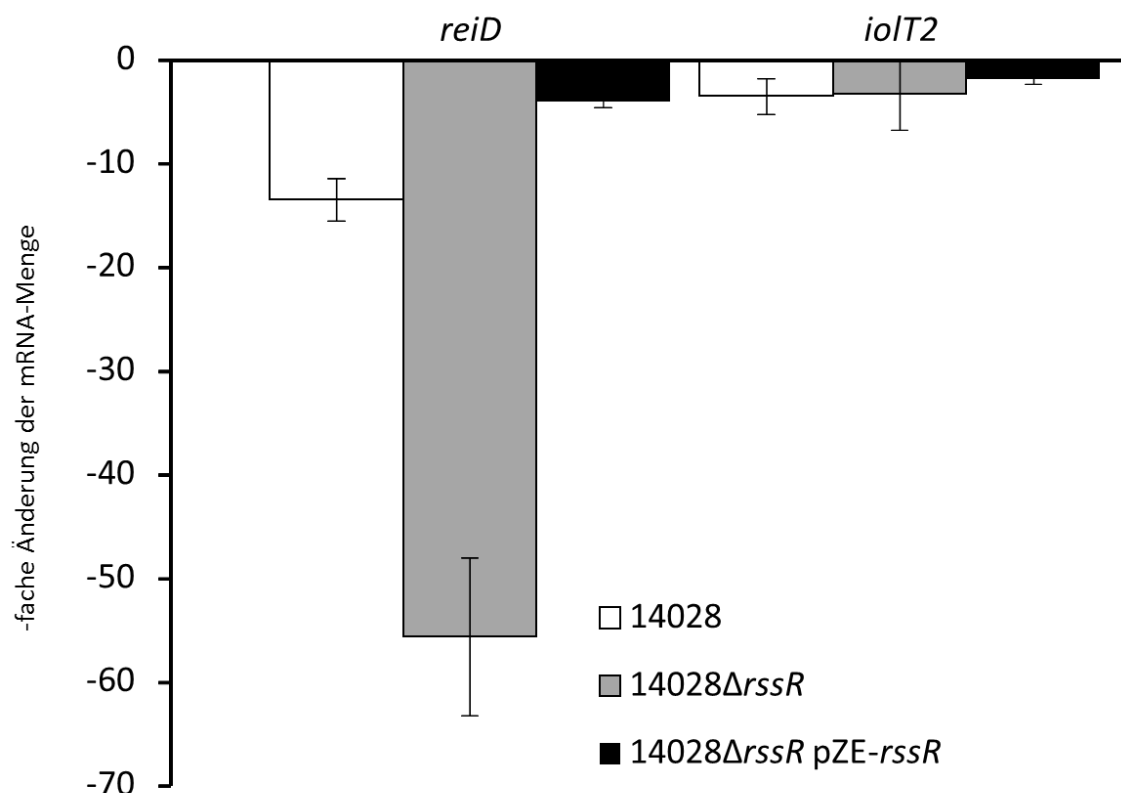


Abb. 35: Die mRNA-Stabilität von *reiD* wird von RssR beeinflusst. Die Stämme 14028, 14028 Δ *rssR* und 14028 Δ *rssR* pZE-*rssR* wurden in MI-Medium kultiviert. Bei OD₆₀₀ 0,3 wurden 500 μ g/ml Rifampicin hinzugegeben, um die Transkription zu stoppen. Proben von den Kulturen wurden 2 min vor und 8 min nach dieser Inhibierung genommen und qRT-PCRs durchgeführt. Dabei wurde jeweils die relative Änderung der mRNA-Menge von *reiD* und *iolT1* im Verhältnis zur Menge an *16S* rRNA bestimmt. Die dargestellten Werte wurden von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten berechnet.

Um die mögliche Interaktion zwischen RssR und der Sequenz, die die 5'-UTR der mRNA *reiD* zusammen mit den ersten 150 bp der kodierenden Sequenz von *reiD* enthält, zu bestimmen, wurde die Software *RNAhybrid* verwendet (Rehmsmeier *et al.*, 2004). Die wahrscheinlichste Paarung mit einer minimalen freien Energie von -49,2 kcal/mol ist in Abb. 36 A dargestellt. Die wahrscheinlichste Sekundärstruktur von RssR wurde durch die Software *mfold* berechnet (Abb. 36 B) (Zuker, 2003). Diese Struktur weist eine freie Energie von -24,4 kcal/mol auf. Die vorhergesagte Interaktion findet innerhalb der Gensequenz von *reiD* ab Position +33 nt statt. Dies bestärkt die Vermutung, dass der Interaktionsbereich von RssR an der mRNA *reiD* nicht innerhalb der 5'-UTR, sondern innerhalb der Gensequenz liegt. Somit kann der Reporter $P_{reiD}::lux$ nur indirekt von RssR beeinflusst werden, wohingegen *reiD::lux* mit einem deutlich stärkeren Signal auf die Überexpression von RssR reagiert (siehe 3.3.4).

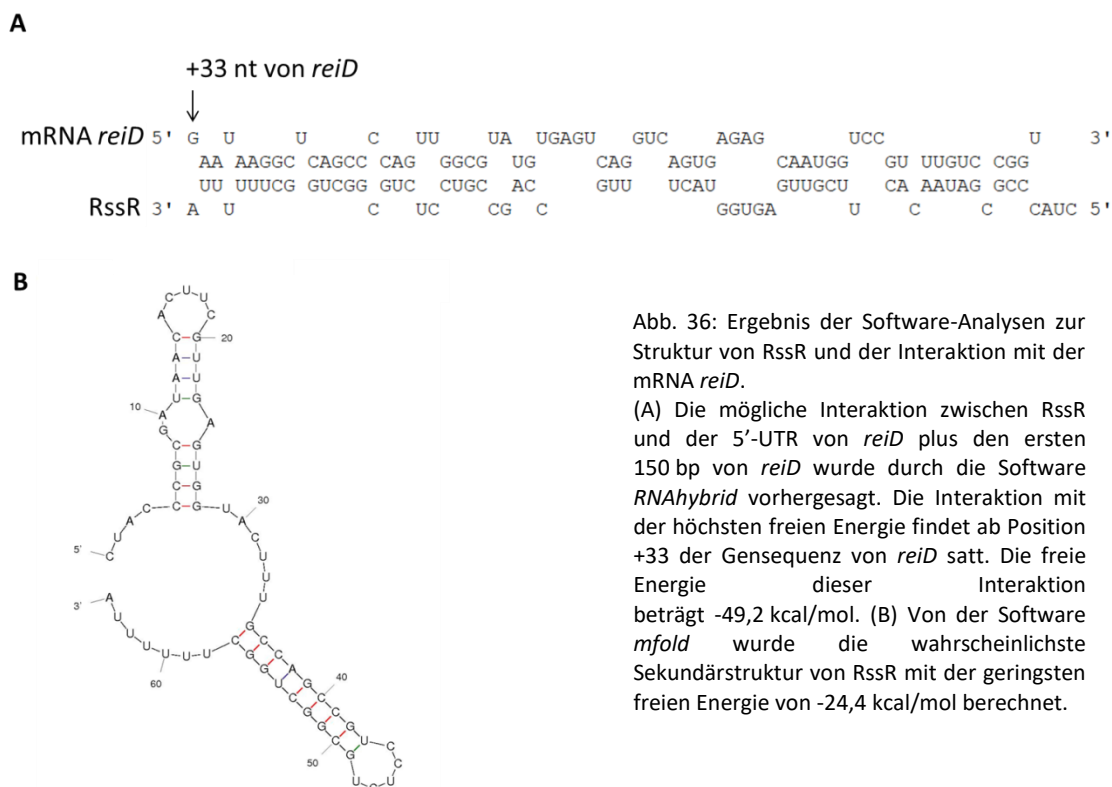


Abb. 36: Ergebnis der Software-Analysen zur Struktur von RssR und der Interaktion mit der mRNA *reiD*.

(A) Die mögliche Interaktion zwischen RssR und der 5'-UTR von *reiD* plus den ersten 150 bp von *reiD* wurde durch die Software *RNAhybrid* vorhergesagt. Die Interaktion mit der höchsten freien Energie findet ab Position +33 der Gensequenz von *reiD* statt. Die freie Energie dieser Interaktion beträgt -49,2 kcal/mol. (B) Von der Software *mfold* wurde die wahrscheinlichste Sekundärstruktur von RssR mit der geringsten freien Energie von -24,4 kcal/mol berechnet.

3.3.6 Die Deletion von *hfq* bewirkt einen signifikanten Wachstumsdefekt von *Salmonella* in MI-Medium

Das RNA Chaperon Hfq beeinflusst die Stabilität von sRNAs und deren Bindung an mRNAs (Vogel & Luisi, 2011). Im Gegensatz zu STnc1740 wird RssR stark von Hfq, welches die Interaktion zwischen regulatorischen sRNAs und ihren mRNA-Zielen ermöglicht (Chao *et al.*, 2012), gebunden. Um den Einfluss von Hfq auf den MI-Metabolismus von *S. Typhimurium* zu untersuchen, wurde der Stamm 14028 Δ *hfq* konstruiert und dessen Phänotyp charakterisiert. In LB-Medium zeigte dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp eine um 1-2 h verlängerte lag-Phase (Abb. 37) und eine leicht reduzierte Wachstumsrate: $t_d(14028) = 0,91 \text{ h} \pm 6,7 \%$; $t_d(14028\Delta hfq) = 0,97 \text{ h} \pm 2,2 \%$. Der Stamm 14028 Δ *hfq* erreichte zudem nur eine maximale OD₆₀₀ von $\sim 0,8$, wohingegen der Wildtyp bis zur optischen Dichte OD₆₀₀ von $\sim 1,0$ wuchs. Ursächlich hierfür ist vermutlich ein pleiotroper Effekt der Deletion des RNA Chaperons. Dieser konnte durch die episomale Expression von *hfq* mittels pStHfq-6H komplementiert werden.

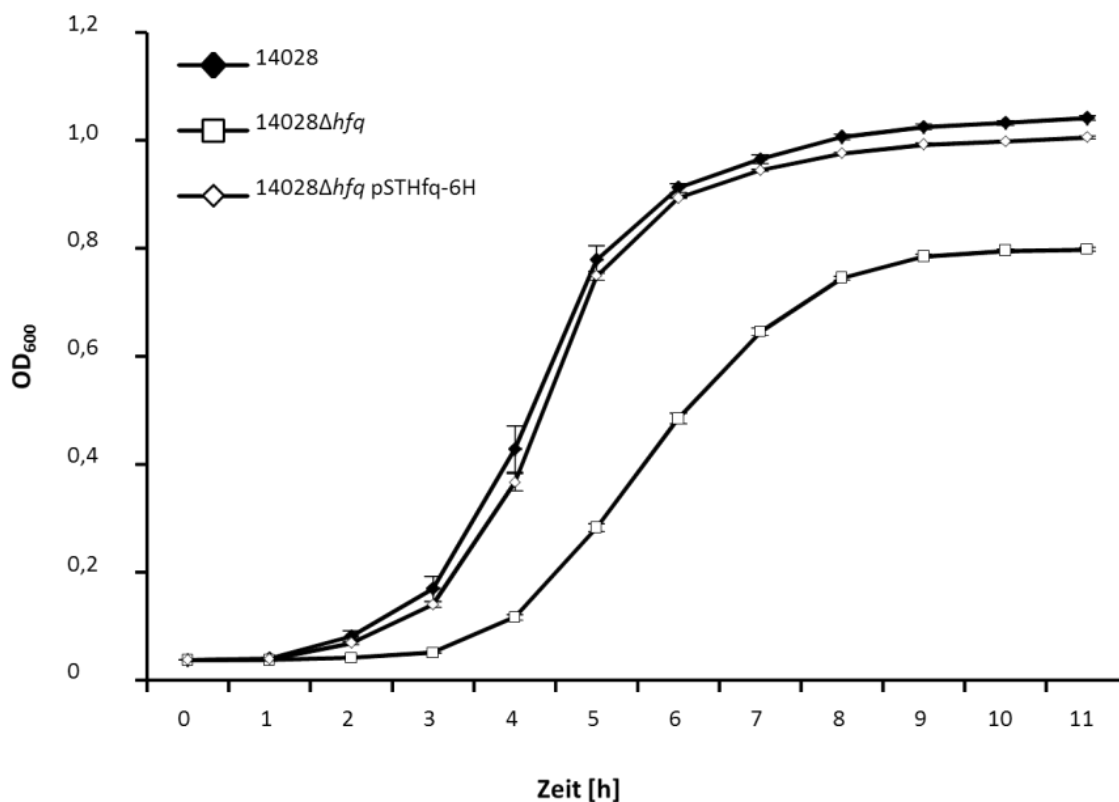


Abb. 37: Einfluss von Hfq auf den Wachstumsphänotyp von 14028 in LB-Medium. Die Stämme 14028, 14028Δ*hfq* und 14028Δ*hfq* pSTHfq-6H wurden in LB-Medium in Flaschen bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die optische Dichte OD₆₀₀ wurde stündlich gemessen. Die Experimente wurden in unabhängigen Triplikaten durchgeführt. Mittelwerte mit Standardabweichungen sind dargestellt.

In MI-Medium war ein deutlich massiverer Phänotyp der *hfq*-Mutante zu beobachten (Abb. 38). Die Generationszeit des Wildtyps ($t_d(14028) = 3,87 \text{ h} \pm 3,4 \%$) wurde durch die Deletion von *hfq* signifikant um den Faktor 2,3 verlängert ($t_d(14028\Delta hfq) = 8,85 \text{ h} \pm 3,2 \%$). Des Weiteren war das Wachstumsverhalten der Mutante nicht mehr logarithmisch, sondern linear. Die maximale optische Dichte der Kulturen, die bei diesem Versuch in Mikrotiterplatten kultiviert worden waren, reduzierte sich von OD₆₀₀ ~0,75 im Wildtyp auf OD₆₀₀ ~0,4 in der Mutante. Die Deletion führte weiterhin zu einer deutlichen Reduktion der lag-Phase: 14028 = 55 h, 14028Δ*hfq* = 37 h. Durch das Plasmid pStHfq-6H konnte der wildtypische Phänotyp auch in MI-Medium wiederhergestellt werden, wobei jedoch eine um ca. 10 h verlängerte lag-Phase zu beobachten war. Ursächlich hierfür könnte die leichte Überexpression von *hfq*, bedingt durch die episodale Komplementierung, sein. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Deletion von *hfq* massiven Einfluss auf das Wachstum von *S. Typhimurium* in MI-Medium hat.

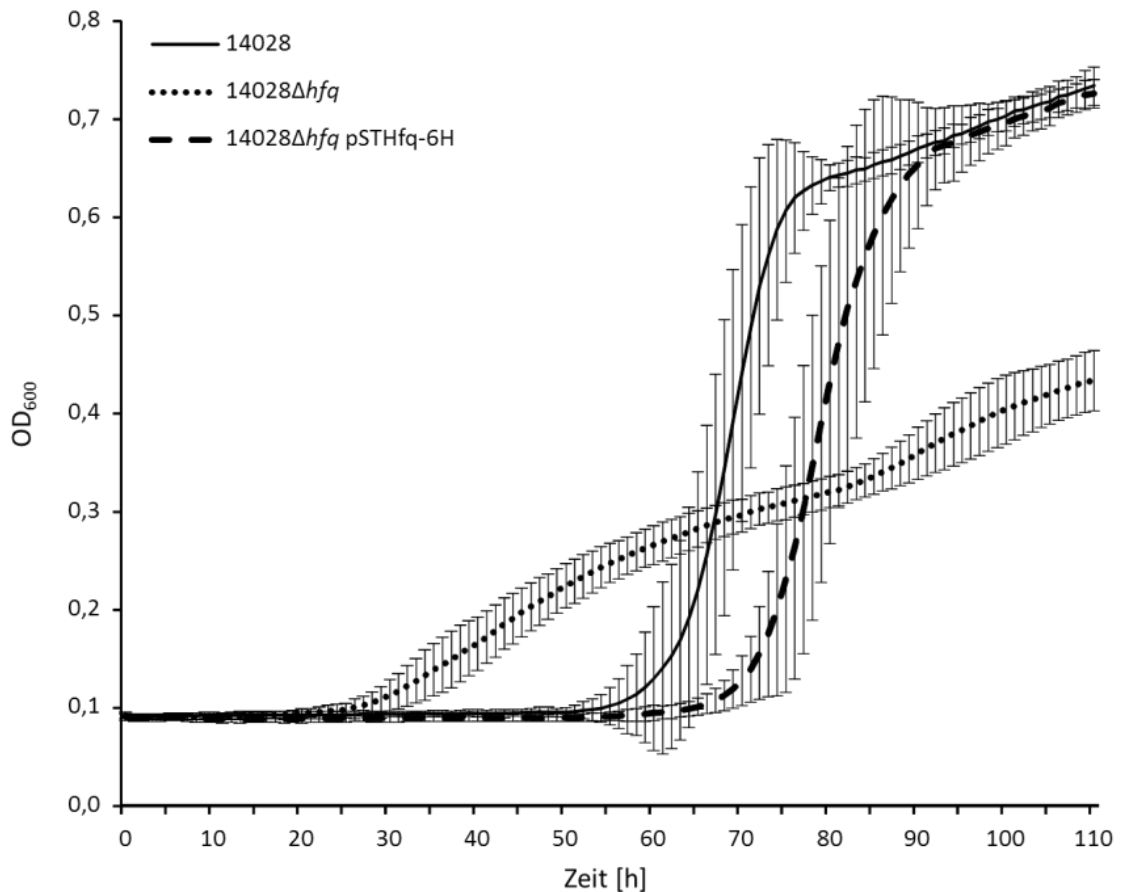


Abb. 38: Einfluss von Hfq auf das Wachstum in MI-Medium. Die Stämme 14028, 14028 Δ hfq und 14028 Δ hfq pSTHfq-6H wurden in MI-Medium in Mikrotiterplatten bei 37 °C stehend in dem Bioscreen C inkubiert. Die optische Dichte OD₆₀₀ wurde stündlich gemessen. Die Experimente wurden in unabhängigen Triplikaten zu je 10 Kavitäten durchgeführt. Mittelwerte mit Standard-abweichungen sind dargestellt.

Um den Einfluss von Hfq auf die Regulation des MI-Metabolismus weiter zu untersuchen, wurde die Expression der Gene der genomischen Insel GEI4417/4436 zwischen den Stämmen 14028 und 14028 Δ hfq während des Wachstums in MI-Medium miteinander verglichen. Dazu wurden chromosomale *lux*-Reporter mit dem 3'-gelegenen DNA-Sequenzen der polycistronischen *iol*-Operons bzw. *iol*-Gene der GEI4417/4436 im Wildtyp als auch in der *hfq*-Mutante konstruiert (siehe auch 3.2.6). Diese Stämme wurden dann in MI-Medium kultiviert und die Biolumineszenz und optische Dichte OD₆₀₀ alle zwei Stunden gemessen. Der Vergleich der maximal erreichten RLU/OD₆₀₀-Werte ist in Abb. 39 dargestellt.

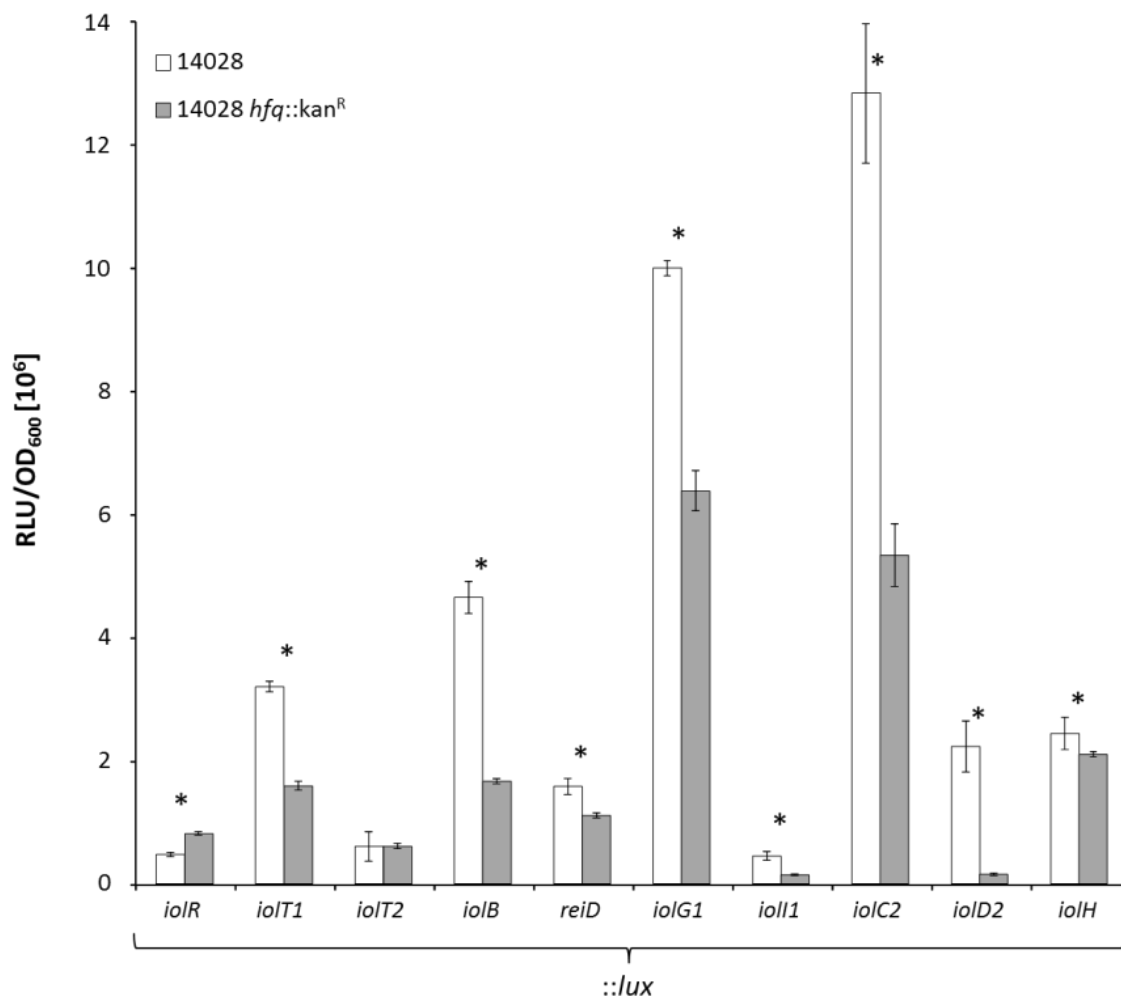


Abb. 39: Einfluss von Hfq auf die Expression der *iol*-Gene in MI-Medium. Der *luxCDABE*-Reporter wurde mit den *iol*-Genen in den Stämmen 14028 sowie in $14028\Delta hfq$ fusioniert. Diese wurden dann in drei unabhängigen biologischen Replikaten zu je drei Kavitäten in MI-Medium stehend kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen; signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) zwischen 14028 und $14028\Delta hfq$ sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

Durch die Deletion von *hfq* war eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,01$) der Transkriptionsaktivität aller *iol*-Gene und *reiD* mit Ausnahme von *iolR* und *iolT2* zu beobachten. Die Transkriptionsaktivität von *iolT2* war zwischen Wildtyp und $14028\Delta hfq$ nahezu identisch. Dagegen stieg die Aktivität von *iolR::lux* durch die Deletion von *hfq* signifikant um den Faktor 1,72 an. Die größte, 14-fache Abnahme der Expression war bei *iolD2* zu beobachten. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Hfq mit RssR interagiert, welches die mRNA von *reiD* stabilisiert. So würde die Konzentration dieser mRNA in den Zellen erhöht, was in einer größeren Menge an ReiD und Induktion der ReiD-Zielgene resultierte. Dagegen spricht, dass durch die Deletion von *hfq* auch die Aktivität von *iolT1::lux* reduziert wurde, dessen Transkription nicht von ReiD reguliert wird. Somit ist es nicht klar, ob es sich bei dem beobachteten

Effekt der *hfq*-Deletion um einen allgemeinen pleiotropen Effekt oder um einen RssR-mRNA *reiD*-spezifischen Prozess handelt.

3.4 Einfluss von IoIR, SsrB und H-NS auf das Expressionsmuster der GEI4417/4436

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von IoIR sowie der beiden globalen Regulatorproteine SsrB und H-NS auf die Transkription der Gene der GEI4417/4436 untersucht. In der Arbeit von Kröger (2010) wurde die Regulation und der Einfluss von IoIR auf die Promotoren der essentiellen Gene der GEI4417/4436 eingehend mittels des episomalen *lux*-Reporters pDEW201 analysiert. Nicht betrachtet wurden hingegen die nicht essentiellen Operons bzw. Gene *srfJ/iolI1* und *STM4428*. Diese bis dahin noch nicht hinsichtlich ihrer Expressionsantwort auf IoIR untersuchten Gene sollen im Folgenden behandelt werden. Des Weiteren wurden die mittels pDEW201 generierten Ergebnisse durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten chromosomalen pUTs-*lux*-Reporter überprüft. Diese liegen im Vergleich zu den episomalen pDEW201-Reportern als eine einzelne Kopie im Genom vor und ermöglichen so eine weniger artifizielle Messung der Genexpression. Durch genomweite Studien waren putative Bindungen der globalen Regulatoren SsrB und H-NS innerhalb der GEI4417/4436 bereits bekannt. Die Auswirkungen, die diese Interaktionen sowohl auf die Expression der Gene der GEI4417/4436 als auch auf den MI-Metabolismus haben, waren jedoch unklar. Um dahingehend ein besseres Verständnis zu erlangen, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die nachfolgend beschrieben sind.

3.4.1 IoIR bindet und reprimiert die *iol*-Promotoren der GEI4417/4436

Um den Einfluss von IoIR auf die Aktivität der Gene der GEI4417/4436 detaillierter zu untersuchen, wurden chromosomale Reporterstämme im $\Delta ioIR$ -Hintergrund konstruiert. Dazu wurden die jeweiligen pUTs-*lux*-Reporter in den Stamm 14028 $\Delta ioIR$ konjugiert. Diese wurden dann in LB-Medium kultiviert und die dabei maximal erreichten RLU/OD₆₀₀-Werte bestimmt (Tab. 20). Um die Werte in Relation zum wildtypischen Hintergrund bringen zu können, wurde das Experiment analog mit Reporterstämmen, die mit dem Wildtyp hergestellt worden waren, durchgeführt. Die Stämme wurden dabei in MM-Glukose sowie in MI-Medium kultiviert.

Tab. 20: Aktivitätsmessung der chromosomalen Reporter der Gene der GEI4417/4436 in LB-Medium, MM-Glukose und MI-Medium.

| Chromosomale Fusion mit <i>luxCDABE</i> | 14028 Δ <i>ioIR</i> in LB | | 14028 in MM + Glukose | | 14028 in MI- Medium | | x-fache Induktion ^b |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|--------|--------------------------|--------|------------------------|--------|-----------------------------------|
| | RLU/OD ₆₀₀ | SD (%) | RLU/OD ₆₀₀ | SD (%) | RLU/OD ₆₀₀ | SD (%) | |
| <i>ioIR</i> | | | 5,77 x 10 ⁴ | 21,8 | 4,76 x 10 ⁵ | 7,3 | 8,3 |
| <i>ioIT1</i> | 5,55 x 10 ⁶ | 23,1 | 3,88 x 10 ² | 48,7 | 3,20 x 10 ⁶ | 2,7 | 8.249,2 |
| <i>ioIT2</i> | 2,33 x 10 ⁶ | 15,7 | 9,24 x 10 ² | 61,0 | 6,09 x 10 ⁵ | 39,6 | 659,1 |
| <i>ioIB</i> | 5,81 x 10 ⁶ | 3,4 | 7,13 x 10 ² | 31,9 | 4,65 x 10 ⁶ | 5,5 | 6.521,5 |
| <i>reiD</i> | 6,26 x 10 ⁶ | 5,7 | 1,34 x 10 ² | 63,0 | 1,58 x 10 ⁶ | 8,4 | 11.838,8 |
| <i>ioIG1</i> | 1,56 x 10 ⁶ | 24,1 | 1,11 x 10 ³ | 20,8 | 8,43 x 10 ⁶ | 24,3 | 7.566,7 |
| <i>ioII1</i> | 1,02 x 10 ⁵ | 5,0 | 3,12 x 10 ³ | 20,0 | 4,52 x 10 ⁵ | 14,5 | 144,6 |
| <i>STM4428</i> | 9,34 x 10 ⁵ | 22,5 | 7,54 x 10 ³ | 9,1 | 7,42 x 10 ⁵ | 7,6 | 98,3 |
| <i>ioIC2</i> | 8,40 x 10 ⁶ | 9,0 | 2,15 x 10 ³ | 22,1 | 1,28 x 10 ⁷ | 8,8 | 5.970,5 |
| <i>ioID2</i> | 4,89 x 10 ⁶ | 21,4 | 1,39 x 10 ² | 43,1 | 2,23 x 10 ⁶ | 18,4 | 16.068,9 |
| <i>STM4434</i> | 1,90 x 10 ⁶ | 19,8 | 1,43 x 10 ⁴ | 18,1 | 4,09 x 10 ⁵ | 12,5 | 28,5 |
| <i>ioIH</i> | 7,93 x 10 ⁵ | 2,2 | 1,53 x 10 ³ | 28,3 | 2,44 x 10 ⁶ | 10,7 | 1.593,9 |

^a Dargestellt ist der Mittelwert der maximalen RLU/OD₆₀₀-Werte von drei unabhängigen Experimenten. Dabei wurden jeweils drei technische Replikate verwendet. ^b Die Induktion wurde berechnet zwischen dem Expressionswert in MM-Glukose und MI-Medium im Wildtyp-Hintergrund.

Wie bereits durch KRÖGER gezeigt werden konnte, bindet IoIR an sämtliche Promotoren der *ioI*-Gene bzw. Operons, außer an $P_{ioIE/ioIG1}$ und $P_{ioII2/ioIH}$ (Kröger & Fuchs, 2009). Die Deletion von *ioIR* sowie das Wachstum in MI-Medium bewirken hingegen die Induktion aller *ioI*-Gene bzw. *ioI*-Operons, auch die der beiden letztgenannten. Das lässt sich durch *reiD* erklären, da die Überexpression dieses Regulators die Promotoren P_{ioIE} und P_{ioII2} stark induziert (siehe 3.2.6) und *reiD* ebenfalls von IoIR reprimiert wird (siehe 3.2.8). Bei der Betrachtung der Induktionsraten fällt zudem auf, dass die essentiellen Gene bzw. Operons - konkret handelt es sich um *ioIT1*, *ioIA/ioIB*, *reiD*, *ioIE/ioIG1*, *ioIC1/ioIC2* und *ioID1/ioID2* - die höchsten Differenzen zwischen MM-Glukose und MI-Medium aufweisen.

Der Vergleich der chromosomalen mit den episomalen Reportern zeigt, dass sich das Verhalten dieser beiden Reportertypen deutlich voneinander unterscheidet. So weist

der Reporterstamm, der pDEW- P_{iolA} trägt, bereits unter den Kontrollbedingungen in MM-Glukose $4,16 \times 10^6$ RLU/OD₆₀₀ auf (Kröger & Fuchs, 2009). Ebenso ist der Reporter pDEW- P_{iolC1} unter diesen Bedingungen stark induziert ($2,91 \times 10^5$ RLU/OD₆₀₀). Somit fallen hier die Induktionen, die durch die Kultivierung der Zellen in MI-Medium ausgelöst werden, mit 3,1-fach bzw. 33,9-fach vergleichsweise schwach aus. Dagegen zeigten die chromosomalen *lux*-Reporter für *iolA/iolB* und *iolC1/iolC2* Expressionssteigerungen um den Faktor 6.521,5 bzw. 5.970,5 (siehe Tab. 20). Dieser Unterschied zwischen den beiden Reportersystemen beruht darauf, dass die chromosomalen Reporter bei der Kultivierung der Zellen unter Kontrollbedingungen sehr geringe Aktivitäten im Bereich der unteren Messwertgrenze aufweisen (siehe Tab. 20). Hierfür scheinen zwei Ursachen plausibel. Einerseits liegt beim chromosomalen Reporter nur eine Kopie des Reporters in der Zelle vor, wohingegen beim episomalen System mehrere Kopien des Reporters in der Zelle vorhanden sind. Diese können insgesamt ein stärkeres Signal unter gleichen regulatorischen Bedingungen generieren. Andererseits stellt der chromosomale Reporter ein weitgehend natives System dar, bei dem die natürlichen Regulatoren der untersuchten Gensequenz weiterhin daran binden können. Dazu gehören neben den klassischen Transkriptionsfaktoren auch Proteine wie H-NS, die durch ihre Bindung an die DNA die Transkription benachbarter DNA-Abschnitte beeinflussen können (Singh *et al.*, 2016). Dagegen liegt die zu untersuchende DNA-Sequenz im episomalen Reporter in einer artifiziellen Topologie vor, sodass die Transkriptionsaktivität dieser DNA-Sequenz nicht mehr dem nativen Zustand entspricht (Higgins & Vologodskii, 2015). Es erscheint zudem sehr unwahrscheinlich, dass die Mehrheit der mit pDEW201 untersuchten *iol*-Promotoren unter MM-Glukose-Kulturbedingungen, bei denen keinerlei MI vorliegt, also auch keinerlei Enzyme für den Abbau von MI benötigt werden, sehr stark aktiv sein sollte. Somit muss davon ausgegangen werden, dass der chromosomale pUTs-*lux*-Reporter ein deutlich natives System zur Untersuchung der Expressionsaktivität darstellt.

Bemerkenswert ist jedoch auch, dass bei den episomalen Reportern die beiden größten Induktionsraten bei P_{iolE} und P_{iolI2} gemessen wurden. Diese beiden Promotoren zeigten auch die stärkste Expressionssteigerung durch die Überexpression von *ReiD* mittels pBR-*reiD* in LB-Medium (siehe 3.2.6). Zudem handelt es sich um zwei Promotoren, bei denen keine direkte Bindung von *IolR* mittels GMSAs nachgewiesen werden konnte. Ursächlich für die starke Induktion zumindest von P_{iolE} im episomalen Reportersystem ist vermutlich Folgendes: Lässt man in der Studie von Kröger die getesteten DNA-Fragmente außer Acht, die laut der Analyse der transkriptionellen Organisation keine Promotorregionen sind, also P_{iolG1} , P_{iolG2} und P_{iolH} , so zeigt sich, dass

die Promotoren P_{iolE} und P_{iolI2} die mit Abstand geringsten Aktivitäten in MM-Glukose aufweisen. Die anderen Reporter sind, wie der o. g. Vergleich mit dem chromosomalen System zeigt, im episomalen System dereguliert und stark induziert. Da die beiden Promotoren nicht von IolR gebunden werden und für die Aktivierung ihrer Expression eine Induktion und keine nachlassende IolR-Repression notwendig ist, macht es dieses Ergebnis wahrscheinlich, dass IolR nicht ausreichend an die episomalen Promotoren im pDEW201-Reporter binden und diese reprimieren kann. Werden die Zellen mit den episomalen P_{iolE} - und P_{iolI2} -Reportern in MI-Medium kultiviert, steigt die Expressionsrate auf einen sehr hohen Wert, der im Bereich der übrigen *iol*-Promotoren liegt. Ursächlich für diesen Anstieg ist ReID, für das eine Bindung zumindest an P_{iolE} in GMSAs nachgewiesen werden konnte. Betrachtet man vor diesem Hintergrund nun die Reaktion der chromosomalen Reporter in LB-Medium auf die Überexpression von ReID mittels pBR-*reiD* (siehe 3.2.6), so wird die Annahme aus Abschnitt 3.2.8, dass ReID mit IolR um die Bindung an P_{reiD} konkurriert, bestärkt und auf die Promotoren P_{iolA} und P_{iolC1} ausgeweitet (siehe Abb. 47).

3.4.2 SsrB bindet und induziert P_{srfJ}

Wie bereits gezeigt wurde, beeinflusst der SPI-2-Hauptregulator SsrB als Induktor die Transkription von *rssR* (siehe 3.3.3). Zudem führt die Kultivierung von *S. Typhimurium* 14028 in SPI-2-induzierendem Medium zu einer Änderung der transkriptionellen Organisation der GEI4417/4436 (siehe 3.1.3). Die Interaktion von SsrB mit P_{srfJ} wurde daher im Folgenden genauer untersucht. Dazu wurde SsrB_c mittels pBAD-*ssrB_c* in *E. coli* KB3 überexprimiert, isoliert und in steigender Konzentration in GMSAs eingesetzt (siehe auch 3.3.3). Dabei diente das PCR-Produkt, das P_{sseA} enthielt, als Positivkontrolle und P_{argS} als Negativkontrolle. Wie Abb. 40 zeigt, bindet SsrB_c an P_{srfJ} bei dem gleichen molaren Verhältnis von Protein und DNA wie die Positivkontrolle.

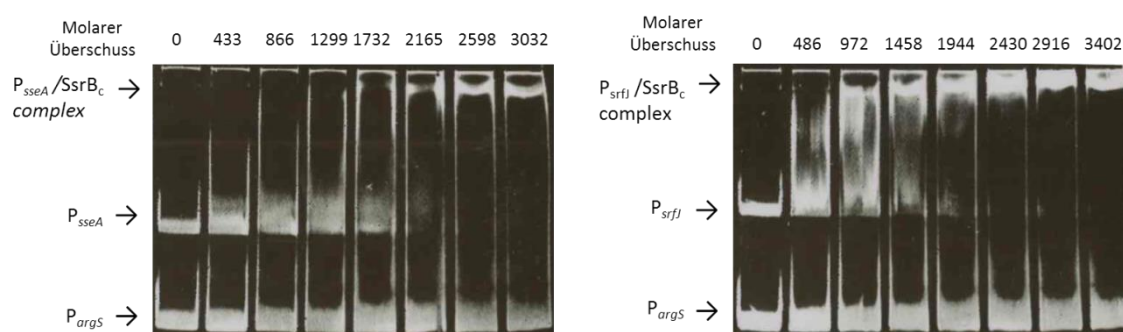


Abb. 40: Interaktion von SsrB_c mit dem Promotor von *srfJ*. GMSAs mit aufgereinigtem SsrB_c und DNA-Fragmenten, die die Promotoren von *sseA* (links) und *srfJ* (rechts) enthielten. Der Promotor von *argS* diente jeweils als kompetitive Negativkontrolle. Die Pfeile bezeichnen die DNA Banden sowie die Protein/DNA-Komplexe und der molare Überschuss von Protein zu DNA ist über jeder Geltasche gekennzeichnet. Den Ansätzen, die mit einem molaren Überschuss von 0 gekennzeichnet sind, wurde kein SsrB_c hinzugegeben.

Die Kultivierung in LPM-Medium veränderte die transkriptionelle Organisation der GEI4417/4436 (siehe 3.1.3). Dadurch war eine mRNA nachweisbar, die für SrfJ und IolI1 kodierte. Um diese Induktion zu quantifizieren, wurde der Reporterstamm 14028 *srfJ::lux* in LB-Medium sowie in LPM-Medium kultiviert. Die Biolumineszenz und die optische Dichte OD₆₀₀ wurden stündlich gemessen und die jeweils maximalen RLU/OD₆₀₀-Werte in Relation zueinander gesetzt (Abb. 41). Dabei war eine um den Faktor 5,2 signifikant ($p \leq 0,01$) höhere Reporteraktivität in LPM-Medium zu beobachten.

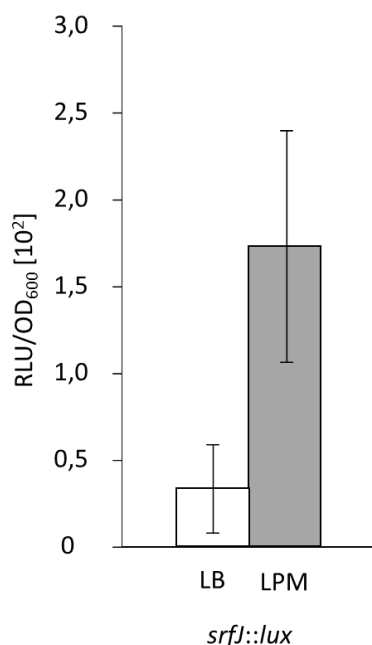


Abb. 41: Einfluss von LPM-Medium auf die Transkriptionsaktivität von *srfJ*. Der Stamm 14028 *srfJ::lux* wurde sowohl in LB-Medium als auch in LPM-Medium kultiviert, welches den SPI-2-Hauptregulator SsrB induziert. Dabei wurden stündlich die optische Dichte OD₆₀₀ als auch die Biolumineszenz gemessen. Die Experimente wurden jeweils in drei unabhängigen Replikaten zu je drei Kavitäten mit Kulturen durchgeführt und aus diesen Werten die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Um die Qualität der Bindung von SsrB_c an den Promotor von *srfJ* zu bestimmen, wurde das Reporterplasmid pDEW201 in *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Dazu wurden jeweils die Promotoren von *sseA*, *srfJ* und *argS* in das Plasmid kloniert und diese Zellen mit pBADHisA oder pBAD-*ssrB_c* transformiert. Die so jeweils entstandenen zwei Reporterstämme pro Gen wurden dann in LB-Medium ohne und mit 1 mM Arabinose kultiviert und die optische Dichte OD₆₀₀ sowie die Biolumineszenz stündlich gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der maximalen RLU/OD₆₀₀-Werte sind in Abb. 42 dargestellt.

Die Positivkontrolle *E. coli* TOP10 pDEW201-P_{*sseA*} pBAD-*ssrB_c* zeigte unter Zugabe von 1 mM Arabinose in das Medium eine sehr starke Erhöhung der Expression um den Faktor 999,4. Die Negativkontrolle P_{*argS*} zeigte zwar eine signifikante, aber äußerst geringe Abnahme in seiner Aktivität zwischen nicht induzierenden und induzierenden Bedingungen. Die Aktivität des zu untersuchenden Promotors P_{*srfJ*} stieg um das 24-Fache durch die Zugabe von 1 mM Arabinose in das Kulturmedium und in Gegenwart des Plasmids pBAD-*ssrB_c*. Damit konnte deutlich gezeigt werden, dass SsrB an P_{*srfJ*} bindet und durch diese Bindung die Transkription von *srfJ* induziert wird.

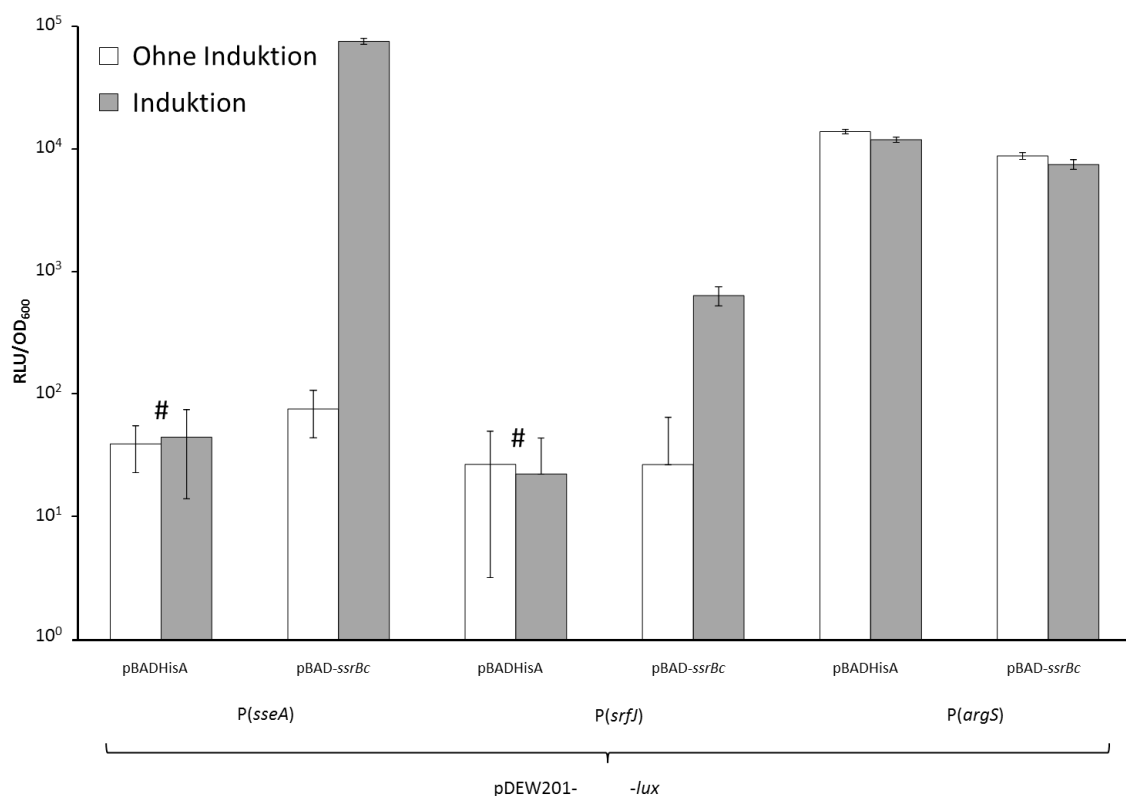


Abb. 42: Effekt von SsrB_c auf P_{srfJ} im heterologen System mit *E. coli* TOP-Zellen. Die Zellen enthielten jeweils das Reporterplasmid pDEW201, bei dem die Promotorsequenz von *sseA*, *srfJ* oder *argS* jeweils mit *luxCDABE* fusioniert wurde. Zusätzlich wurden diese Zellen mit dem nativen pBADHisA oder pBAD-*ssrBc* ausgestattet und anschließend in LB-Medium oder LB-Medium mit 1 mM Arabinose schüttelnd bei 37 °C in Mikrotiterplatten kultiviert. Stündlich wurden die Biolumineszenz und optische Dichte OD₆₀₀ von jeweils drei unabhängigen Kulturen in jeweils drei technischen Replikaten gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der maximal gemessenen RLU/OD₆₀₀-Werte. Die mit # gekennzeichneten Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Dagegen unterscheiden sich alle nicht markierten Wertepaare signifikant voneinander ($p \leq 0,01$).

3.4.3 H-NS bindet Promotoren und intragenische Sequenzen der GEI4417/4436

Bereits 2006 wurde in einer genomweiten ChIP-on-chip-Untersuchung eine große Anzahl an Bindestellen des Nukleoid-assoziierten Proteins H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*, Histon-ähnliches Nukleoid strukturierendes Protein) im Genom von *S. Typhimurium* LT2 bestimmt (Lucchini *et al.*, 2006). Darunter befanden sich auch 19 Bindestellen innerhalb der GEI4417/4436, die innerhalb der Gene *reiD*, *ioIE*, *ioID2*, *ioIG2*, *STM4434*, *ioII2* und *ioIH* lagen (Abb. 43). Wie gezeigt werden konnte, ist *S. Typhimurium* häufig nicht mehr lebensfähig, sobald *hns* deletiert wurde (Navarre *et al.*, 2006). Nur durch die zusätzliche Mutation, z. B. der Gene *rpoS* oder *phoP*, welche für den alternativen Sigmafaktor σ^S und den Hauptvirulenzregulator PhoP kodieren, war hier die Deletion von *hns* nicht letal für die Zelle (Ali *et al.*, 2014). Zudem wurden eine massive Reduktion des Wachstums sowie ein mucoider Phänotyp beobachtet (Schechter *et al.*, 2003, Coombes *et al.*, 2005). Durch die mit der Deletion von *hns* einhergehenden pleiotropen Effekte kann der konkrete Effekt des Strukturproteins H-NS auf die Transkription der Gene der GEI4417/4436 nicht eindeutig und

differenziert bestimmt werden. Somit stellen die Deletion oder die Überexpression von H-NS keine geeigneten Methoden zur Untersuchung des Einflusses von H-NS auf dessen mögliche Zielgene dar, weshalb auf Reporterstudien verzichtet wurde (Singh *et al.*, 2016).

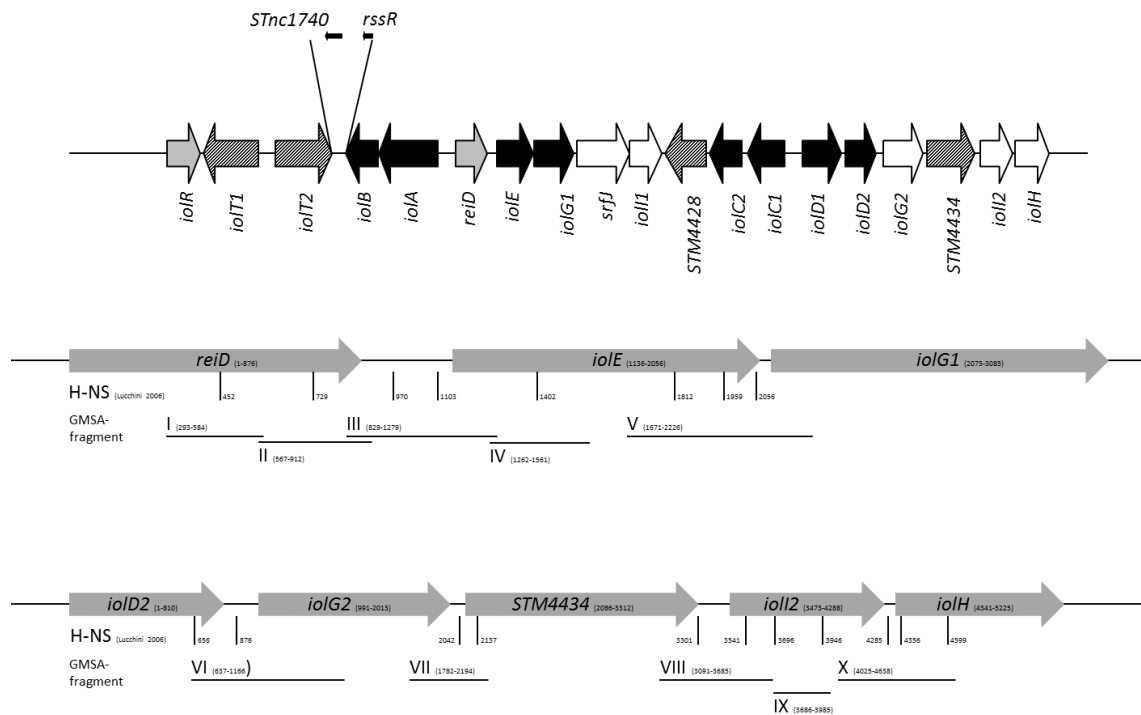


Abb. 43: Visuelle Darstellung der H-NS-Bindestellen innerhalb der GEI4417/4436 nach LUCCHINI (Lucchini *et al.*, 2006). Insgesamt wurden 19 Bindestellen von H-NS identifiziert, die innerhalb oder zwischen den dargestellten Genen liegen. Diese sind durch einen vertikalen Strich und eine Positionsnummer gekennzeichnet. Die römischen Ziffern geben die Nummer der PCR-Fragmente an; die dazu angegebenen Positionsbereiche kennzeichnen DNA-Sequenzen, die durch die PCR-Fragmente abgedeckt werden. Alle Nummern beziehen sich auf die Position des ersten Basenpaares von *reiD* bzw. *ioID2*. Insgesamt wurden 10 PCR-Fragmente hergestellt, die die dargestellten Sequenzen I bis X und damit die insgesamt 19 H-NS-Bindestellen enthielten. Diese wurden für die Bindestudien mittels GMSA verwendet.

Um die von LUCCHINI bestimmten Bindungen von H-NS an die Gene der GEI4417/4436 zu verifizieren, wurden daher GMSAs durchgeführt. Die zu testenden PCR-Produkte enthielten dabei je nach Anzahl der Basenpaare zwischen den H-NS-Bindestellen ein bis drei dieser Bindesequenzen, um nicht zu kurze PCR-Produkte für die GMSAs verwenden zu müssen (Abb. 43). H-NS wurde mittels pBAD-*hns* in *E. coli* KB3 überexprimiert, isoliert und in steigender Konzentration in GMSAs eingesetzt. Wie aus Abb. 44 ersichtlich wird, konnte die Bindung von H-NS an sieben der zehn PCR-Produkte bestätigt werden. Keine H-NS-Bindung war bei den PCR-Produkten I, VII und IX sowie bei der Negativkontrolle zu beobachten. Der erforderliche molare Überschuss, der für eine Verschiebung der DNA-Banden nötig war, betrug: II (81), III (46), IV (37), V (68), VI (43), VIII (48), X (139). Die Anzahl der von LUCCHINI bestimmten H-NS-Bindestellen pro PCR-Produkt hatte dabei keinen offensichtlichen Einfluss auf das

Bindeverhalten. So enthielten die Sequenzen, die bei den GMSA nicht von H-NS gebunden wurden, eine (I) oder zwei (VII, IX) H-NS-Bindestellen in der genomweiten ChIP-on-chip Untersuchung (Lucchini *et al.*, 2006). Ebenso enthielten die PCR-Produkte der positiven GMSAs eine (II, IV), zwei (III, VI, VIII) oder drei (V, X) H-NS-Bindestellen in der genannten Studie.

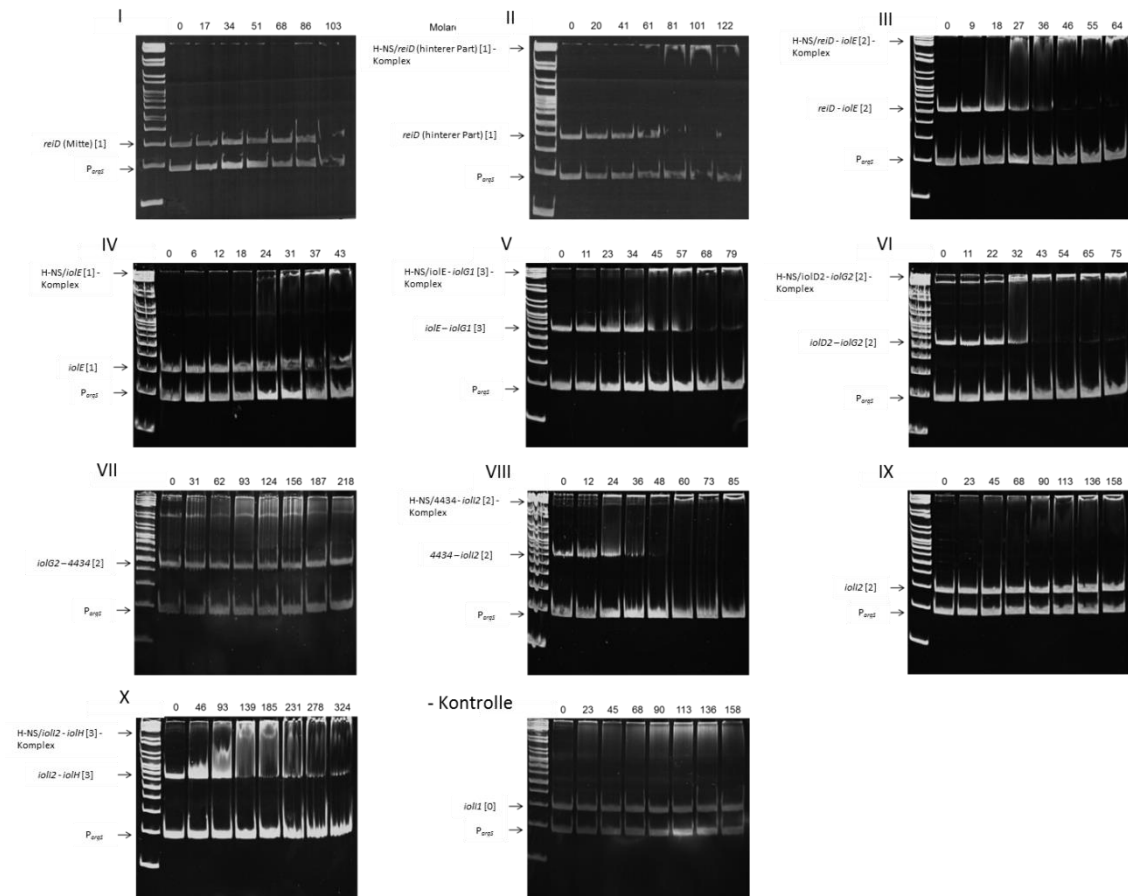


Abb. 44: Nachweis von H-NS-Bindungen an Sequenzen der GEI4417/4436 mittels GMSA. Ansteigende Konzentrationen von aufgereinigtem H-NS wurden jeweils mit 100 ng der zu testenden PCR-Produkte vermischt. Die Promotorsequenz von *argS* diente jeweils als kompetitive Negativkontrolle. Die genauen Positionen der getesteten Sequenzen der GEI4417/4436 sind Abb. 43 zu entnehmen. Der jeweilige molare Überschuss von H-NS gegenüber den PCR-Produkten ist über den Geltaschen beschrieben. Die erste Spalte zeigt jeweils den Größenmarker *GeneRuler™ DNA Ladder Mix*. Außer bei den PCR-Produkten I, VII, IX und der Negativkontrolle *iolI1* waren die H-NS-bedingten Verschiebungen der DNA-Banden bei einem molaren Überschuss zwischen 30 und 80 zu beobachten. Die in den eckigen Klammern vermerkte Zahl gibt die Anzahl der H-NS-Bindestellen an, die das jeweilige PCR-Produkt enthält (siehe Abb. 43).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

MI ist Bestandteil von Zellmembranen und kommt als Metabolit im Darminhalt von Wirbeltieren ubiquitär vor. Bisher sind neben *Salmonella* nur wenige Prokaryoten bekannt, die MI als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. Die Gene, die für den Abbau von MI essentiell sind, befinden sich bei Salmonellen auf der genomischen Insel GEI4417/4436. Neben den katalytischen Enzymen ist dort auch der Transkriptionsregulator ReiD kodiert. Wie die Analyse der bis dato verfügbaren Genomsequenzen sowie von ca. 100 Isolaten ergab, ist *reiD* taxonomisch begrenzt auf die *Salmonella*-Stämme, die die GEI4417/4436 tragen. Diese kommt nahezu ausschließlich innerhalb von *S. enterica* subsp. *enterica* vor.

Durch Wachstumsversuche konnte gezeigt werden, dass ReiD essentiell für den Abbau von MI ist. Zudem wies die *reiD*-Mutante eine reduzierte Wachstumsrate unter ökologisch relevanten Kulturbedingungen wie beispielsweise dem Inhalt des Schweinecaecums auf. Die Überexpression von ReiD in MI-Medium führte hingegen zu einer Halbierung der lag-Phase auf ca. 25 Stunden. Unter Verwendung chromosomaler *lux*-Reporter und GMSAs wurde der Nachweis erbracht, dass ReiD an den Promotor von *ioIE/ioIG1* bindet und die Transkription dieser Gene induziert. Der Phänotyp der *reiD*-Mutante in MI-Medium konnte durch die episomale Überexpression der beiden Gene oder auch durch *reiD* komplementiert werden. Neben dieser für den MI-Metabolismus essentiellen Funktion, P_{ioIE} zu induzieren, ergaben *lux*-Reporterstudien, dass ReiD die Promotoren der Gene *ioIA/ioIB* sowie *ioIC1/ioIC2* induziert und so zu deren starken Expression in MI-Medium beiträgt. Die Transkription von ReiD wird von dem MI-Hauptrepressor IoIR reguliert. Zudem bindet und induziert ReiD als Autoregulator P_{reiD} .

Weitere Reporterstudien und die Messung der RNA-Stabilität zeigten, dass die Expression von ReiD posttranskriptionell von der sRNA RssR beeinflusst wird. Diese erhöht die Halbwertszeit der mRNA *reiD*. Die sRNA ist ebenso wie *reiD* taxonomisch begrenzt auf *Salmonella*-Stämme, die die GEI4417/4436 tragen. Die Deletion von *rssR* führte zu einer signifikanten Erhöhung der Generationszeit in MI-Medium. Northern Blots belegten, dass RssR während des Wachstums in MI-Medium verstärkt exprimiert wird. Zudem wird die Transkription von RssR durch den SPI-2-Hauptregulator SsrB induziert, der an P_{rssR} bindet, wie anhand von GMSAs festgestellt werden konnte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Überexpression von SsrB oder auch RssR eine Erhöhung der ReiD-Konzentration bewirkt. Da die Induktion von RssR aber nicht zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität der ReiD-Zielgene führte, ist vermutlich ein weiterer Faktor an der posttranskriptionellen Regulation von ReiD beteiligt. Ob es sich

dabei um die sRNA STnc1740 handelt, die ebenfalls taxonomisch begrenzt auf der GEI4417/4436 kodiert ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden und benötigt weitergehende Untersuchungen.

Als ein weiteres Zielgen von SsrB, das auf der GEI4417/4436 lokalisiert ist, konnte *srfJ* bestätigt werden. GMSAs und *lux*-Reporterstudien zeigten, dass P_{srfJ} von SsrB gebunden und induziert wird. Des Weiteren wurde der experimentelle Beweis erbracht, dass auch der Repressor H-NS als ein weiterer globaler Regulator an spezifische Regionen der Insel bindet und somit die Transkriptionsaktivität dieser Gene unter bestimmten Bedingungen verhindern könnte. Welche Faktoren dies sind und welche physiologische Bedeutung den H-NS-Bindungen zukommt, muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Um den in der vorliegenden Arbeit belegten Zusammenhang zwischen MI-Metabolismus und Virulenz noch detaillierter zu beschreiben, sollten in einer folgenden Studie *in vivo*-Versuche mit Reporterstämmen durchgeführt werden. Dazu muss neben der Diät des Wirts, durch die eine Konditionierung der Zellen bereits vor der Infektion stattfinden kann, insbesondere auf die Induktion des MI-Metabolismus durch IoIR, SsrB, RssR und ReiD eingegangen werden.

4 Diskussion

4.1 Taxonomische Restriktion des MI-Metabolismus

Über die Verbreitung des MI-Metabolismus bei Prokaryoten ist bisher nur wenig bekannt. So konnten zwar bereits einige Arten mit MI als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert werden (siehe 1.3.2), eine detaillierte Untersuchung innerhalb einer Gattung fand bisher jedoch nicht statt. In diesem Zusammenhang stellen die vorliegenden Daten (siehe 3.1) einen ersten und wichtigen Schritt in diese Richtung dar.

Die Analyse der 80 bis dato publizierten Genomsequenzen von *Salmonella spp.* ergab, dass 66 % dieser Stämme die vollständige GEI4417/4436 tragen, wohingegen die übrigen 34 % keines dieser Gene besitzen. Die Stämme, die *iol*-Gene tragen, gehören ausschließlich der Subspezies I *Salmonella enterica* subsp. *enterica* an. Diese Unterart verursacht nahezu alle Salmonellosen bei Menschen und Säugetieren. Die Stämme der übrigen Unterarten besiedeln exotherme Wirbeltiere und lösen nur in sehr seltenen Fällen Infektionen beim Menschen aus (Giammanco *et al.*, 2002). Betrachtet man nur die 74 Sequenzen der Subspezies I, so enthalten 28 % nicht die genomische Insel zum Abbau von MI. Somit scheint der MI-Metabolismus für rund 72 % der Serovare des Subtyps I von Bedeutung zu sein. Die sechs Sequenzen der übrigen Subspezies enthalten keine Gene, die Homologien zu den Genen der GEI4417/4436 aufweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der MI-Metabolismus nur für die Salmonellen relevant sein könnte, die endotherme Wirbeltiere besiedeln und infizieren.

Ein vergleichbares Bild zeigte die physiologische Untersuchung von 98 Stämmen aus zwei verschiedenen Stammsammlungen (siehe 3.1.2). Dabei wurden die Stämme auf MI-Agar kultiviert und das Vorhandensein der für die GEI4417/4436 charakteristischen Gene *iolR*, *reiD*, *iolE*, *iolG1* und *srjJ* mittels PCR überprüft. Von diesen wiesen 43 Stämme (= 44 %) Wachstum auf MI-Agar auf. 76 aller Isolate gehörten zur Subspezies I, wobei 51 % dieser Stämme auf dem Agar wachsen konnten. Zu den übrigen Subspezies zählten 22 der Isolate. Davon zeigten nur vier Stämme Wachstum auf MI-Agar: (51) *S. salamae* 13,23:z:1,5; (61) *S. salamae* 13,23:z:1,5; (66) *S. diarizonae* 48:l,v:1,5,7 und (84) *S. houtenae* serologisch rauh. Mittels PCR konnten nur bei dem letztgenannten Stamm die *iol*-Gene nachgewiesen werden. Die übrigen Stämme zeigten trotz des Wachstums auf MI-Agar keine Banden in der PCR. Somit konnten von den insgesamt

22 Stämmen, die nicht zur Subspezies I gehören, vier Stämme identifiziert werden, die mit MI wachsen können. Dies bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse der Sequenzanalyse: Die Fähigkeit zum Abbau von MI ist innerhalb der Gattung *Salmonella* fast ausschließlich auf die Subspezies I *S. enterica subsp. enterica* beschränkt. Drei der vier Ausnahmen unterscheiden sich zudem durch einen fehlenden PCR-Nachweis der *iol*-Gene. Der einzige Stamm, der nicht zur Subspezies I gehört und sowohl über Wachstum auf MI-Agar als auch über die getesteten Markergene verfügt, ist das Isolat *S. houtenae* (83). Dieser Stamm aus der Stammsammlung des RKI-Wernigerode (ID 99-00214) konnte gemäß des White-Kauffmann-Le Minor-Schemas nicht ausreichend charakterisiert werden. Dadurch ist es möglich, dass der Stamm nicht zu *S. enterica subsp. houtenae*, sondern zu einer anderen Subspezies gehört. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass dieser Stamm auch Teil der Subspezies I ist.

Sowohl die rein bioinformatische Analyse als auch die Untersuchungen im Labor geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Stämme der *Salmonella*-Subspezies I, die Säugetiere besiedeln, im Gegensatz zu den übrigen Subspezies, die von exothermen Tieren und aus der Umwelt isoliert werden können, mit großer Mehrheit über die Fähigkeit des MI-Metabolismus verfügen. Zudem zeigte die Analyse der Genomsequenzen, dass die Struktur dieser komplexen genomischen Insel innerhalb der Salmonellen hoch konserviert ist. Zusammen mit den bereits publizierten Daten zur möglichen Infektionsrelevanz der *iol*-Gene bestärkt dies die Annahme, dass die genomische Insel GEI4417/4436 tatsächlich eine wichtige Rolle für die Virulenz einer Mehrheit der Stämme von *S. enterica subsp. enterica* spielt (Ruiz-Albert *et al.*, 2002, Lawley *et al.*, 2006, Carnell *et al.*, 2007, Chaudhuri *et al.*, 2009, Chaudhuri *et al.*, 2013). Jedoch fehlt die Insel bei den meisten der Stämme, die in ihrem Wirt systemische Infektionen auslösen, wie z. B. *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* und *C* (siehe 1.1). Betrachtet man die eingangs genannten Prokaryoten, die nachweislich MI nutzen können, so fällt weiterhin auf, dass es sich ausschließlich um Enteropathogene, Saprophyten oder mit Pflanzen assoziierte Arten handelt (siehe 1.3.2). Dies sind Arten, bei denen davon ausgegangen werden kann, dass in ihren Habitaten Phytat bzw. Inositol vorkommt.

4.2 Relevanz von *ReiD* für das *in vivo* Verhalten von *S. Typhimurium*

Wie dargelegt werden konnte, ist der Transkriptionsfaktor *ReiD* taxonomisch begrenzt auf die Spezies *Salmonella* und *E. coli* ED1a (siehe 3.1). In den anderen bekannten Spezies, die homologe Gene der GEI4417/4436 zum Katabolismus von MI tragen, liegt hingegen nur der Repressor *IoIR* vor, der, am Beispiel von *B. subtilis* gezeigt, die *iol*-Gene reguliert (Yoshida *et al.*, 1997). Nimmt man dessen genomische Insel, die im

Vergleich zur GEI4417/4436 von 14028 deutlich weniger komplex ist, als phylogenetischen Vorfahren dieser an, dann stellt sich die Frage, durch welche Funktion sich *ReiD* in die Regulation der GEI4417/4436 integrieren und essentiell für den MI-Metabolismus von Salmonellen werden konnte. Die wegfallende Repression durch *IolR* in MI-Medium im Wildtyp bzw. auch in LB-Medium im $\Delta*iolR*$ -Hintergrund reicht für sich alleine aus, um die Expression der *iol*-Gene und von *reiD* auf ein nahezu maximales Niveau anzuheben (siehe 3.4.1). Dies trifft auch auf das Operon *iolD1/iolD2* zu, welches im Gegensatz zu den anderen essentiellen *iol*-Genen nicht durch *ReiD* induziert wird. Somit induziert *ReiD* zwar mehrere essentielle *iol*-Gene und dient somit vermutlich auch der schnelleren Erhöhung von deren Expression als Antwort auf MI. Als alleinige Funktion erklärt dies jedoch nicht das Vorkommen und die Notwendigkeit von *reiD* in Salmonellen und *E. coli* ED1a.

Einen wichtigen Hinweis liefert die Beobachtung, dass *reiD* zu den 20 Genen gehört, deren Promotoraktivität nach 24 Stunden im Enteritis-Mausmodell am stärksten ist (Rollenhagen & Bumann, 2006). Dies deutet darauf hin, dass *ReiD*, und somit vermutlich auch die *iol*-Gene, in der frühen Phase der Darminfektion eine Rolle spielt. Diese sehr frühe Expression von *reiD* kann in MI-Medium nur unter artifiziellen Bedingungen beobachtet werden, wenn mittels pBR-*reiD* *ReiD* überexprimiert wird. Dadurch halbiert sich die lange lag-Phase in MI-Medium auf ca. 25 Stunden (siehe 3.2.2). Kein anderes Medium, das im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurde, konnte den Promotor von *reiD* aktivieren (siehe auch 3.2.9). Somit stellt sich die Frage, durch welche Umwelt- bzw. *in vivo*-Signale die frühe Expression von *reiD* während des Infektionsgeschehens induziert wird.

Kröger vermutete, dass der Regulator *ReiD* direkt von dem *in vivo* Signal CO_2 /Bicarbonat induziert werde (Kröger, 2010). Bicarbonat wird bei vielen Säugetieren von der Gallenblase und dem Pankreas in den Darm sezerniert und erreicht Konzentrationen von bis zu 150 mM (Meyer *et al.*, 1970, Sewell & Young, 1975, Allen & Flemstrom, 2005). Zudem werden auch virulenzassoziierte Gene von enterohämorrhagischen *E. coli* durch Bicarbonat induziert (Abe *et al.*, 2002). Ein Beispiel für einen solchen Faktor stellt *RegA* des Mauspathogens *Citrobacter rodentium* dar (Yang *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2009). Dieser zählt zu den AraC-Transkriptionsregulatoren und ist autoreguliert. Als ein globaler Virulenzregulator zeigt die *regA*-Deletionsmutante eine signifikant schlechtere Kolonisierung des Mäusedarms im Vergleich zum Wildtypstamm (Hart *et al.*, 2008). Vieles deutet darauf hin, dass *RegA* durch die Bindung von Bicarbonat eine aktivierende Konformationsänderung erfährt (Soisson *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 2009). Daher

postulierten Yang *et al.* (2011), dass der N-terminale Arm von RegA in Abwesenheit von Bicarbonat mit dem restlichen Bereich des Proteins interagiert, wodurch eine DNA-Bindung verhindert wird. Durch die Bindung von Bicarbonat werde diese intramolekulare Bindung aufgelöst und RegA könne an seine DNA-Zielsequenzen binden (Yang *et al.*, 2011). Als Proteine der AraC-Familie weisen ReiD sowie RegA C-terminal ein bzw. zwei Helix-turn-Helix-Motive auf, die im Regelfall der DNA-Bindung dienen. Der N-Terminus ist häufig variabel und dient der Dimerisierung sowie der Ligandenbindung (Gallegos *et al.*, 1997, Martin & Rosner, 2001). Für den N-Terminus von ReiD wurde eine Cupin-2-Domäne vorhergesagt, die funktionell sehr vielseitig sein kann (siehe 3.2.1).

Die von Kröger aufgestellte Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden (siehe 3.2.9). Dazu wurde der Stamm 14028 Δ *reiD* pET-*ioIE/ioIG1* in MI-Medium mit und ohne CO₂ inkubiert. Dieser Stamm kann durch die Überexpression von *ioIE* und *ioIG1* auch ohne das essentielle Gen *reiD* in MI-Medium wachsen. Da dieser Bypass-Stamm jedoch auch weiterhin auf CO₂ im Medium mit einer Halbierung der lag-Phase reagierte, muss ReiD als direkter oder indirekter Interaktionspartner von CO₂/Bicarbonat ausgeschlossen werden. Somit müsste von einem weiteren Faktor ausgegangen werden, der CO₂ wahrnimmt und Signale unabhängig von ReiD in der Zelle auslöst. Wahrscheinlicher ist jedoch ein genereller Effekt von CO₂/Bicarbonat auf die Physiologie und das Wachstum von Bakterien, der bereits vor 90 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde (Valley & Rettger, 1927, Walker, 1932, Gladstone *et al.*, 1935, Neidhardt *et al.*, 1974, Repaske & Clayton, 1978). Dabei wurde festgestellt, dass das Fehlen von CO₂/Bicarbonat im Medium das Wachstum von Bakterien hemmt, wohingegen dessen Zugabe zu einem schnelleren Wachstum und einer kürzeren lag-Phase führte. Da die lag-Phase von *S. Typhimurium* in MI-Medium mit 40-60 Stunden eine enorm lange Dauer aufweist, ist der Effekt von CO₂/Bicarbonat besonders deutlich zu beobachten.

Ein anderer Faktor, der zur frühen und starken Expression von *reiD* während der Infektion beitragen könnte, ist die Nahrung des Wirts, der *Salmonella enterica* vor der Interaktion mit dem Darmlumen ausgesetzt ist und so die Zellen vor dem eigentlichen Kontakt mit der Wirtszelle konditioniert. Um diesen möglichen Einfluss zu untersuchen, wurde *S. Typhimurium* in Medien kultiviert, die einen hohen Anteil an Inositol enthalten bzw. von denen dies vermutet wird (siehe 3.2.3) (Reddy, 2002, Matsumoto *et al.*, 2012). Dabei zeigte die *reiD*-Mutante eine signifikant längere Verdopplungszeit innerhalb von 24 Stunden im Vergleich zum Wildtyp in den Medien aus Kompost, Maissilage und dem Inhalt des Schweinecaecums. Im Kraftfutter sowie in

der LB-Medium-Kontrolle war kein signifikanter Unterschied messbar. Dies kann durch die Verfügbarkeit von Inositol erklärt werden: Die sechsfach phosphorylierte Form von MI, Phytat, dient in Pflanzen als Phosphatspeicher (Raboy, 1997, Kasim & Edwards, 1998). Da *S. Typhimurium* über keine Gene verfügt, die für Phytasen kodieren, könnten die Zellen auf die Dephosphorylierung durch andere kommensale Mikroorganismen im Boden, in den Nahrungsmitteln oder im Darm angewiesen sein (Haros *et al.*, 2009). Inositol ist ein gewöhnlicher Metabolit im Darm (Wang *et al.*, 2007), und neben der Nahrung könnte hier auch die Zellmembran der Wirtszellen eine Quelle für Inositol darstellen. Dieses kommt in der Membran eukaryotischer Zellen als Phosphatidylinositol vor und dient der Weiterleitung von Signalen (Hawkins & Stephens, 2015). Es ist plausibel, dass in dem trockenen und mit Hitze behandeltem Kraftfutter im Vergleich zu Kompost, Maissilage oder dem Inhalt des Schweinecaecums eine deutlich geringere mikrobielle Aktivität vorliegt. Somit wäre das MI in diesem Medium für *S. Typhimurium* nicht verfügbar, wodurch der fehlende Unterschied zwischen Wildtyp und *reiD*-Mutante erklärt werden kann. Bemerkenswert ist, dass sich der funktionsfähige MI-Metabolismus in den drei Medien, die dem Milieu innerhalb des Darms zumindest näher kommen, signifikant im nur 24-stündigen Wachstum der Zellen bemerkbar macht. Dies könnte durch *in vivo*-Signale erklärt werden, die im Gegensatz zum Minimalmedium mit MI in diesen komplexen Medien vorliegen.

Auf der genomischen Insel ist die hochkonservierte sRNA RssR kodiert, deren Promotor von dem Virulenzregulator SsrB der SPI-2 induziert wird und die den MI-Metabolismus positiv beeinflusst (siehe 3.3). Diese Entdeckung bestärkt den vermuteten Zusammenhang zwischen Virulenz und MI-Metabolismus von *S. Typhimurium*. Die Induktion von SsrB findet in der intrazellulären Phase, z. B. in Makrophagen, statt, wo aber die essentiellen Gene der GEI4417/4436, zumindest innerhalb der ersten 12 Stunden, nicht exprimiert werden (Eriksson *et al.*, 2003). Dagegen ist in Makrophagen die Expression von *iolR* und die der bicistronisch transkribierten Gene mit unbekannter Funktion *srjJ* und *iolI1* im Vergleich zur stationären Phase in LB-Medium jeweils um den Faktor 4 hochreguliert (Srikumar *et al.*, 2015). Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass die SsrB-regulierten Gene der SPI-2 auch dann schon induziert werden, wenn sich die Zellen noch im Darmlumen befinden (Brown *et al.*, 2005, Osborne & Coombes, 2011). Dadurch scheint es möglich, dass der Virulenzregulator SsrB bereits im Darmlumen aktiviert wird und dort über die sRNA RssR an der Induktion des MI-Metabolismus beteiligt ist (siehe 3.3.3).

Die sRNA RssR fiel auf, weil sie innerhalb der GEI4417/4436 lokalisiert ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sie hinsichtlich ihrer Regulation und Funktion

analysiert. Die Deletion von *rssR* führte zu einem schwächeren Wachstum in MI-Medium, das durch eine verlängerte lag-Phase und eine erhöhte Verdopplungszeit gekennzeichnet ist (siehe 3.3.2). Die episomale Expression von RssR mittels pZE-*rssR* konnte die wildtypische Wachstumsrate wiederherstellen. Die lag-Phasendauer des Wildtyps wurde dadurch jedoch nicht erreicht. Besonders bemerkenswert ist das Ergebnis, dass die Überexpression von RssR sowohl in dem Komplementationstamm als auch in dem reinen RssR-Überexpressionsstamm, der die wildtypische lag-Phase aufwies, zu einer deutlich höheren optischen Dichte der Kultur in der stationären Phase im Vergleich zum Wildtyp führte (Abb. 29). Ein vergleichbarer Phänotyp ist nach derzeitigem Kenntnisstand bisher noch nicht beschrieben worden. Eine plausible Hypothese zur Erklärung des Phänomens ist schwer abzuleiten, zumal die Deletion der sRNA nicht zu einem gegenteiligen Phänotyp führt. Ein mögliches Szenario könnte folgendermaßen aussehen: Unter Standardbedingungen metabolisieren die Zellen das im Medium verfügbare MI nicht vollständig, da das Wachstum bereits vorher reprimiert wurde, z. B. durch *quorum sensing* Faktoren, die eine Reaktion auf die Zelldichte oder den Zustand der Zellen vermitteln (Keller & Surette, 2006). Durch die Überexpression von RssR und die damit einhergehende Stabilisierung der mRNA *reiD* wird die im Wildtyp eintretende Hemmung des MI-Metabolismus vor Ende der exponentiellen Phase verhindert, sodass sich die Zellen hier so lange vermehren, bis MI vollständig aus dem Medium aufgenommen und metabolisiert wurde. Hierfür spricht, dass die Aktivität von P_{reiD} in MI-Medium bereits vor Ende der exponentiellen Phase wieder abnimmt (Abb. 18). Um diese Hypothese weiter untermauern zu können, müssten die Mengen an MI während des Wachstums des Wildtyps und des RssR-Überexpressionsstamms gemessen und miteinander verglichen werden. Zudem sollte ebenso die Trockenmasse während des Wachstums verfolgt werden.

Die Regulation und Funktion von RssR hinsichtlich des MI-Metabolismus wurde mittels GMSA, chromosomaler Reporter und Stabilitätsanalysen von mRNA untersucht. Die Ergebnisse von Kröger und aus Abschnitt 3.3.1 deuten darauf hin, dass es sich bei RssR um ein primäres Transkript handelt (Kröger *et al.*, 2012, Kröger *et al.*, 2013). Das bedeutet, dass diese sRNA nach der Transkription nicht prozessiert wird und somit sehr wahrscheinlich über einen eigenen Promotor verfügt. In einer genomweiten Untersuchung identifizierten Tomljenovic-Berube *et al.* (2010) eine Bindestelle des SPI-2 Hauptregulators SsrB in der intragenischen Region von *iolB*, die sich 76 bp 5'-gelegen von *rssR* befindet. Mit Hilfe von GMSAs konnte dies bestätigt werden. Die Qualität dieser Bindung wurde unter Verwendung von chromosomalen Reportern quantitativ bestimmt: Die Überexpression von SsrB induzierte die Transkription der sRNA um den Faktor 15,0 (siehe 3.3.3). Der molare Überschuss an SsrB, der im GMSA

eingesetzt werden musste, um ein Verschieben der DNA-Bande zu erreichen, ist bei der P_{rssR} -DNA nahezu identisch zur positiv-Kontrolle P_{sseA} . Dagegen ist die Reaktion des *lux*-Reporters von P_{sseA} gegenüber P_{rssR} um den Faktor 66 deutlich stärker. Dies deutet darauf hin, dass auch geringe Steigerungen der Transkription von *rssR* ausreichend sind, um den physiologischen Zweck der sRNA zu erfüllen.

Die Funktion von RssR wurde ebenfalls mittels chromosomaler Reporter für alle transkriptionellen Elemente der GEI4417/4436 analysiert. Dabei führte die Überexpression von *rssR* mittels $pZE-rssR$ zur Induktion des *reiD::lux*-Reporters in LB-Medium um den Faktor 11. Jedoch zeigt kein anderer Reporter innerhalb der GEI4417/4436 eine Antwort auf $pZE-rssR$. Bemerkenswert ist dabei, dass das Konstrukt $P_{reiD::lux}$ nur mit einer 2,7-fachen Induktion auf die überexprimierte sRNA reagierte (siehe Abb. 34). Der Unterschied zwischen diesen beiden Reportern besteht darin, dass die *luxCDABE*-Kassette bei $P_{reiD::lux}$ direkt hinter die 5'-UTR von *reiD* integriert wurde, wohingegen sich der Reporter bei *reiD::lux* direkt 3'-gelegen zum Stoppcodon befindet. Somit handelt es sich bei $P_{reiD::lux}$ um einen klassischen Reporter der chromosomalen Promotoraktivität, also der Transkriptionsaktivität. *reiD::lux* ist hingegen ein Reporterkonstrukt, das zusätzlich auch die Faktoren messen kann, die zwischen dem Transkriptionsstart und dem Stoppcodon auf das mRNA-Transkript einwirken. Das können beispielsweise sRNAs sein, die über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Regulation der mRNA nehmen (siehe 1.2). Im Falle von *reiD::lux* liegt nach der Transkription eine mRNA vor, die aus der 5'-UTR von *reiD*, *reiD*, der Sequenz zwischen *reiD* und *luxCDABE* sowie *luxCDABE* besteht. Ribosomenbindestellen befinden sich daher sowohl vor dem Startcodon von *reiD* als auch jeweils vor den fünf *lux*-Genen (Winson *et al.*, 1998). Da nur der *reiD::lux*-Reporter, aber nicht $P_{reiD::lux}$ auf die konstitutive Überexpression von RssR reagiert, deutet dies auf einen Effekt von RssR auf die mRNA *reiD* hin, wobei der wahrscheinliche Interaktionsbereich zwischen dem Start- und dem Stoppcodon auf der mRNA *reiD* liegt. Eine Wirkung von RssR auf die mRNA *reiD* konnte durch die Messung der RNA-Stabilität bestimmt werden (siehe 3.3.5). Dabei besaß die mRNA *reiD* in der *rssR*-Mutante eine wesentlich kürzere Halbwertszeit im Vergleich zum Wildtypstamm. Durch die konstitutive Überexpression mittels $pZE-rssR$ konnte die Halbwertszeit im Vergleich zum Wildtyp sogar noch weiter verlängert werden. Die verwendete Kontrolle, die mRNA *ioIT2*, zeigte hingegen keinerlei signifikante Änderung ihrer Stabilität in den drei unterschiedlichen Stämmen. Die Ergebnisse dieser Versuche legen eine stabilisierende Wirkung von RssR auf die mRNA *reiD* sehr nahe. Der Mechanismus könnte demnach entsprechend dem Modell aus Abb. 3D funktionieren (siehe 1.2): Das Hfq-Hexamer bindet RssR, wodurch der Komplex an die mRNA *reiD* binden kann und dort die Schnittstellen der RNase E

blockiert. Dadurch wird die mRNA nicht degradiert und bleibt im Zytosol erhalten (Moll *et al.*, 2003, Vogel & Luisi, 2011). Das hat zur Folge, dass die Menge an mRNA *reiD* in der Zelle angereichert wird, was in einer erhöhten Syntheserate von ReiD resultieren kann (siehe Abb. 45).

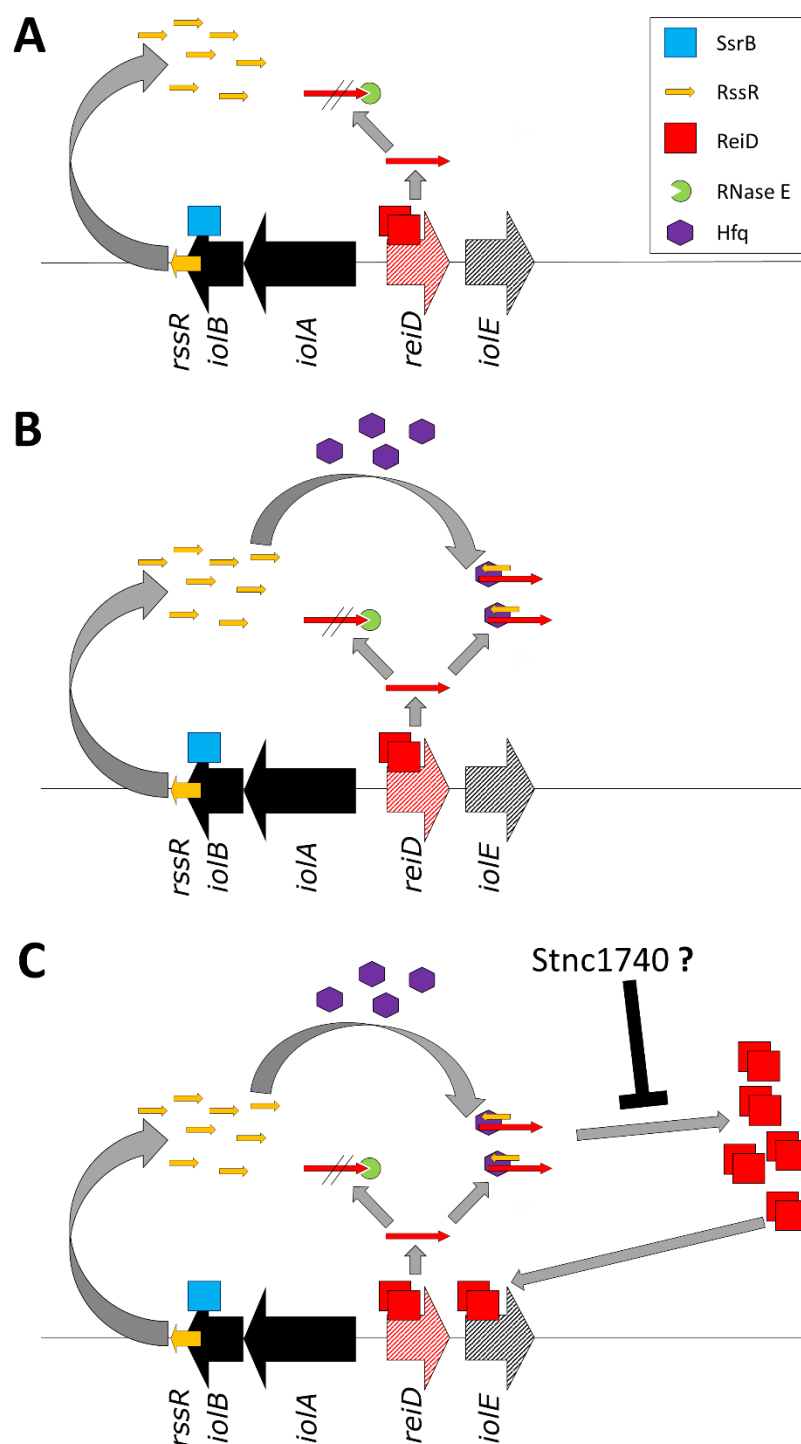


Abb. 45: Modell zur Regulation und Funktion von RssR. (A) ReiD bindet an P_{reiD} und induziert als Autoregulator die Transkription von *reiD* auf einem niedrigen Niveau. Die mRNA *reiD* wird daraufhin von der RNase E degradiert, sodass es nicht zur Translation kommt. SsrB bindet an P_{rssR} innerhalb der Gensequenz von *ioiB* und induziert die

Transkription von RssR. (B) RssR bindet zusammen mit Hfq an die mRNA *reiD*, wodurch sie stabilisiert und vor der RNase E-vermittelten Degradation geschützt wird. (C) Dadurch kommt es vermehrt zur Translation von ReiD. Die so erhöhte Konzentration des Regulators kann zur starken Induktion der entsprechenden Promotoren führen, z. B. von *reiD* und *ioIE*. In Abwesenheit von MI im Medium scheint jedoch ein weiterer Faktor, möglicherweise Stnc1740, die Translation der stabilisierten mRNA *reiD* zu reprimieren.

Diese Ergebnisse bestärken den vermuteten Zusammenhang zwischen Virulenz und MI-Metabolismus am konkreten Beispiel ReiD. Dadurch kann jedoch noch nicht erklärt werden, warum nur $P_{reiD}::lux$ und insbesondere *reiD::lux* auf die Überexpression von RssR in LB-Medium reagieren und nicht auch die Zielgene von ReiD (siehe dazu 4.4).

4.3 Einfluss der globalen Regulatoren SsrB und H-NS auf die Expression der Gene der GEI4417/4436

4.3.1 SrfJ wird sowohl durch die Aktivierung des MI-Metabolismus als auch in der intrazellulären Phase exprimiert

Neben der bereits dargestellten Regulation von RssR durch SsrB nimmt der SPI-2-Hauptregulator auch Einfluss auf die Expression anderer Gene der GEI4417/4436. So wurde bereits gezeigt, dass SsrB induzierend auf die Expression von SrfJ wirkt (Worley *et al.*, 2000, Husain *et al.*, 2010, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diesen Zusammenhang. So konnte mittels GMSA und chromosomalen Reportern gezeigt werden, dass SsrB innerhalb der 5'-gelegenen 300 bp von *srfJ* bindet und die Expression der putativen lysosomalen Glykosylceramidase induziert (Abb. 40 und 41). Unter diesen Bedingungen wird *srfJ* bicistronisch zusammen mit *iolI1* transkribiert. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass diese beiden Gene zusammen mit den beiden 5'-gelegenen Genen *ioIE* und *ioIG1* auf einem tetracistronischen mRNA-Transkript liegen können. Dies findet dann statt, wenn in MI-Medium P_{ioIE} von ReiD induziert wird (Abb. 10, 16, 19 und 20). Da die Expression von ReiD durch IolR reprimiert wird, reguliert der Repressor des MI-Metabolismus indirekt auch die Transkription von *srfJ/iolI1* (Tab. 20). So führte die Deletion von *iolR* auch zu einer Erhöhung der Aktivität von *srfJ/iolI1::lux* um den Faktor 144. Eine mögliche direkte Bindung von IolR an P_{srfJ} wurde durch GMSA getestet und konnte nicht bestätigt werden (siehe 3.4.1). Somit wird die Expression von *srfJ* sowohl direkt durch den globalen Regulator SsrB induziert als auch indirekt durch IolR reguliert. Dies geschieht in zwei Schritten: IolR bindet und reguliert P_{reiD} und ReiD bindet und induziert wiederum P_{ioIE} .

Diese Ergebnisse bestätigen auch die Daten von Cordero-Alba *et al.* (2012). Sie zeigen jedoch auch eine Ungenauigkeit in der Studie von 2012 auf, da die Autoren ihr Ergebnis, dass *IoLR* ein negativer Regulator von *srfJ* sei, nicht mit weiteren Experimenten verifizierten. So fanden sie zwar ebenfalls heraus, dass die Deletion von *ioLR* zur massiven Steigerung der Transkription von *srfJ* führte. Es wurde jedoch nicht versucht, den Promotor von *srfJ* zu identifizieren und die direkte Interaktion zwischen *IoLR* und diesem nachzuweisen. Die Schlussfolgerung, die die Autoren aus ihrem Experiment zogen, *IoLR* sei der Repressor der Transkription von *srfJ*, ist dahingehend nicht korrekt, dass *IoLR* die Expression von *srfJ* nur indirekt über die Repression von P_{reiD} reguliert. Die Transkription von *srfJ* steht hingegen unter der direkten Kontrolle von P_{ioLE} und P_{srfJ} , die beide nicht von *IoLR* gebunden werden.

Mit diesem Hintergrund ist das Ergebnis von Cordero-Alba *et al.* (2012) hinsichtlich der Lokalisation von SrfJ interessant. Es zeigte sich, dass in SPI-2-induzierendem LPM-Medium, in dem die Expression von *srfJ* durch P_{srfJ} aktiviert wird, SrfJ sowohl im Zelllysate messbar ist als auch in den Kulturüberstand sekretiert wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass zumindest der N-terminale Abschnitt von SrfJ mittels des T3SS der SPI-2 in das Zytosol von Makrophagen injiziert wird. Dagegen wurde SrfJ nur im Zelllysate und nicht im Kulturüberstand detektiert, wenn die Zellen mit MI kultiviert worden waren. Das ist die Kulturbedingung, bei der P_{ioLE} die Transkription von *srfJ* reguliert. Dies zeigt, dass ein Protein, auch wenn es unter verschiedenen Bedingungen exprimiert wird, nicht notwendigerweise im gleichen Kontext von der Zelle benötigt wird. Da die Deletion der beiden Gene *srfJ* und *ioII1* jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum in MI-Medium hat, ihre Expression aber sowohl zusammen mit den Genen des MI-Metabolismus als auch durch den SPI-2 Virulenzregulator SsrB allein induziert wird, muss vermutet werden, dass sie eine Rolle für den MI-Metabolismus in einem natürlichen Habitat von *S. Typhimurium* spielen. Die Ergebnisse von Ruiz-Albert *et al.* (2002) legen als eine mögliche Umweltbedingung das Infektionsgeschehen nahe. Hier konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *srfJ* eine Reduktion des kompetitiven Index bei der peritonealen Infektion von Mäusen zur Folge hat.

Ein mögliches Szenario für die orale Infektion wäre, dass das in der Nahrung bzw. im Darminhalt enthaltene MI den MI-Metabolismus induziert, wodurch auch SrfJ über die tetracistronische mRNA exprimiert wird (siehe Abb. 46). Dieses würde jedoch noch nicht in die Wirtszelle transloziert werden, da das T3SS der SPI-2 erst innerhalb der Wirtszelle aktiviert wird (Shea *et al.*, 1996, Cirillo *et al.*, 1998, Kuhle & Hensel, 2004). Sobald dies geschieht, könnte das in den Salmonellenzellen angereicherte SrfJ in hoher Konzentration in die Wirtszelle injiziert werden.

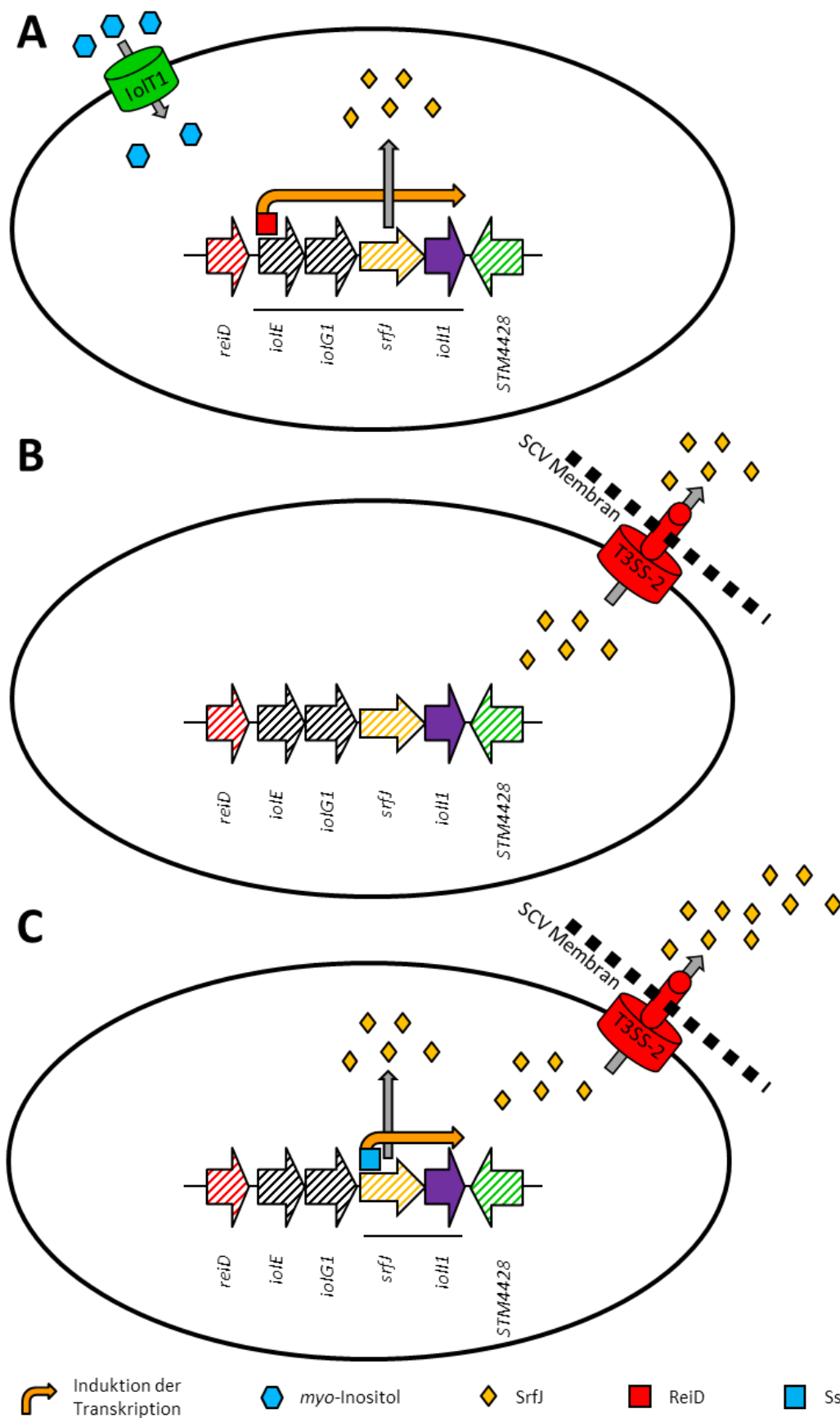


Abb. 46: Modell zur Regulation und transkriptionellen Organisation von *srfJ*. (A) In Gegenwart von MI induziert ReiD das tetracistronische Operon *ioIE/ioIG1/srfJ/ioII1*. Dadurch können die Zellen MI degradieren und die Konzentration von SrfJ wird im Zytosol erhöht. (B) Nachdem die Salmonellen von den Wirtszellen aufgenommen wurden, wird SrfJ durch das neu assemblierte T3SS-2 in die Wirtszelle injiziert. Die Expression des tetracistronischen Operons ist nicht

weiter aktiviert, da kein MI innerhalb der SCV verfügbar ist. (C) Der SPI-2-Hauptregulator SsrB induziert die Expression des bicistronischen Operons *srfJ/ioll1*, sodass weiterhin SrfJ exprimiert und durch das T3SS-2 in die Wirtszelle injiziert wird.

Die zweite Möglichkeit zur Expression von *srfJ*, über SsrB und P_{srfJ} , wäre in diesem Modell nötig, um SrfJ auch im weiteren intrazellulären Infektionsgeschehen, unabhängig von MI-Metabolismus, exprimieren zu können. Dies wäre auch der Induktionsweg, der bei der peritonealen Infektion abläuft. Welche Funktion SrfJ im Infektionsgeschehen erfüllt, ist jedoch weiterhin unbekannt.

4.3.2 H-NS als Schlüsselement des *xenogeneic silencing*

Horizontaler Gentransfer (HGT) spielt eine wichtige Rolle für die bakterielle Evolution. Er ermöglicht die Verbreitung genetischer Informationen und fördert somit die genetische Variabilität, wodurch die Wahrscheinlichkeit, einer Selektion zu widerstehen bzw. neue ökologische Nischen zu besetzen, erhöht wird (Hacker & Kaper, 2000, Ochman *et al.*, 2000, Fani & Fondi, 2009, Rohmer *et al.*, 2011, Ali *et al.*, 2014, Paul *et al.*, 2016, Singh *et al.*, 2016).

Die Analyse genomischer Daten ergab, dass der Stamm *S. Typhimurium* LT2 seit der phylogenetischen Trennung von *Salmonella* und *E. coli* vor rund 140 mio. Jahren ca. 200 DNA-Sequenzen mit einer Länge von über 100 bp mittels HGT aufgenommen hat, die in etwa 1400 ORFs (*open reading frame*, offener Leserahmen) beinhalten (Ochman & Wilson, 1987, Porwollik & McClelland, 2003, Desai *et al.*, 2013). Dies zeigt, dass die stabile, langfristige Aufnahme von neuem genetischem Material mit einer Fragmentlänge >100 bp bei *S. Typhimurium* im Mittel alle 100.000 Jahre stattfindet. Zu den am besten untersuchten genomischen Inseln, die von *Salmonella* mittels HGT aufgenommen wurden und essentiell für die derzeitige Lebensweise des Pathogens geworden sind, zählen die SPI-1 und SPI-2. Die Genprodukte der SPI-1 erlauben es den Zellen, in die Wirtszellen mittels induzierter Phagozytose einzudringen. Durch die SPI-2 ist *S. enterica* in der Lage, intrazellulär zu überleben und zu proliferieren. Auch bei der GEI4417/4436 handelt es sich vermutlich um ein genetisches Element, das durch HGT verbreitet wird. So flankieren zwei Gene, die für Transposasen kodieren, die entsprechende Insel in *E. coli* ED1a. Diese könnten den HGT der Insel mittels Transposon ermöglichen. Da es sich bei ED1a um den einzigen bekannten Stamm außerhalb von *Salmonella* handelt, der die GEI4417/4436 trägt, kann spekuliert werden, dass die Insel erst in jüngerer Vergangenheit mittels HGT auf diesen Stamm übertragen wurde.

Die Regulation der aufgenommenen Fremd-DNA spielt eine essentielle Rolle für Bakterien. Dabei bewegen sie sich in dem Spannungsfeld aus dem großen Selektionsvorteil, den die Aufnahme von Fremd-DNA ermöglicht, und dem Risiko, dass diese DNA die bereits bestehenden Regulationsnetzwerke und die Zellphysiologie negativ beeinflusst (Will *et al.*, 2015, Singh *et al.*, 2016). In diesen Fällen ist es einerseits möglich, dass die Genprodukte prinzipiell toxisch für die Zelle sind, andererseits, dass die Regulation der neuen Genprodukte noch nicht hinreichend in die bestehenden regulatorischen Netzwerke integriert ist und diese stören. Hier kann die nicht optimale Regulation die kompetitive Fitness der Zellen reduzieren: Eine zu hohe Expression verursacht Fitnesskosten und eine zu geringe Expression erzeugt keinen Selektionsvorteil, sodass die Fremd-DNA nicht stabil im Genom verbleiben wird. Die Deregulation einzelner Gene oder auch ganzer genomischer Inseln kann dabei letale Folgen für die Zellen haben. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Gene der SPI-2 zu einer nahezu vollständigen Attenuation bei der intraperitonealen Infektion von Mäusen führt (Coombes *et al.*, 2005). Die Überexpression der Gene wurde durch die Deletion des SPI-2 Repressors YdgT erreicht, was in einem biphasischen Infektionsverhalten resultierte: 24 Stunden nach Infektion weist die Mutante einen Vorteil gegenüber dem Wildtyp im kompetitiven Index auf. Nach 55 Stunden ist die Mutante jedoch schon nahezu vollständig vom Wildtyp auskonkurriert worden.

Daher ist es für Zellen essentiell, die neu ins Genom aufgenommenen DNA-Sequenzen transkriptionell stringent zu reprimieren. Dieser Prozess wird als *xenogeneic silencing* (engl. für Fremdgen-Repression) bezeichnet. Am Beispiel von *E. coli* und *S. Typhimurium* konnte gezeigt werden, dass H-NS eine entscheidende Rolle dabei spielt, indem es vorrangig Fremd-DNA bindet, die in den meisten Fällen einen deutlich höheren AT-Gehalt aufweist, und reprimiert (Grainger *et al.*, 2006, Lucchini *et al.*, 2006, Navarre *et al.*, 2006, Oshima *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2016). H-NS ist ein Strukturprotein des Chromatins und fungiert als Repressor, indem es Bereiche auf der DNA besetzt und diese so vor Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase verdeckt bzw. diese verdrängen kann. Dadurch verhindert es die unkontrollierte Transkription insbesondere mittels HGT aufgenommener DNA-Sequenzen. Die Vermutung, dass es sich bei der GEI4417/4436 ebenfalls um ein durch HGT aufgenommenes genetisches Element handelt, wird durch die Ergebnisse von Lucchini *et al.* (2006) bestärkt. In dieser genomweiten Untersuchung wurden H-NS-Bindestellen mittels ChIP-on-chip im Genom von *S. Typhimurium* LT2 identifiziert, wobei auch 19 Bindestellen innerhalb der GEI4417/4436 bestimmt wurden. Diese Bindestellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf zehn PCR-Produkten

zusammengefasst. In den folgenden GMSAs konnte für sieben dieser DNA-Fragmente eine direkte Bindung von H-NS bestätigt werden (siehe 3.4.3). Dabei waren Bindungen in der Promotorregion bzw. innerhalb der Gensequenz von *reiD*, *ioIE*, *ioID2*, *ioIG2*, *ioII2* und *ioIH* nachweisbar. Entgegen der Vorhersage aus der genomweiten Untersuchung fand keine Interaktion zwischen H-NS und der mittleren intragenischen Region von *reiD* sowie der 5'-UTR und der intragenischen Region von *STM4434* statt. Auch die beiden putativen Bindungen an die Sequenz von *ioII1* konnten nicht bestätigt werden. Die Bindung an die essentiellen Gene *reiD*, *ioIE* und *ioID2* legt jedoch einen Zusammenhang zwischen der H-NS-vermittelten Repression und dem MI-Metabolismus nahe. Ob die nachgewiesene Bindung von H-NS an mehrere Gene der GEI4417/4436 tatsächlich einen physiologischen Einfluss auf die Regulation des MI-Metabolismus hat, muss in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

H-NS weist eine nur geringe Spezifität zur Sequenz der DNA, aber eine hohe Affinität zur Struktur AT-reicher Regionen auf (Sette *et al.*, 2009, Gordon *et al.*, 2011). Der N-Terminus dieses 15,6 kDa großen Proteins besteht aus zwei Dimerisierungsdomänen und ist durch eine flexible Struktur mit dem C-Terminus verbunden. Dieser ermöglicht die Bindung des Proteins an die DNA (Bertin *et al.*, 1999, Dorman *et al.*, 1999, Dorman, 2004). Somit ist H-NS nach der initialen Bindung an die DNA in der Lage, sowohl Oligomere entlang der DNA (*stiffening*, Versteifung) als auch DNA-H-NS-DNA Brücken (*bridging*, Überbrückung) zwischen entfernten DNA-Sequenzen auszubilden (Dame *et al.*, 2005, Dame *et al.*, 2006, Dorman, 2007). Der jeweilige Modus ist dabei abhängig von den physiologischen Bedingungen in der Zelle, insbesondere der Konzentration bivalenter Ionen. Dabei ist der *stiffening*-Modus bei niedrigen Konzentrationen an Mg^{2+} - oder Ca^{2+} -Ionen *in vitro* zu beobachten, wohingegen der *bridging*-Modus bei hohen Konzentrationen vorliegt (Liu *et al.*, 2010). Das Modell einer dritten möglichen H-NS-DNA-Interaktion wurde kürzlich postuliert. Dieser Zustand, der *intrabridging*-Modus genannt wird, beschreibt eine kondensierte DNA-Struktur, bei der die DNA-H-NS-DNA-Brücken zwischen den direkt benachbarten Bereichen bei der spiralförmig verdrehten DNA auftreten. Dem Modell nach entsteht dies, wenn hohe Konzentrationen an Mg^{2+} -Ionen zusammen mit H-NS und Hha, einem weiteren Protein der H-NS-Familie, vorliegen (Singh *et al.*, 2016).

Durch H-NS wird die transkriptionelle Repression von Fremd-DNA reguliert, sodass eine schädliche Wirkung verhindert wird. Um jedoch einen Selektionsvorteil aus den genetischen Informationen ziehen zu können, sind Mechanismen nötig, die diese Repression kontrolliert aufheben. Dieser Prozess wird als *counter-silencing* (Gegenrepression) bezeichnet. Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher

Funktionsweisen, die zur Aufhebung der H-NS-vermittelten Repression führen (Stoebel *et al.*, 2008). So kann die Polymerisierung von H-NS blockiert oder die DNA-H-NS-DNA-Brücke aufgebrochen werden, indem H-NS verdrängt oder eine Konformationsänderung der DNA bewirkt wird. Ein Beispiel hierfür ist SsrB, das H-NS verdrängen kann, sofern es im *stiffening*-Modus vorliegt (Walthers *et al.*, 2011). Daher könnte in einem weiterführenden Projekt untersucht werden, ob die Überexpression von SsrB in einem Medium, welches den *stiffening*-Modus von H-NS begünstigt, zu einer erhöhten Expression der Gene *reiD*, *iolE*, *iolD2*, *iolG2*, *iolI2* und *iolH* führt, die von H-NS gebunden werden.

4.4 Modell zur Regulation der GEI4417/4436 im Zusammenspiel zwischen MI-Metabolismus und Virulenz

Die Regulation der Gene der GEI4417/4436 verläuft sehr komplex, insbesondere im Vergleich zum unidirektionalen *iol*-Operon in *B. subtilis* (Yoshida *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte das Modell zur Regulation des MI-Metabolismus in *S. Typhimurium* von Kröger (2010) (siehe Abb. 8) um die detaillierten Funktionen von *ReiD* und der sRNA *RssR* sowie von *SsrB* und *H-NS* ergänzt und hinsichtlich des Einflusses von CO_2 korrigiert werden. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und aus der Arbeit von Kröger (2010) in Bezug auf die transkriptionelle Organisation sowie die Bindung von Regulatorproteinen sind in Abb. 47 zusammenfassend dargestellt. Ebenso sind auch die Gene markiert, deren Mutation zur Attenuation in verschiedenen Tiermodellen führt.

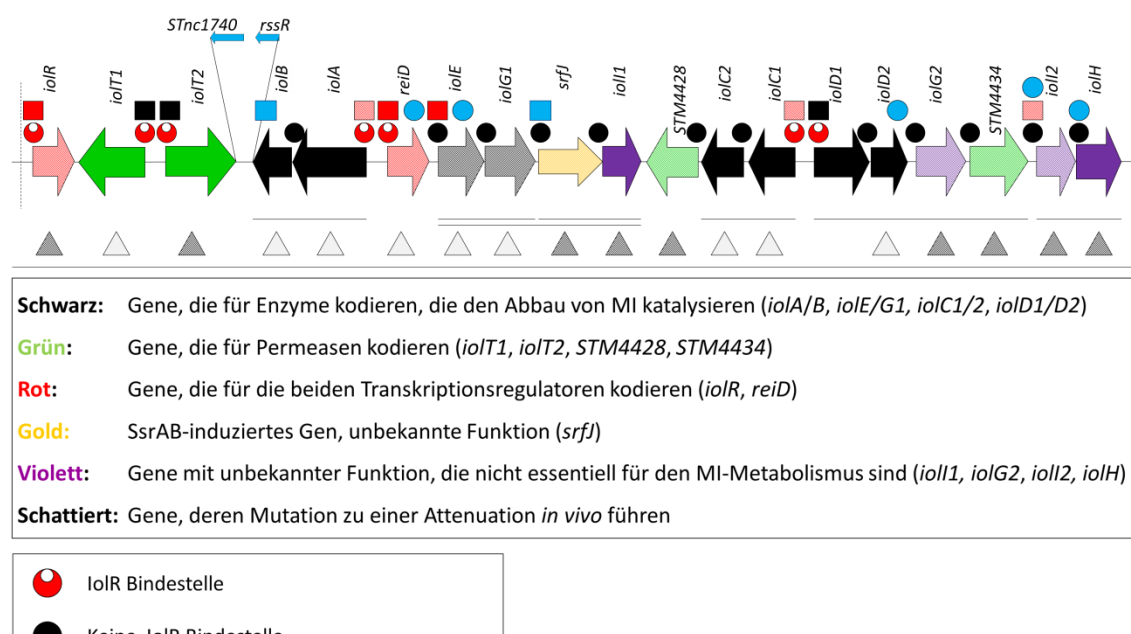


Abb. 47: Vollständige Darstellung der transkriptionellen Organisation und Regulation der genomischen Insel GEI4417/4436.

Die Voraussetzung für das Modell ist, dass trotz der Repression durch IoIR und der fehlenden Induktion durch ReiD die essentiellen IoI-Enzyme auch in Abwesenheit von MI zumindest in geringer Konzentration in den Zellen vorliegen. Sobald sich die Salmonellenzelle in einer ökologischen Nische befindet, in der MI verfügbar ist, wird dieses durch IoIT1 in das Zytosol transportiert und durch IoIG, IoIE, IoID1/IoID2, IoIB und IoIC1/IoIC2 zu DKP katalysiert. Dieses Molekül bindet als Zwischenprodukt des MI-Katabolismus an den Repressor IoIR, der an die Promotoren aller essentiellen Gene, außer an P_{IoIE} , bindet und deren Transkription reprimiert. Durch die Interaktion mit DKP wird IoIR inaktiviert, sodass sich IoIR von der DNA löst und die Repression aufgehoben wird. Dadurch kann die Transkription von *ioIT1*, *ioIT2*, *ioIA/ioIB*, *ioIC1/ioIC2* und *ioID1/ioID2/ioIG2/STM4434* sowie auch autoregulatorisch von *ioIR* stattfinden. Zudem wird die Repression der Expression von *reiD* aufgehoben. Das synthetisierte ReiD bindet und induziert daraufhin als positiver Autoregulator P_{reiD} sowie den IoIR-unabhängigen Promotor $P_{IoIE/ioIG1/srfj/ioI1}$. Zudem führt die Erhöhung der ReiD-Konzentration in der Zelle direkt zu einer gesteigerten Transkription von *ioIA/ioIB*, *ioIC1/ioIC2*, *ioI2/ioIH* sowie von *ioIR* und somit aller essentiellen Gene außer *ioIT1* und *ioID1/ioID2*. Durch die wegfallende Repression durch IoIR und die beginnende Induktion ausgelöst von ReiD steigt die Genexpression aller Gene der GEI4417/4436 sehr stark an (siehe Tab. 20). Im Vergleich von MM-Glukose und MI-Medium ist die größte Änderung der Aktivität beim *ioID2::lux*-Reporter mit dem Faktor ~16.000 zu beobachten. Die Steigerung der Transkriptionsaktivität aller Gene kann dabei direkt auf die Bindung von IoIR bzw. von ReiD, wie im Fall von $P_{IoIE/ioIG1/srfj/ioI1}$, zurückgeführt werden. Nur für die Transkription von *STM4428* und *ioI2/ioIH* war ein direkter Nachweis nicht möglich. So führt die Deletion von *ioIR* zwar zur starken Expression sowohl von *STM4428*, das für eine putative Permease kodiert, als auch von *ioI2/ioIH*, eine Bindung konnte mit GMSA aber weder an $P_{STM4428}$ noch an $P_{ioI2/ioIH}$ nachgewiesen werden. Die Überexpression von ReiD mittels pBR-*reiD* zeigte auch eine starke Antwort des *ioI2/ioIH::lux*-Reporters (siehe Abb. 19), eine Bindung von ReiD an $P_{ioI2/ioIH}$ konnte aber ebenfalls unter den verwendeten Versuchsparametern nicht beobachtet werden (siehe 3.2.7). Eine mögliche Erklärung wäre die Nicht-Existenz der Promotoren $P_{STM4428}$ und $P_{ioI2/ioIH}$, die mit einer transkriptionellen Koppelung der jeweiligen 5'-gelegenen Gene *ioIC2* bzw. *STM4434*, welches für eine zweite putative Permease kodiert, einhergehen müsste. Dies konnte jedoch mittels RT-PCR ausgeschlossen werden (siehe Abb. 9 sowie Kröger and Fuchs (2009)). Widersprüchlich sind hierbei die Ergebnisse bezüglich der Transkription von *STM4428*. So zeigte der Reporter *STM4428::lux* eine starke Induktion sowohl bei der Kultivierung der wildtypischen Zellen in MI-Medium als auch in dem Stamm 14028 Δ *ioIR* in LB-Medium (siehe Tab. 20). Die Daten der RT-

PCR mit RNA von Zellen, die in MI-Medium kultiviert worden waren, wiesen jedoch keine mRNA *STM4428* auf (siehe Abb. 9). In weiterführenden Untersuchungen sollte hier mittels der sensitiveren qRT-PCR die Menge an mRNA *STM4428* bzw. *iolC1/iolC2/STM4428* bestimmt werden.

Die Kultivierung der Zellen in MI-Medium aktiviert die Transkription aller Gene der GEI4417/4436. Dazu gehören auch die Gene, die nicht essentiell für den MI-Metabolismus *in vitro* sind. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Genprodukte *SrfJ*, *IolI1*, *STM4428*, *IolG2*, *STM4434*, *IolI2* und *IolH* unter den entsprechenden ökologischen Bedingungen eine wichtige Rolle in Bezug auf den MI-Metabolismus von *Salmonella* spielen. Zur Aufklärung dieser Funktionen müssten Reporterstudien und weitere Versuche mit Deletionsmutanten in enterischen Infektionsmodellen durchgeführt werden, zumal die Deletion von *srfJ*, *STM4428*, *iolG2*, *STM4434* und *iolI2* zur Attenuation in verschiedenen Tiermodellen geführt hat (siehe Tab. 2). Da es sich der Sequenzvorhersage nach bei *STM4428* und *STM4434* vermutlich um Permeasen handelt, bestünde die Möglichkeit, dass die Zellen Stereoisomere von MI über diese Transporter aufnehmen, wie bereits eingangs in Abb. 5 dargestellt. Diese würden dann möglicherweise mittels *IolI1* und *IolI2* in MI isomerisiert und weiter abgebaut werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten Enzymassays zur Identifizierung der Substrate der Isomerasen etabliert werden. Ebenso wären hier Wachstumsversuche mit Deletionsmutanten in Minimalmedium mit jeweils einem der Inositol-Stereoisomere als alleinige Kohlenstoffquelle zielführend.

Das Ende des Zellwachstums in MI-Medium findet dem Modell nach dann statt, wenn das MI im umgebenden Medium fast vollständig von den Zellen aufgenommen und abgebaut wurde. Daraufhin sinkt die Konzentration an DKP im Zytosol. Dadurch, und unterstützt durch die *ReiD*-bedingte Induktion der *IolR*-Expression, steigt die Anzahl der aktivierten *IolR*-Moleküle in der Zelle, was zur Repression der Gene der GEI4417/4436 führt.

Neben dieser rein durch den Metaboliten MI gesteuerten Regulation scheint es noch eine zweite Möglichkeit der Aktivierung des MI-Metabolismus zu geben, die stärker mit dem Infektionsgeschehen verbunden ist. Hierbei induziert *SsrB* direkt die Transkription der sRNA *rssR*. *RssR* stabilisiert wiederum die mRNA *reiD*, was vermutlich auch zu einer erhöhten Konzentration an *ReiD* führt. Wie die Überexpression von *ReiD* mittels pBR-*reiD* gezeigt hat, reduziert dies die lange lag-Phase *in vitro* in MI-Medium um 50 % und führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate aller essentiellen Gene, außer *iolT1* und *iolD1/iolD2* (siehe Abb. 12 und Abb. 19). Da *SsrB* sowohl im Darmlumen, noch vor der Invasion des Darmepithels, als auch intrazellulär exprimiert wird, stellen

diese beiden Phasen im Infektionsgeschehen mögliche ökologische Nischen dar, bei denen der MI-Metabolismus über diesen zweiten Regulationsweg aktiviert werden kann (Shea *et al.*, 1996, Cirillo *et al.*, 1998, Kuhle & Hensel, 2004, Brown *et al.*, 2005). Es fällt jedoch auf, dass die Überexpression von RssR durch pZE-*rssR* nur zu der Aktivierung der Reporter $P_{reiD}::lux$ und $reiD::lux$ führte. Dem Modell nach müsste allerdings die so erhöhte Menge an ReiD auch zu einer Induktion der ReiD-Zielgene führen, was nicht beobachtet werden konnte. Dagegen angeführt werden kann eine möglicherweise zu geringe Wirkung der sRNA-Überexpression mittels pZE-*rssR* auf die Aktivität der Reporter in LB-Medium, wobei aber eine physiologische Wirkung dieser Überexpression in MI-Medium belegt werden konnte (Abb. 29). Der Vergleich der beiden Reporterstämme $P_{reiD}::lux$ pBR-*reiD* und $P_{reiD}::lux$ pZE-*rssR* in LB-Medium zeigt eine 6,6-fache bzw. 2,7-fache Induktion. Möglicherweise reicht die geringere Induktion durch pZE-*rssR* in LB-Medium nicht aus, um die mRNA *reiD* ausreichend zu stabilisieren. So könnte ReiD nicht in den notwendigen Mengen translatiert werden, um die Zielgene von ReiD zu induzieren. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die auf diesem Weg erhöhte Menge an ReiD nicht ausreicht, um die IolR-vermittelte Repression zu überwinden. Dies ist aber nicht plausibel, da auch die nicht direkt von IolR reprimierten Promotoren, wie P_{iolE} und P_{iolI2} , nicht auf die Überexpression von RssR in LB-Medium reagieren (siehe 3.3.4). Die derzeit wahrscheinlichste Erklärung beruht auf der Tatsache, dass eine erhöhte Transkriptmenge nicht zwangsläufig eine Erhöhung der Translationsrate bzw. Proteinmenge bedeutet. Um diese Vermutung zu untersuchen, sollten Western Blots mit Anti-ReiD-Antikörpern sowie Northern Blots bzw. qRT-PCR zur Messung der mRNA *reiD* etabliert werden. Damit können die Konzentrationen des Transkripts *reiD* und von ReiD in den Stämmen 14028 pZE-*rssR* und 14028 pZE-control sowie 14028 pBR-*reiD* und 14028 pBR322 in LB-Medium und MI-Medium bestimmt werden. Sollte durch die Überexpression von RssR in LB-Medium die Menge der mRNA *reiD* ansteigen, ohne dass sich die Konzentration von ReiD korrespondierend dazu erhöht, wäre das ein deutlicher Hinweis auf einen weiteren Faktor. Damit müsste das Modell um einen zweiten Regulator ergänzt werden, der an der posttranskriptionellen Regulation von ReiD beteiligt ist. Einen interessanten Kandidaten für die darauf folgenden Untersuchungen stellt die sRNA STnc1740 dar. Sie könnte die Translation der mRNA *reiD* reprimieren und so dafür verantwortlich sein, dass trotz der mRNA-stabilisierenden Wirkung von RssR die Zielgene von ReiD unter LB-Kulturbedingungen nicht induziert werden. Zu dieser Vermutung passt, dass die Deletion von *Stnc1740* zu einer verkürzten lag-Phase der Mutante in MI-Medium führt. Dagegen führt die Überexpression mittels pZE-*STnc1740* zu einer verlängerten lag-Phase (siehe 3.3.2). Diese sRNA hat also im Gegensatz zu

RssR einen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten von *S. Typhimurium* 14028 in MI-Medium. Ein weiteres Ergebnis, das diese Annahme stützt, ist der Northern Blot mit RNA von Zellen, die in MM-Glukose oder MI-Medium kultiviert worden waren. Im Vergleich zu MM-Glukose nimmt die Menge an STnc1740 in MI-Medium deutlich sichtbar ab (siehe 3.3.1). Somit könnten neben der o. g. Etablierung von Western Blots und Northern Blots bzw. qRT-PCR auch Reportermessungen zur Prüfung dieser Hypothese eingesetzt werden. Dazu müssten die chromosomalen *lux*-Reporter der ReiD-Zielgene *iolA/iolB*, *iolE/iolG1*, *iolC1/iolC2* und *iolI2/iolH* in den Stämmen 14028, 14028 Δ STnc1740 und 14028 pZE-STnc1740 in LB-Medium untersucht und miteinander verglichen werden. Um die Wirkung der Überexpression von RssR sowie ReiD auf die ReiD-Zielgene besser verstehen und vergleichen zu können, müsste zudem in beiden Fällen das gleiche Plasmid pZE-*luc* zur Überexpression der beiden Faktoren verwendet werden.

Für ein besseres Verständnis der Regulation des MI-Metabolismus insbesondere hinsichtlich der beiden unterschiedlichen Aktivierungswege, sollten Reporterstudien *in vivo* durchgeführt werden. Dabei müsste insbesondere auch auf die Diät des Wirts eingegangen werden, da hier bereits eine Konditionierung der Zellen stattfinden kann (Staub & Fuchs, 2014). In einem ersten Infektionsexperiment könnten daher Salmonellen eingesetzt werden, deren MI-Metabolismus durch die Kultivierung in MI-Medium bereits unmittelbar vor der oralen Infektion aktiviert worden ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen den allgemeinen Zusammenhang zwischen Metabolismus und Virulenz von Pathogenen und zeigen am konkreten Beispiel des MI-Metabolismus, wie die beiden Prinzipien ineinandergreifen können. Dabei stellt der bislang unbekannte und taxonomisch begrenzte Regulator ReiD das entscheidende Schlüsselement dar. ReiD ist essentiell für den MI-Metabolismus und wird sowohl direkt von dem MI-Hauptregulator IolR als auch indirekt von dem SPI-2-Hauptvirulenzregulator SsrB mittels der ebenfalls taxonomisch begrenzten sRNA RssR reguliert.

Veröffentlichungen

Publikationen

Rothhardt, J. E., Kröger, C., Broadley, S. P., Fuchs, T. M. (2014) The orphan regulator ReiD of *Salmonella enterica* is essential for *myo*-inositol utilization. *Molecular Microbiology* 94: 700-712.

Rothhardt, J. E., Kröger, C., Brokatzky, D., Felsl, A., Fuchs, T. M. The small RNA RssR regulates *myo*-inositol degradation by *Salmonella enterica*. *Scientific Reports*. (submitted)

Konferenzbeiträge

Rothhardt, J. E., Broadley, S., Kröger, C., Srikumar, S., Fuchs, T.M. Link between *myo*-inositol metabolism and virulence of *Salmonella* Typhimurium. VAAM, Karlsruhe, Deutschland, 04/2011. Poster Präsentation.

Rothhardt, J. E., Kröger, C., Broadley, S., Fuchs, T.M. Regulation and *in vivo* relevance of *myo*-inositol utilization of *Salmonella* Typhimurium. DFG SPP1316 Meeting, Obergurgl, Österreich, 10/2012. Vortrag.

Rothhardt, J. E., Kröger, C., Broadley, S., Fuchs, T.M. Regulation and *in vivo* relevance of *myo*-inositol utilization of *Salmonella* Typhimurium. 5th congress of European microbiologists (FEMS), Leipzig, Deutschland, 07/2013. Poster-Präsentation.

Rothhardt, J. E., Kröger, C., Broadley, S., Fuchs, T.M. Link between *myo*-inositol metabolism and virulence of *Salmonella* Typhimurium. 2nd Internation Symposium on Metabolism and Bacterial Pathogenesis, Osnabrück, Deutschland, 04/2014. Vortrag.

Anhang

Tab. S1: Liste der verwendeten Primer

| Primernamen | Zielgen | Modifikation | 5' – 3' Sequenz |
|----------------------------------------------------|-------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <u>Herstellung nicht-polarer Deletionsmutanten</u> | | | |
| del_reiD_for | STM4423 (reiD) | | CTTCAGAACGAGAGAATAAGGCTCAGCCCCAGTTGGCGTATGTGAGTCAGGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC |
| del_reiD_rev | | | AATTTTAGCAAGCATTAAATTTCAAATAATAAATAATTAGCTTTACGATACATATGA ATATCCTCCTTA |
| del_iolE/G1_for | STM4424 (iolE/G1) | | CATCGCGGTATGCAGTAAAAGCGTTTCATTAAGTGGGAGCCGAATATGGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC |
| del_iolE/G1_rev | | | AATACGCGGAAGGTTTATTTGTAGAAATCAGGTTTTGAGGTAATTCAACCATATG AATATCCTCCTTA |
| del_STnc1740_for | STnc1740 | | AGCGTATTTACGGCACGGCCCCACCAGGAATACGCAATAAATAATGATGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC |
| del_STnc1740_rev | | | GAGATATTCTCCGCTGGTTACACAACCTTTACTCCCTCCAGCGAGTGCGCCATATG AATATCCTCCTTA |
| del_STnc2160_for | STnc2160 | | CCTGGGAAGAGAACCACGCGTGGATTAACCTACCAGACTACCCGCGATAAGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC |
| del_STnc2160_rev | | | TAAGAGAAGGCGGATAGCGATCTTATGAGCGTGTGTGGCGCAGAGTTGAACATA TGAATATCCTCCTTA |
| del_hfq_for | STM5242 (hfq) | | TTTCAGAATCGAAAGGTTCAAAGTACAATAAGCATATAAGGAAAAGAGAGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC |
| del_hfq_rev | | | AGCGGGGGCGATTATCCGACGCCCCGACATGGATAAACAGCGCGTGAACCATAT GAATATCCTCCTTA |
| <u>Test der kanR-Insertion und Gendeletion</u> | | | |
| test_reiD_for | STM4423 (reiD) | | GGTTGTCTGTTGTGACG |
| test_reiD_rev | | | GAATATCATCATTGCGCCAAC |
| test_iolE/G1_for | STM4424/25 (iolE/G1) | | TCCCACTTCTTCAACCAG |
| test_iolE/G1_rev | | | AACTGCAGGAGTTTTAATACGCGG |
| test_STnc1740_for | STnc1740 | | GGGTGCCGCTAACAGAAAT |
| test_STnc1740_rev | | | GTACTTTGCCAGCCGTC |
| test_STnc2160_for | STnc2160 | | TCGGCAAATAGGGTAAGTC |
| test_STnc2160_rev | | | TGTATGGCGGTCTATAACC |
| test_hfq_for | STM5242 (hfq) | | GGTGCTATCGCAGAC |
| test_hfq_rev | | | TGCTCACCGGCATCA |

| | | | |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| kanR3 | <i>kanR</i> | | GCGCTGCGAATCGGG |
| <u>Konstruktion der pBR322-Komplementationsvektoren</u> | | | |
| com_reiD_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | <i>PstI</i> | GCCTGGTTATCTGCAGCCTAAAACGC |
| com_reiD_rev | | <i>PstI</i> | CCGACAAATAAAAAATGGCTGCAGTATTGCG |
| com_iolR_for | <i>STM4417</i> (<i>iolR</i>) | <i>ScaI</i> | CAGTGTAATACACTAAGAGTACTCCGCCGG |
| com_iolR_rev | | <i>PvuI</i> | CCACAATGCCGACGATCGCTAAATACG |
| test_pBR322_EcoRI | pBR322 | | GAGGATGACGATGAG |
| test_pBR322_PstI | | | GAGTAAGTAGTTCCGCCAG |
| pBR322 PvuI Seq. | | | GGTCCCAACGATCAAGG |
| pBR322 ScaI Seq. | | | GGCGCGGTATTATCCCG |
| <u>Konstruktion der pZE12-luc-Plasmide</u> | | | |
| PLlacoB | <i>pZE-luc</i> | | CGCACTGACCGAATTCATTAA |
| PLlacoD | <i>pZE-luc</i> | | GTGCTCAGTATCTTGTATCCG |
| pZE12luc_seq_for | <i>pZE-luc</i> | | GCACATTTCCCGAAAAGTG |
| pZE12luc_seq_rev | <i>pZE-luc</i> | | CTGTGGATAACCGTATTACC |
| com_STnc1740_for | <i>STnc1740</i> | | p-GCAGAAGAAGACTTACCCTA |
| com_STnc1740_rev | | <i>XbaI</i> | GCGATCTAGAACAGGATATACCCTGTTGAA |
| com_STnc2160_for | <i>STnc2160</i> | | p-CCAGACTACCCGCGATAACA |
| com_STnc2160_rev | | <i>XbaI</i> | GCGATCTAGATAAAAAAGCCAGCCGCAGAG |
| com_nonsense_for | | | p-GCCTTAAGGT |
| com_nonsense_rev | | | CTAGACCTTAAGGC |
| <u>Konstruktion der rekombinanten pET28b-Plasmide</u> | | | |
| com_iolE_for_NcoI | <i>STM4424/25</i> (<i>iolE/G1</i>) | <i>NcoI</i> | AAACCATGGGTGGGAGCCAGCAATATG |
| com_iolG1_rev_XhoI | | <i>XhoI</i> | AAACTCGAGTTATTGTAGAAATCAGGTTTTG |
| pET28b_for | pET28b | | AGGATCGAGATCTCGATC |
| <u>Konstruktion der rekombinanten pBADMyc/HisC-Plasmide</u> | | | |
| 4423_NcoI_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | <i>NcoI</i> | CGGCCATGGCTCGCTTGTGCTTCTGTCC |
| 4423_HindIII_rev | | <i>HindIII</i> | CCCAAGCTTCATATTCAAATAATAAATAATTAGC |
| pBAD_for | pBAD | | ATGCCATAGCATTTTTATCC |
| pBAD_rev | | | TGATTTAATCTGTATCAGGC |
| <u>Konstruktion der rekombinanten pBADHisA-Plasmide</u> | | | |
| HIS5SRBC5 | <i>STM1391</i> (<i>ssrB</i>) | <i>NcoI</i> | CCTAGAACCATGGGACACCACCACCACCACCGCTGAATTAACGCTGACACG (Feng 2004) |
| pu_SsrBc_rev | | <i>KpnI</i> | GGGGTACCCCTTAATACTCTATTAACC |
| hns_SacI_for | <i>STM1751</i> | <i>SacI</i> | GACGAGCTC ATGAGCGAAGCACTTAAA |

| | | | |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------|--------------------------------|
| | (hns) | | |
| hns_EcoRI_rev | | <i>EcoRI</i> | GGAATTCCTTATTCCTTGATCAGGAA |
| pBAD33R1_test | | | CCAGTCTTTCGACTGAGC |
| <u>Klonierung und Überprüfung der pUTs-luxCDABE-Fusionen</u> | | | |
| PioLE_for | <i>STM4424</i> (<i>ioLE</i>) | <i>SacI</i> | GGAGCTCAGGACTATCGTAAAGC |
| PioLE_rev | | <i>KpnI</i> | AGGTACCTTAATGAAACGCTTTACTG |
| imal_for | <i>E. coli K-12</i> <i>b4034-4035</i> | <i>SacI</i> | GGAGCTCAACCTGTCATCGACAGC |
| imal_rev | (<i>malE/K</i>) | <i>SacI</i> | GGAGCTCCCTTGTTGGTGAAGTGC |
| ioLR_for | <i>STM4417</i> (<i>ioLR</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCGTGAAATTCTGAAGC |
| ioLR_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTACTCCGTCGCCAG |
| ioLR_test | | | GTATCATGCATGTCTAAACA |
| ioLT1_for | <i>STM4418</i> (<i>ioLT1</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCTGGCGCAATGATTATGG |
| ioLT1_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTAATCAGAATAACGTTCCGG |
| ioLT1_test | | | CTACCTATGTCCACATCAG |
| ioLT2_for | <i>STM4419</i> (<i>ioLT2</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCCCATCGGCTCAATTG |
| ioLT2_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTCAGGCTATTACATCG |
| ioLT2_test | | | GGATTATGTCTCAGAGAAG |
| ioLB_for | <i>STM4420</i> (<i>ioLB/rssR</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCTGGCCGTATGCAGCG |
| ioLB_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTATCGCGGGTAGTC |
| ioLB_test | | | TCGGCAAATAGGGTAAGTC |
| PreiD_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCCTGGGTGACCTGACG |
| PreiD_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCGCATGATTTACCCTCC |
| reiD_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | <i>SacI</i> | GTGGAAAACTGATGAGCTCCGTG |
| reiD_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCCAAATAATAAATAATTAGC |
| P/reiD_test | | | TCGTCCCGATGCTTTTCC |
| PioLE_for | <i>STM4424</i> (<i>ioLE</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCGAATTTAAACGCCGC |
| PioLE_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCCCACTTAATGAAACGC |
| PioLE_test | | | TCGTCCCGATGCTTTTCC |
| ioIG1_for | <i>STM4425</i> (<i>ioIG1</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCCTATGAAACATTGATTC |
| ioIG1_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCGTAGAAATCAGGTTTTG |
| ioIG1_test | | | AGAAAATGACTTTAAAAGCAG |

| | | | |
|--------------|------------------------------------|-------------|--------------------------------|
| ioll1_for | <i>STM4427</i> (<i>ioll1</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCATTTTCCGCCAGGGGAAA |
| ioll1_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTAAGCTGTTAAGAAGGG |
| ioll1_test | | | CAGGAGTCGATCTGAATG |
| STM4428_for | <i>STM4428</i> | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCTCCAGGGCATTGGTTTTGCC |
| STM4428_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTAATGTTGCCGCAGC |
| STM4428_test | | | GACGATTCCATGCCAGC |
| iolC2_for | <i>STM4429</i> (<i>iolC2</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCATCCACTCGATGCAGAG |
| iolC2_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTAACGTGCCGGGCG |
| iolC2_test | | | TCGCAAGCAACTGGTGG |
| iolD2_for | <i>STM4432</i> (<i>iolD2</i>) | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCGGGCCAACTGGCGCAGC |
| iolD2_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTCAGTACTGCCGGGCCTG |
| iolD2_test | | | CAATATATGGCGGAAGTTG |
| STM4434_for | <i>STM4434</i> | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCGGCAATACGCTGATTG |
| STM4434_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTATTATCCTCGGTATAG |
| STM4434_test | | | CCGAGGATAATAAAATGAAAG |
| iolH_for | <i>iolH</i> | <i>SacI</i> | GCAGAGCTCAATTGCTGCCGATCGTGGGA |
| iolH_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCTTAACGTCCGAGTAGCTC |
| iolH_test | | | GGTATTTACAATGAAAATTGC |
| sseA_for | <i>sseA</i> | <i>SacI</i> | GACGAGCTCGTAGTACGTGAGGTTTG |
| sseA_rev | | <i>KpnI</i> | CGGGGTACCCCGTTACCTTTTTGTTTTCTG |
| sseA_test | | | GATCCGCAGCAATATCAG |
| pUTs_for | <i>pUTs</i> | | GCAATTTTGAGTGACACAGG |
| luxC_rev | <i>luxC</i> | | ACAACATCATAAAGGCCG |

Klonierung und Überprüfung der pDEW201-Reporterplasmide

| | | | |
|-----------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------------|
| PsrfJ_EcoRI_for | <i>STM4426</i> (<i>srfJ</i>) | <i>EcoRI</i> | CCGGAATTCTCTTCGATCGTCTGAACGC |
| PsrfJ_KpnI_rev | | <i>KpnI</i> | GCCGGTACCAGGGAAGTCCGGATAAAAG |
| PsseA_EcoRI_for | <i>STM1397</i> (<i>sseA</i>) | <i>EcoRI</i> | CCGGAATTCACGGCAAGTTACAGGATCC |
| PsseA_KpnI_rev | | <i>KpnI</i> | GCCGGTACCTCCCCTCCATATACACGATAG |
| pDEW201_rev | <i>pDEW201</i> | | CTGGCCGTTAATAATGAATG |

Konstruktion der PCR-Fragmente für die GMSAs

| | | | |
|---------------|-----------------------------------|--|--------------------------|
| GMS_PargS_for | <i>STM1909</i> (<i>argS</i>) | | CAACCTTGATTTGATTGG |
| GMS_PargS_rev | | | AAGAGCCTGAATATTCAC |
| GMS_PreiD_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | | GGAATTCTGAAAGTTTGACGGCTG |

| | | |
|---------------|------------------------------------|---------------------------------|
| GMS_PreiD_rev | | GGGATCCCATACGCCAACTGGGGCTGA |
| GMS_PioIE_for | <i>STM4424</i> (<i>ioIE</i>) | CAATATCGCAAGGACTATC |
| GMS_PioIE_rev | | GCTCCCACTTAATGAAAC |
| PSTnc2160_for | <i>STnc2160</i> (<i>rssR</i>) | GCAgagctcTGGCCGTATGCAGCG |
| PSTnc2160_rev | | CGGggtaccTTATCGCGGTAGTC |
| PsseA_for | <i>STM1397</i> (<i>sseA</i>) | CGATGAGCTCACGGCAAGTTACAGGATCC |
| PsseA_rev | | GCCGGTACCTCCCCTCCATATACACGATAG |
| PsrfJ_for | <i>STM4426</i> (<i>srfJ</i>) | GCAgagctcGGTGACCACTCTGCG |
| PsrfJ_rev | | CGGggtaccCATAGGGAAGTTCCGG |
| 5'-P4417 | <i>STM4417</i> (<i>ioIR</i>) | GGAATTCACGAAAAGAGCCAGTTCG |
| 3'-P4417 | | GGAATTCTTCTCGTCACAACAG |
| 5'-P4418 | <i>STM4418</i> (<i>ioIT1</i>) | CGAATTCATCAATAAAATCAAGTAACTTC |
| 3'-P4418 | | CGGATCCATGTGGACATAGGTAGATTA |
| 5'-P4419 | <i>STM4419</i> (<i>ioIT2</i>) | CGAATTCAACTTATGTTTTGTTATGGGTATC |
| 3'-P4419 | | CGGATCCTCTGAGACATAATCCCTCCC |
| 5'-P4421 | <i>STM4420</i> (<i>ioIA</i>) | GGAATTCCTCCTCGTCACAACAG |
| 3'-P4421 | | CGGATCCCGACTGTTTCCATCTC |
| 5'-P4430 | <i>STM4430</i> (<i>ioIC1</i>) | GGAATTCCTCATTATGGGAAGG |
| 3'-P4430 | | CGGATCCATTGACATATCC |
| 5'-P4431 | <i>STM4431</i> (<i>ioID1</i>) | GGAATCCAAGATCACAGAAATGGC |
| 3'-P4431 | | CGGATCCTTTTCATGTACCCACC |
| 5'-P4435 | <i>STM4435</i> (<i>ioII2</i>) | GGAATTCATTCGTTGGGCCAGCG |
| 3'-P4435 | | CGGATCCCGATATTCATTATTTTCTCC |
| BS_HNS_1_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | ATCGCAAGGACTATCGTAAAGC |
| BS_HNS_1_rev | | AAAACCGGTGAGCGCGGCATC |
| BS_HNS_2_for | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | GCCGCGCTCACCGGTTTTTCC |
| BS_HNS_2_rev | | AAGCTGCCATTCGCTGTGCG |
| BS_HNS_3_for | <i>STM4424</i> (<i>ioIE</i>) | GACTCATGGAGAATACCGATC |

| | | |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|
| BS_HNS_3_rev | | TCGATCGCATACTTATCCAG |
| BS_HNS_4_for | <i>STM4424</i> (<i>iolE</i>) | GCTCGTAAACAGACCGTGAG |
| BS_HNS_4_rev | | TCCTGATAATTTTTATACCC |
| BS_HNS_5_for | <i>STM4424</i> (<i>iolE</i>) | AGTTTTCAACAGCCAGCACTGC |
| BS_HNS_5_rev | | TCTCAATACAGCCGCCAAC |
| BS_HNS_6_for | <i>STM4432</i> - <i>STM4433</i> | TTTGTGCCAATGACGCCGCTG |
| BS_HNS_6_rev | | CGCATTAAATTGTGACAATTC |
| BS_HNS_7_for | <i>STM4434</i> | GTCTATCCCTTTAACCAACTG |
| BS_HNS_7_rev | | GAAGGTATCCAGCAAACC |
| BS_HNS_8_for | <i>STM4435</i> (<i>iolI2</i>) | TCGCGCATTGATATTTCTGC |
| BS_HNS_8_rev | | TATCAACGGCAATCTCAATC |
| BS_HNS_9_for | <i>STM4435</i> - <i>STM4436</i> | CTGTATGCGAAACTCCACGC |
| BS_HNS_9_rev | | CCCTGACGAATGGTGGGCAC |
| <u>5'-RACE</u> | | |
| reiD-GSPI | | CTGTGCGCAATAAGACATTTT |
| reiD-GSPII | | CCTGGGTCAATAGCTGC |
| reiD-GSPIII | | GCATAATGGTGATACAGTGG |
| dT-AP | | GTCGACTCTAGAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTT |
| AP | | GTCGACTCTAGAGGATCC |
| AAP | | GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG |
| AUAP | | GGCCACGCGTCTGACTAGTAC |
| <u>qRT-PCR</u> | | |
| qRT_16S_for | | GTCTGTCAAGTCGGATGTG |
| qRT_16S_rev | | AGATCTCTACGCATTTACC |
| qRT_reiD_for | | GATGATATTGTCCGGTTAT |
| qRT_reiD_rev | | ACTACCTGGGTCAATAGCTG |
| qRT_iolT2_for | | ATCTACAGTGGATTAACGGC |
| qRT_iolT2_rev | | ACCAACAGAATATAGCGGAG |
| <u>Northern Blot</u> | | |
| RP_STnc2160_for | | CCAGACTACCCGCGATAAC |
| RP_STnc2160_rev | | GAATTAATACGACTCACTATAGCCAGCCGAGAGGACG |
| RP_STnc1740_for | | GAAGACTTACCCTATTTGCCG |
| RP_STnc1740_rev | | GAATTAATACGACTCACTATAGCACAGGATATACCCTGTTG |
| RP_5S_for | | GCGGCACTAGCGGGTGGTC |

| | | |
|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| RP_5S_rev | | GAATTAATACGACTCACTATAGCATGGGGAGACCCCACT |
| <u>Nachweis von Genen</u> | | |
| Seq 5'4417 | <i>STM4417</i> (<i>iolR</i>) | GTATCATGCATGTCTAAACA |
| Seq 3'4417 | | GCTTGTTTTTTTACTCCGTC |
| Seq 5'4423 | <i>STM4423</i> (<i>reiD</i>) | GGGTAAATCATGCGCTTG |
| Seq 3'4423 | | ATTTTAGCAAGCATTAAATTC |
| Seq 5'4424 | <i>STM4424</i> (<i>iolE</i>) | GTTTCATTAAGTGGGAGCC |
| Seq 3'4424 | | CTGTTTCCTTTTCAATTAAG |
| Seq 5'4425 | <i>STM4425</i> (<i>iolG1</i>) | AGAAAATGACTTTAAAAGCAG |
| Seq 3'4425 | | TACGCGGAAGGTTTATTG |
| Seq 5'4426 | <i>STM4426</i> (<i>srfJ</i>) | GGAACTCCCTATGAAAGG |
| Seq 3'4426 | | CTTCATCATTGATCGAC |

Tab. S2: Liste der untersuchten *Salmonella*-Stämme hinsichtlich eines MI-Metabolismus. Herkunft: Weihenstephaner Mikroorganismensammlung (WMS), Robert-Koch-Institut, Wernigerode (RKI); ID (Identifikationsnummer der jeweiligen Sammlung); W (Wachstum), B (bistabiler Phänotyp), BP (Braunes Pigment). Sofern kein „ja“ angegeben ist, konnte das entsprechende Merkmal nicht nachgewiesen werden.

| Nr. | Subspezies | Serotyp | Herkunft | ID | Inkubation für 96 h auf MI- | | | Gen vorhanden | | | | |
|-----|-----------------|--------------------------------|-----------------------|-----|--------------------------------|----|----|---------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | | | | | Agar | W | B | BP | <i>iolR</i> | <i>reiD</i> | <i>iolE</i> | <i>iolG1</i> |
| | | <i>S. Typhimurium</i> 14028 | Positiv- kontrolle | | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| | | <i>E. coli</i> DH5alpha | Negativ- kontrolle | | | | | | | | | |
| 1 | <i>enterica</i> | Amersfoort | WMS | 343 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 2 | <i>enterica</i> | Kisii | WMS | 344 | | | | | | | | |
| 3 | <i>enterica</i> | Livingstone | WMS | 345 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 4 | <i>enterica</i> | Potsdam | WMS | 346 | ja | | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 5 | <i>enterica</i> | Westhampton | WMS | 347 | | | | | | | | |
| 6 | <i>enterica</i> | Worthington | WMS | 348 | ja | ja | ja | ja | | ja | ja | ja |
| 7 | <i>enterica</i> | Solt | WMS | 349 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |

| | | | | | | | | | | |
|----|-----------------|---------------------------|-----|------------------------|----|----|----|----|----|----|
| 8 | <i>enterica</i> | Livingstone | WMS | 350 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 9 | <i>enterica</i> | Livingstone | WMS | 351 | | | | | | |
| 10 | <i>arizonae</i> | | WMS | 438 | | | | | | |
| 11 | <i>enterica</i> | | WMS | 1942; DSMZ 554 | | | | ja | ja | ja |
| 12 | <i>arizonae</i> | | WMS | 1948; DSMZ 9386 | | | | | | |
| 13 | <i>enterica</i> | Typhimurium | WMS | 2986 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 14 | <i>enterica</i> | Tennessee | WMS | 2987 | ja | ja | ja | ja | | |
| 15 | <i>enterica</i> | Typhimurium | WMS | 2988 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 16 | <i>enterica</i> | Newport | WMS | 2989 | | | | | | |
| 17 | <i>enterica</i> | Infantis | WMS | 2990 | ja | ja | ja | ja | ja | |
| 18 | <i>enterica</i> | Typhimurium | WMS | 2991; DSMZ 5569 | ja | | ja | ja | ja | ja |
| 19 | <i>enterica</i> | Enteritidis | WMS | 2992; DSMZ 9898 | | | | | | |
| 21 | <i>enterica</i> | Derby | WMS | 2994 | ja | ja | | ja | ja | ja |
| 22 | <i>enterica</i> | Goldcoast | WMS | 2995 | ja | ja | ja | ja | ja | |
| 24 | <i>enterica</i> | Typhimurium Zoosaloral | WMS | 2997 | | | | ja | ja | ja |
| 25 | <i>enterica</i> | Mbandaka | WMS | 2998 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 26 | <i>enterica</i> | Bredeney | WMS | 2999 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 27 | <i>enterica</i> | Anatum | WMS | 3000 | | | | | | |
| 28 | <i>enterica</i> | Pomona | WMS | 3001 | | | | | | |
| 29 | <i>enterica</i> | Schleissheim | WMS | 3002 | | | | | | |
| 30 | <i>enterica</i> | Poona | WMS | 3003 | | | | | | |
| 31 | <i>enterica</i> | Diarizonae | WMS | 3546; DSMZ 14847 | | | | | | |
| 32 | <i>enterica</i> | Indica | WMS | 3547; DSMZ 14848 | | | | | | |
| 33 | <i>enterica</i> | (FTIR 0,28) | WMS | 4635 | | | | | | |
| 34 | <i>enterica</i> | (FTIR 0,47) | WMS | 4721 | | | | | | |
| 40 | <i>enterica</i> | Enteritidis | WMS | 4913 | ja | ja | ja | | | |
| 41 | <i>houtenae</i> | 44:z4,z23:- | RKI | 00-06759 | | | | | | |
| 42 | <i>enterica</i> | Heidelberg | RKI | 00-06766 | | | | | | |
| 43 | <i>enterica</i> | Enteritidis | RKI | 01-10318 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|----|-------------------|------------------|-----|----------|----|----|----|----|----|----|
| 44 | <i>enterica</i> | Bovismorbificans | RKI | 03-00222 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 45 | <i>enterica</i> | Pomona | RKI | 03-00230 | | | | | | |
| 46 | <i>enterica</i> | serologisch rauh | RKI | 04-00224 | | | | | | |
| 47 | <i>enterica</i> | Kottbus | RKI | 04-00225 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 48 | <i>enterica</i> | Typhimurium | RKI | 04-00229 | | | ja | ja | ja | ja |
| 49 | <i>diarizonae</i> | 65:z10:e,n,x,z15 | RKI | 04-00235 | | | | | | |
| 50 | <i>enterica</i> | Haifa | RKI | 04-00238 | | | ja | ja | ja | ja |
| 51 | <i>salamae</i> | 13,23:z:1,5 | RKI | 04-00240 | ja | | | | | |
| 52 | <i>enterica</i> | Gaminara | RKI | 04-00259 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 53 | <i>enterica</i> | Johannesburg | RKI | 04-00260 | | | | | | |
| 54 | <i>enterica</i> | Typhimurium | RKI | 04-00287 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 55 | <i>houtenae</i> | 48:g,z51:- | RKI | 04-04455 | | | | | | |
| 56 | <i>enterica</i> | Havana | RKI | 04-04472 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 57 | <i>enterica</i> | Chailey | RKI | 05-02124 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 58 | <i>diarizonae</i> | 60:r:z35 | RKI | 05-02126 | | | | | | |
| 59 | <i>diarizonae</i> | 65:z10:e,n,x,z15 | RKI | 05-02127 | | | | | | |
| 60 | <i>enterica</i> | Salford | RKI | 05-02129 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 61 | <i>salamae</i> | 13,23:z:1,5 | RKI | 05-02148 | ja | | | | | |
| 62 | <i>diarizonae</i> | 50:r:z | RKI | 05-02153 | | | | | | |
| 63 | <i>diarizonae</i> | 48:k:z53 | RKI | 06-02251 | | | | | | |
| 64 | <i>enterica</i> | Infantis | RKI | 06-02283 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 65 | <i>enterica</i> | Virchow | RKI | 06-02285 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 66 | <i>diarizonae</i> | 48:l,v:1,5,7 | RKI | 06-02302 | ja | ja | | | | |
| 67 | <i>enterica</i> | Newport | RKI | 06-02321 | | | | | | |
| 68 | <i>enterica</i> | Uganda | RKI | 06-07317 | | | | | | |
| 69 | <i>arizonae</i> | serologisch rauh | RKI | 07-06065 | | | | | | |
| 70 | <i>arizonae</i> | 41:z4,z23:- | RKI | 07-06070 | | | | | | |
| 71 | <i>houtenae</i> | serologisch rauh | RKI | 08-03889 | | | | | | |
| 72 | <i>enterica</i> | Ruiru | RKI | 08-03906 | | | | | | |
| 73 | <i>arizonae</i> | 41:z4,z23:- | RKI | 09-00808 | | | | | | |
| 74 | <i>arizonae</i> | 44:z4,z24:- | RKI | 09-00812 | | | | | | |
| 75 | <i>enterica</i> | Cubana | RKI | 09-00832 | | | | | | |
| 76 | <i>enterica</i> | serologisch rauh | RKI | 09-04308 | | | | | | |
| 77 | <i>enterica</i> | Weltevreden | RKI | 09-04322 | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 78 | <i>enterica</i> | Typhimurium | RKI | 09-04323 | | | ja | ja | ja | ja |
| 79 | <i>salamae</i> | 9:l,w:e,n,x | RKI | 97-13589 | | | | | | |
| 80 | <i>salamae</i> | 9:l,w:e,n,x | RKI | 97-13590 | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|-------------------|------------------|-----|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 81 | <i>enterica</i> | Newport | RKI | 98-08252 | | | | | | | | |
| 82 | <i>houtenae</i> | 44:z4,z32:- | RKI | 99-00210 | | | | | | | | |
| 83 | <i>diarizonae</i> | 61:r:z53 | RKI | 99-00211 | | | | | | | | |
| 84 | <i>houtenae</i> | serologisch rauh | RKI | 99-00214 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 85 | <i>enterica</i> | Senftenberg | RKI | 11-00563 | | | | | | | | |
| 86 | <i>enterica</i> | Typhimurium | RKI | 09-06028 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 87 | <i>enterica</i> | Infantis | RKI | 09-06027 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 88 | <i>enterica</i> | Orion | RKI | 09-06026-1 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 89 | <i>enterica</i> | Apapa | RKI | 05-05568 | | | | | | | | |
| 90 | <i>enterica</i> | Braenderup | RKI | 04-02294 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 91 | <i>enterica</i> | Montevideo | RKI | 11-04036 | | | | | | | | |
| 92 | <i>enterica</i> | Kentucky | RKI | 11-01124 | | | | | | | | |
| 93 | <i>enterica</i> | Typhimurium | RKI | 10-06449 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 94 | <i>enterica</i> | Anecho | RKI | 10-03132 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 95 | <i>enterica</i> | Infantis | RKI | 10-03131 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 96 | <i>enterica</i> | Blockley | RKI | 10-02610 | | | | ja | ja | ja | ja | ja |
| 97 | <i>enterica</i> | Monschau | RKI | 10-02595 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 98 | <i>enterica</i> | Panama | RKI | 08-07347 | | | | | | | | |
| 99 | <i>enterica</i> | Tennessee | RKI | 05-07663 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 100 | <i>enterica</i> | Enteritidis | RKI | 05-03343 | | | | | | | | |
| 101 | <i>enterica</i> | Infantis | RKI | 04-03316 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 102 | <i>enterica</i> | Takoradi | RKI | 08-04505 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 103 | <i>enterica</i> | Chester | RKI | 08-04503 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |
| 104 | <i>enterica</i> | Teshie | RKI | 08-04502 | | | | | | | | |
| 105 | <i>enterica</i> | Kaneshie | RKI | 08-04501 | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja | ja |

Literaturverzeichnis

- Abe, H., I. Tatsuno, T. Tobe, A. Okutani & C. Sasakawa (2002) Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 3500-3509.
- Abu Kwaik, Y. & D. Bumann (2013) Microbial quest for food *in vivo*: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. *Cell Microbiol* **15**: 882-890.
- Abu Kwaik, Y. & D. Bumann (2015) Host delivery of favorite meals for intracellular pathogens. *PLoS Pathog* **11**: e1004866.
- Aldea, M., E. Herrero & F.J. Trueba (1982) Constancy of diameter through the cell cycle of *Salmonella typhimurium* LT2. *Curr Microbiol* **7**: 165-168.
- Ali, S.S., J. Soo, C. Rao, A.S. Leung, D.H. Ngai, A.W. Ensminger & W.W. Navarre (2014) Silencing by H-NS potentiated the evolution of *Salmonella*. *PLoS Pathog* **10**: e1004500.
- Allen, A. & G. Flemstrom (2005) Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: 1-19.
- Altier, C. (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43**: 85-92.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Anderson, W.A. & B. Magasanik (1971a) The pathway of *myo*-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Conversion of 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid to glycolytic intermediates. *J Biol Chem* **246**: 5662-5675.
- Anderson, W.A. & B. Magasanik (1971b) The pathway of *myo*-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Identification of the intermediate 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid. *J Biol Chem* **246**: 5653-5661.
- Avraham, R., N. Haseley, D. Brown, C. Penaranda, H.B. Jijon, J.J. Trombetta, R. Satija, A.K. Shalek, R. Xavier, A. Regev & D.T. Hung (2015) Pathogen cell-to-cell variability drives heterogeneity in host immune responses. *Cell* **162**: 1309-1321.
- Babitzke, P. & T. Romeo (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 156-163.
- Bajaj, V., R.L. Lucas, C. Hwang & C.A. Lee (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**: 703-714.
- Bakowski, M.A., J.T. Cirulis, N.F. Brown, B.B. Finlay & J.H. Brumell (2007) SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol* **9**: 2839-2855.

- Barlag, B. & M. Hensel (2015) The giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. *Molecules* **20**: 1134-1150.
- Bäumler, A.J. (1997) The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* **5**: 318-322.
- Bäumler, A.J., T.L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch & F. Heffron (1998a) IronN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **180**: 1446-1453.
- Bäumler, A.J., R.M. Tsolis, T.A. Ficht & L.G. Adams (1998b) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **66**: 4579-4587.
- Becker, D., M. Selbach, C. Rollenhagen, M. Ballmaier, T.F. Meyer, M. Mann & D. Bumann (2006) Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* **440**: 303-307.
- Berman, T. & B. Magasanik (1966) The pathway of *myo*-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Ring scission. *J Biol Chem* **241**: 807-813.
- Bertin, P., N. Benhabiles, E. Krin, C. Laurent-Winter, C. Tendeng, E. Turlin, A. Thomas, A. Danchin & R. Brasseur (1999) The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **31**: 319-329.
- Beumer, R.R., J. de Vries & F.M. Rombouts (1992) *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int J Food Microbiol* **15**: 153-163.
- Beuzon, C.R., S. Meresse, K.E. Unsworth, J. Ruiz-Albert, S. Garvis, S.R. Waterman, T.A. Ryder, E. Boucrot & D.W. Holden (2000) *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* **19**: 3235-3249.
- Beuzon, C.R., S.P. Salcedo & D.W. Holden (2002) Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology* **148**: 2705-2715.
- Bhakdi, S., H. Hahn & K. Miksits (2009) Pathogenität und Virulenz. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. H. Hahn, S.H.E. Kaufmann, T.F. Schulz & S. Suerbaum (eds). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 11-12.
- Black, R.E., M.M. Levine, M.L. Clements, T.P. Hughes & M.J. Blaser (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* **157**: 472-479.
- Blaser, M.J. & L.S. Newman (1982) A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis* **4**: 1096-1106.
- Böhme, K., R. Steinmann, J. Kortmann, S. Seekircher, A.K. Heroven, E. Berger, F. Pisano, T. Thiermann, H. Wolf-Watz, F. Narberhaus & P. Dersch (2012) Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* **8**: e1002518.
- Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa & S. Falkow (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.

- Boutte, C.C., B.S. Srinivasan, J.A. Flannick, A.F. Novak, A.T. Martens, S. Batzoglou, P.H. Viollier & S. Crosson (2008) Genetic and computational identification of a conserved bacterial metabolic module. *PLoS Genet* **4**: e1000310.
- Braddock, M., A. Quinn & J. Canvin (2004) Therapeutic potential of targeting IL-1 and IL-18 in inflammation. *Expert Opin Biol Ther* **4**: 847-860.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe & B. Swaminathan (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* **38**: 2465-2467.
- Broadley, S.P. (2011) Positive Regulation des *myo*-Inositol-Abbaus durch *Salmonella enterica*. Masterarbeit, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan.
- Brouns, S.J., M.M. Jore, M. Lundgren, E.R. Westra, R.J. Slijkhuis, A.P. Snijders, M.J. Dickman, K.S. Makarova, E.V. Koonin & J. van der Oost (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**: 960-964.
- Brown, N.F., B.A. Vallance, B.K. Coombes, Y. Valdez, B.A. Coburn & B.B. Finlay (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**: e32.
- Buchmeier, N.A. & F. Heffron (1989) Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* **57**: 1-7.
- Caldelari, I., Y. Chao, P. Romby & J. Vogel (2013) RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**: a010298.
- Callewaert, L., A. Aertsen, D. Deckers, K.G. Vanoirbeek, L. Vanderkelen, J.M. Van Herreweghe, B. Masschalck, D. Nakimbugwe, J. Robben & C.W. Michiels (2008) A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog* **4**: e1000019.
- Carnell, S.C., A. Bowen, E. Morgan, D.J. Maskell, T.S. Wallis & M.P. Stevens (2007) Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **153**: 1940-1952.
- Catron, D.M., M.D. Sylvester, Y. Lange, M. Kadekoppala, B.D. Jones, D.M. Monack, S. Falkow & K. Haldar (2002) The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol* **4**: 315-328.
- CDC (2011) National *Salmonella* Surveillance Overview. US Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia.
- Chao, Y., K. Papenfort, R. Reinhardt, C.M. Sharma & J. Vogel (2012) An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *EMBO J* **31**: 4005-4019.

- Chaudhuri, R.R., E. Morgan, S.E. Peters, S.J. Pleasance, D.L. Hudson, H.M. Davies, J. Wang, P.M. van Diemen, A.M. Buckley, A.J. Bowen, G.D. Pullinger, D.J. Turner, G.C. Langridge, A.K. Turner, J. Parkhill, I.G. Charles, D.J. Maskell & M.P. Stevens (2013) Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS Genet* **9**: e1003456.
- Chaudhuri, R.R., S.E. Peters, S.J. Pleasance, H. Northen, C. Willers, G.K. Paterson, D.B. Cone, A.G. Allen, P.J. Owen, G. Shalom, D.J. Stekel, I.G. Charles & D.J. Maskell (2009) Comprehensive identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes required for infection of BALB/c mice. *PLoS Pathog* **5**: e1000529.
- Cirillo, D.M., R.H. Valdivia, D.M. Monack & S. Falkow (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**: 175-188.
- Clark, M.A., M.A. Jepson, N.L. Simmons & B.H. Hirst (1994) Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* **145**: 543-552.
- Clermont, O., M. Lescat, C.L. O'Brien, D.M. Gordon, O. Tenaillon & E. Denamur (2008) Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol* **10**: 1000-1006.
- Conner, C.P., D.M. Heithoff, S.M. Julio, R.L. Sinsheimer & M.J. Mahan (1998) Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. *PNAS* **95**: 4641-4645.
- Coombes, B.K., N.F. Brown, Y. Valdez, J.H. Brumell & B.B. Finlay (2004) Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* **279**: 49804-49815.
- Coombes, B.K., M.E. Wickham, M.J. Lowden, N.F. Brown & B.B. Finlay (2005) Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *PNAS* **102**: 17460-17465.
- Corazziari, E.S. (2009) Intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **48 Suppl 2**: S54-55.
- Cordero-Alba, M., J. Bernal-Bayard & F. Ramos-Morales (2012) SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. *J Bacteriol* **194**: 4226-4236.
- Cotter, P.A. & V.J. DiRita (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* **54**: 519-565.
- Crouch, M.L., M. Castor, J.E. Karlinsey, T. Kalthorn & F.C. Fang (2008) Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **67**: 971-983.
- Dame, R.T., M.S. Luijsterburg, E. Krin, P.N. Bertin, R. Wagner & G.J. Wuite (2005) DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol* **187**: 1845-1848.

- Dame, R.T., M.C. Noom & G.J. Wuite (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**: 387-390.
- Datsenko, K.A. & B.L. Wanner (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* **97**: 6640-6645.
- de Jong, H.K., C.M. Parry, T. van der Poll & W.J. Wiersinga (2012) Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog* **8**: e1002933.
- de Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski & S. Subramani (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**: 725-737.
- Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan & M. Hensel (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**: 1759-1773.
- Desai, P.T., S. Porwollik, F. Long, P. Cheng, A. Wollam, V. Bhonagiri-Palsikar, K. Hallsworth-Pepin, S.W. Clifton, G.M. Weinstock & M. McClelland (2013) Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *MBio* **4**.
- Dorman, C.J. (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**: 391-400.
- Dorman, C.J. (2007) Probing bacterial nucleoid structure with optical tweezers. *Bioessays* **29**: 212-216.
- Dorman, C.J., J.C. Hinton & A. Free (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* **7**: 124-128.
- Dunwell, J.M., A. Purvis & S. Khuri (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* **65**: 7-17.
- Egan, S.M. (2002) Growing repertoire of AraC/XylS activators. *J Bacteriol* **184**: 5529-5532.
- Eisenreich, W., T. Dandekar, J. Heesemann & W. Goebel (2010) Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Micro* **8**: 401-412.
- Eisenreich, W., J. Heesemann, T. Rudel & W. Goebel (2015) Metabolic adaptations of intracellular bacterial pathogens and their mammalian host cells during infection ("pathometabolism"). *Microbiol Spectr* **3**.
- Ellermeier, J.R. & J.M. Slauch (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**: 24-29.
- Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen & J.C. Hinton (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103-118.
- Esselborn, J. (2011) Die Rolle von SsrB und SrfJ bei der Verwertung von *myo*-Inositol durch *Salmonella enterica*. Masterarbeit, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan.

- Faber, F., L. Tran, M.X. Byndloss, C.A. Lopez, E.M. Velazquez, T. Kerrinnes, S.-P. Nuccio, T. Wangdi, O. Fiehn, R.M. Tsohis & A.J. Bäumlner (2016) Host-mediated sugar oxidation promotes post-antibiotic pathogen expansion. *Nature* **534**: 697-699.
- Fani, R. & M. Fondi (2009) Origin and evolution of metabolic pathways. *Phys Life Rev* **6**: 23-52.
- Feng, X., R. Oropeza & L.J. Kenney (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**: 1131-1143.
- Feng, X., D. Walthers, R. Oropeza & L.J. Kenney (2004) The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **54**: 823-835.
- Figueira, R. & D.W. Holden (2012) Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* **158**: 1147-1161.
- Frank, C. (2016) Bundesinstitut für Risikobewertung, 4. Symposium "Zoonosen und Lebensmittelsicherheit", Berlin.
- Fry, J., M. Wood & P.S. Poole (2001) Investigation of *myo*-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its effect on nodulation competitiveness. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 1016-1025.
- Fuchs, T.M., W. Eisenreich, J. Heesemann & W. Goebel (2012) Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 435-462.
- Galan, J.E. (1996) Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* **20**: 263-271.
- Galbraith, M.P., S.F. Feng, J. Borneman, E.W. Triplett, F.J. de Bruijn & S. Rossbach (1998) A functional *myo*-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* **144** (Pt 10): 2915-2924.
- Gallegos, M.T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann & J.L. Ramos (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 393-410.
- Garcia-del Portillo, F., M.B. Zwick, K.Y. Leung & B.B. Finlay (1993) *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *PNAS* **90**: 10544-10548.
- Garmendia, J., C.R. Beuzon, J. Ruiz-Albert & D.W. Holden (2003) The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* **149**: 2385-2396.
- Geissmann, T.A. & D. Touati (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**: 396-405.
- Georg, J. & W.R. Hess (2011) cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 286-300.
- Gerke, J. (2015) Phytate (inositol hexakisphosphate) in soil and phosphate acquisition from inositol phosphates by higher plants. A review. *Plants (Basel)* **4**: 253-266.

- Gerlach, R.G., N. Claudio, M. Rohde, D. Jackel, C. Wagner & M. Hensel (2008) Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* **10**: 2364-2376.
- Giammanco, G.M., S. Pignato, C. Mammina, F. Grimont, P.A. Grimont, A. Nastasi & G. Giammanco (2002) Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48:z(35):--in Southern Italy: molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. *J Clin Microbiol* **40**: 3502-3505.
- Gladstone, G.P., P. Fildes & G.M. Richardson (1935) Carbon dioxide as an essential factor in the growth of bacteria. *Br J Exp Pathol* **16**: 335-348.
- Golubeva, Y.A., A.Y. Sadik, J.R. Ellermeier & J.M. Slauch (2012) Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics* **190**: 79-90.
- Gordon, B.R., Y. Li, A. Cote, M.T. Weirauch, P. Ding, T.R. Hughes, W.W. Navarre, B. Xia & J. Liu (2011) Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *PNAS* **108**: 10690-10695.
- Gottesman, S. & G. Storz (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Götz, A. & W. Goebel (2010) Glucose and glucose 6-phosphate as carbon sources in extra- and intracellular growth of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Microbiology* **156**: 1176-1187.
- Grainger, D.C., D. Hurd, M.D. Goldberg & S.J. Busby (2006) Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res* **34**: 4642-4652.
- Grimont, P.A.D. & F.X. Weill (2007) Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*: 9th Edition.
- Groisman, E.A. & H. Ochman (1997) How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**: 343-349.
- Gulig, P.A., H. Danbara, D.G. Guiney, A.J. Lax, F. Norel & M. Rhen (1993) Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* **7**: 825-830.
- Gulig, P.A. & T.J. Doyle (1993) The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* **61**: 504-511.
- Gutnick, D., J.M. Calvo, T. Klopotoski & B.N. Ames (1969) Compounds which serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella* Typhimurium LT-2. *J Bacteriol* **100**: 215-219.
- Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre & W. Goebel (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* **8**: 213-225.

- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer & H. Tschape (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.
- Hacker, J. & J.B. Kaper (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.
- Hamilton, E.P. & N. Lee (1988) Three binding sites for AraC protein are required for autoregulation of araC in *Escherichia coli*. *PNAS* **85**: 1749-1753.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch & G. Winkelmann (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor Iron. *PNAS* **100**: 3677-3682.
- Hardt, W.D., L.M. Chen, K.E. Schuebel, X.R. Bustelo & J.E. Galan (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**: 815-826.
- Haros, M., N.G. Carlsson, A. Almgren, M. Larsson-Alminger, A.S. Sandberg & T. Andlid (2009) Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *Int J Food Microbiol* **135**: 7-14.
- Hart, E., J. Yang, M. Tauschek, M. Kelly, M.J. Wakefield, G. Frankel, E.L. Hartland & R.M. Robins-Browne (2008) RegA, an AraC-like protein, is a global transcriptional regulator that controls virulence gene expression in *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **76**: 5247-5256.
- Häuslein, I., C. Manske, W. Goebel, W. Eisenreich & H. Hilbi (2016) Pathway analysis using (13) C-glycerol and other carbon tracers reveals a bipartite metabolism of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **100**: 229-246.
- Hautefort, I., A. Thompson, S. Eriksson-Ygberg, M.L. Parker, S. Lucchini, V. Danino, R.J. Bongaerts, N. Ahmad, M. Rhen & J.C. Hinton (2008) During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* **10**: 958-984.
- Hawkins, P.T. & L.R. Stephens (2015) PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta* **1851**: 882-897.
- Helaine, S., A.M. Cheverton, K.G. Watson, L.M. Faure, S.A. Matthews & D.W. Holden (2014) Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* **343**: 204-208.
- Hellinckx, J. & T.M. Fuchs (2016) Hysteresis in myo-inositol utilization by *Salmonella* Typhimurium. *MicrobiologyOpen*, 00: 00:01-06.
- Hensel, M., J.E. Shea, A.J. Bäumlner, C. Gleeson, F. Blattner & D.W. Holden (1997) Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **179**: 1105-1111.

- Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler & N.C. Andrews (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**: 285-297.
- Higgins, N.P. & A.V. Vologodskii (2015) Topological behavior of plasmid DNA. *Microbiol Spectr* **3**.
- Hobbie, S., L.M. Chen, R.J. Davis & J.E. Galan (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* **159**: 5550-5559.
- Hof, H. & R. Dörries (2005) Medizinische Mikrobiologie. *Thieme, Duale Reihe* (3), 376-384.
- Holt, K.E., N.R. Thomson, J. Wain, G.C. Langridge, R. Hasan, Z.A. Bhutta, M.A. Quail, H. Norbertczak, D. Walker, M. Simmonds, B. White, N. Bason, K. Mungall, G. Dougan & J. Parkhill (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* **10**: 36.
- Hugdahl, M.B., J.T. Beery & M.P. Doyle (1988) Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **56**: 1560-1566.
- Humer, E., C. Schwarz & K. Schedle (2015) Phytate in pig and poultry nutrition. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **99**: 605-625.
- Husain, M., J. Jones-Carson, M. Song, B.D. McCollister, T.J. Bourret & A. Vazquez-Torres (2010) Redox sensor SsrB Cys203 enhances *Salmonella* fitness against nitric oxide generated in the host immune response to oral infection. *PNAS* **107**: 14396-14401.
- Irani, M.H. & P.K. Maitra (1977) Properties of *Escherichia coli* mutants deficient in enzymes of glycolysis. *J Bacteriol* **132**: 398-410.
- Jahreis, K., E.F. Pimentel-Schmitt, R. Bruckner & F. Titgemeyer (2008) Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 891-907.
- Jantsch, J., C. Cheminay, D. Chakravorty, T. Lindig, J. Hein & M. Hensel (2003) Intracellular activities of *Salmonella enterica* in murine dendritic cells. *Cell Microbiol* **5**: 933-945.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna & E. Charpentier (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816-821.
- Jones, B.D., N. Ghori & S. Falkow (1994) *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**: 15-23.
- Jones, M.A., M.W. Wood, P.B. Mullan, P.R. Watson, T.S. Wallis & E.E. Galyov (1998) Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* **66**: 5799-5804.
- Kadner, R.J., G.P. Murphy & C.M. Stephens (1992) Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **138**: 2007-2014.

- Kasim, A.B. & H.M. Edwards (1998) The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. *J Sci Food Agric* **76**: 1-9.
- Kawsar, H.I., K. Ohtani, K. Okumura, H. Hayashi & T. Shimizu (2004) Organization and transcriptional regulation of *myo*-inositol operon in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett* **235**: 289-295.
- Keller, L. & M.G. Surette (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**: 249-258.
- Kern, T., E. Kutzner, W. Eisenreich & T.M. Fuchs (2016) Pathogen-nematode interaction: Nitrogen supply of *Listeria monocytogenes* during growth in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol Rep* **8**: 20-29.
- Kim, J.N. & Y.M. Kwon (2013) Identification of target transcripts regulated by small RNA RyhB homologs in *Salmonella*: RyhB-2 regulates motility phenotype. *Microbiol Res* **168**: 621-629.
- Kingsford, C.L., K. Ayanbule & S.L. Salzberg (2007) Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol* **8**: R22.
- Klumpp, J. & T.M. Fuchs (2007) Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* **153**: 1207-1220.
- Knapp, S., J. Hacker, T. Jarchau & W. Goebel (1986) Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J Bacteriol* **168**: 22-30.
- Knodler, L.A. (2015) *Salmonella enterica*: living a double life in epithelial cells. *Curr Opin Microbiol* **23**: 23-31.
- Knodler, L.A., B.A. Vallance, J. Celli, S. Winfree, B. Hansen, M. Montero & O. Steele-Mortimer (2010) Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *PNAS* **107**: 17733-17738.
- Kothary, M.H. & U.S. Babu (2001) Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: A review. *J Food Saf* **21**: 49-68.
- Krings, E., K. Krumbach, B. Bathe, R. Kelle, V.F. Wendisch, H. Sahm & L. Eggeling (2006) Characterization of *myo*-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. *J Bacteriol* **188**: 8054-8061.
- Kröger, C. (2010) Molekulare Charakterisierung des *myo*-Inositol Metabolismus von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Genetik, Transport und Regulation. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan.
- Kröger, C., A. Colgan, S. Srikumar, K. Handler, S.K. Sivasankaran, D.L. Hammarlof, R. Canals, J.E. Grissom, T. Conway, K. Hokamp & J.C. Hinton (2013) An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* **14**: 683-695.

- Kröger, C., S.C. Dillon, A.D. Cameron, K. Papenfort, S.K. Sivasankaran, K. Hokamp, Y. Chao, A. Sittka, M. Hebrard, K. Handler, A. Colgan, P. Leekitcharoenphon, G.C. Langridge, A.J. Lohan, B. Loftus, S. Lucchini, D.W. Ussery, C.J. Dorman, N.R. Thomson, J. Vogel & J.C. Hinton (2012) The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PNAS* **109**: E1277-1286.
- Kröger, C. & T.M. Fuchs (2009) Characterization of the *myo*-inositol utilization island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **191**: 545-554.
- Kröger, C., S. Srikumar, J. Ellwart & T.M. Fuchs (2011) Bistability in *myo*-inositol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**: 1427-1435.
- Kröger, C., J. Stolz & T.M. Fuchs (2010) *myo*-Inositol transport by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **156**: 128-138.
- Kuhle, V. & M. Hensel (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2812-2826.
- Kutzner, E., T. Kern, A. Felsl, W. Eisenreich & T.M. Fuchs (2016) Isotopologue profiling of the listerial N-metabolism. *Mol Microbiol* **100**: 315-327.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamichhane-Khadka, R., S.L. Benoit, S.E. Maier & R.J. Maier (2013) A link between gut community metabolism and pathogenesis: molecular hydrogen-stimulated glucarate catabolism aids *Salmonella* virulence. *Open Biol* **3**: 130146.
- Lara-Tejero, M. & J.E. Galan (2009) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infect Immun* **77**: 2635-2642.
- Lawhon, S.D., J.G. Frye, M. Suyemoto, S. Porwollik, M. McClelland & C. Altier (2003) Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **48**: 1633-1645.
- Lawley, T.D., K. Chan, L.J. Thompson, C.C. Kim, G.R. Govoni & D.M. Monack (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**: e11.
- Le Bouguenec, C. & C. Schouler (2011) Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. *Int J Med Microbiol* **301**: 1-6.
- Lee, A.T. & A. Cerami (1987) Elevated glucose 6-phosphate levels are associated with plasmid mutations *in vivo*. *PNAS* **84**: 8311-8314.
- Lee, C.A., B.D. Jones & S. Falkow (1992) Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *PNAS* **89**: 1847-1851.
- Legakis, N.J., J.T. Papavassiliou & M.E. Xilinas (1976) Inositol as a selective substrate for the growth of *Klebsiellae* and *Serratiae*. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **235**: 453-458.
- Lemtiri-Chlieh, F., E.A. MacRobbie, A.A. Webb, N.F. Manison, C. Brownlee, J.N. Skepper, J. Chen, G.D. Prestwich & C.A. Brearley (2003) Inositol

- hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *PNAS* **100**: 10091-10095.
- Liss, V. & M. Hensel (2015) Take the tube: remodelling of the endosomal system by intracellular *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol* **17**: 639-647.
- Liu, Y., H. Chen, L. Kenney & J. Yan (2010) A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes Dev.* **24**: 339.
- Lober, S., D. Jackel, N. Kaiser & M. Hensel (2006) Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* **296**: 435-447.
- Loewus, F.A., J.D. Everard & K.A. Young (1990) Inositol metabolism: Precursor role and breakdown. In: Inositol Metabolism in Plants. D.J. Morr e, W.F. Boss & F.A. Loewus (eds). New York: Wiley-Liss, pp. 21-45.
- Lucchini, S., G. Rowley, M.D. Goldberg, D. Hurd, M. Harrison & J.C. Hinton (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**: e81.
- Malik-Kale, P., S. Winfree & O. Steele-Mortimer (2012) The bimodal lifestyle of intracellular *Salmonella* in epithelial cells: replication in the cytosol obscures defects in vacuolar replication. *PLoS One* **7**: e38732.
- Manske, C., U. Schell & H. Hilbi (2016) Metabolism of *myo*-inositol by *Legionella pneumophila* promotes infection of amoebae and macrophages. *Appl Environ Microbiol* **82**: 5000-5014.
- Martin, R.G. & J.L. Rosner (2001) The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol* **4**: 132-137.
- Masse, E., C.K. Vanderpool & S. Gottesman (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6962-6971.
- Matsui, H., C.M. Bacot, W.A. Garlington, T.J. Doyle, S. Roberts & P.A. Gulig (2001) Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol* **183**: 4652-4658.
- Matsumoto, M., R. Kibe, T. Ooga, Y. Aiba, S. Kurihara, E. Sawaki, Y. Koga & Y. Benno (2012) Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep* **2**: 233.
- McClelland, M., K.E. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R.K. Wilson (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**: 852-856.
- McQuate, S.E., A.M. Young, E. Silva-Herzog, E. Bunker, M. Hernandez, F. de Chaumont, X. Liu, C.S. Detweiler & A.E. Palmer (2017) Long-term live-cell imaging reveals new roles for *Salmonella* effector proteins SseG and SteA. *Cell Microbiol* **19**: e12641-n/a.

- Meyer, J.H., L.W. Way & M.I. Grossman (1970) Pancreatic bicarbonate response to various acids in duodenum of the dog. *Am J Physiol* **219**: 964-970.
- Michell, R.H. (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 151-161.
- Moll, I., T. Afonyushkin, O. Vytvytska, V.R. Kaberdin & U. Blasi (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**: 1308-1314.
- Monack, D.M., C.S. Detweiler & S. Falkow (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. *Cell Microbiol* **3**: 825-837.
- Morin, N., C. Tirling, S.M. Ivison, A.P. Kaur, J.P. Nataro & T.S. Steiner (2010) Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**: 344-355.
- Nairz, M., D. Haschka, E. Demetz & G. Weiss (2014) Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol* **5**: 152.
- Navarre, W.W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S.J. Libby & F.C. Fang (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**: 236-238.
- Neidhardt, F.C., P.L. Bloch & D.F. Smith (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119**: 736-747.
- Ng, K.M., J.A. Ferreyra, S.K. Higginbottom, J.B. Lynch, P.C. Kashyap, S. Gopinath, N. Naidu, B. Choudhury, B.C. Weimer, D.M. Monack & J.L. Sonnenburg (2013) Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* **502**: 96-99.
- Nicol, J.W., G.A. Helt, S.G. Blanchard, Jr., A. Raja & A.E. Loraine (2009) The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* **25**: 2730-2731.
- Norris, F.A., M.P. Wilson, T.S. Wallis, E.E. Galyov & P.W. Majerus (1998) SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *PNAS* **95**: 14057-14059.
- Ochman, H., J.G. Lawrence & E.A. Groisman (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Ochman, H., F.C. Soncini, F. Solomon & E.A. Groisman (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *PNAS* **93**: 7800-7804.
- Ochman, H. & A.C. Wilson (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* **26**: 74-86.
- Old, D.C. (1972) Temperature-dependent utilization of meso-inositol: a useful biotyping marker in the genealogy of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **112**: 779-783.

- Oliva, G., T. Sahr & C. Buchrieser (2015) Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 331-349.
- Osborne, S.E. & B.K. Coombes (2011) Transcriptional priming of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 precedes cellular invasion. *PLoS One* **6**: e21648.
- Oshima, T., S. Ishikawa, K. Kurokawa, H. Aiba & N. Ogasawara (2006) *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res* **13**: 141-153.
- Padalon-Brauch, G., R. Hershberg, M. Elgrably-Weiss, K. Baruch, I. Rosenshine, H. Margalit & S. Altuvia (2008) Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res* **36**: 1913-1927.
- Papenfort, K., D. Podkaminski, J.C. Hinton & J. Vogel (2012) The ancestral SgrS RNA discriminates horizontally acquired *Salmonella* mRNAs through a single G-U wobble pair. *PNAS* **109**: E757-764.
- Papenfort, K., Y. Sun, M. Miyakoshi, C.K. Vanderpool & J. Vogel (2013) Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell* **153**: 426-437.
- Patel, J.C. & J.E. Galan (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**: 453-463.
- Paul, S., E.V. Sokurenko & S. Chattopadhyay (2016) Corrected genome annotations reveal gene loss and antibiotic resistance as drivers in the fitness evolution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **198**: 3152-3161.
- Pfaffl, M.W., G.W. Horgan & L. Dempfle (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36.
- Popoff, M.Y., I. Miras, C. Coynault, C. Lasselin & P. Pardon (1984) Molecular relationships between virulence plasmids of *Salmonella* serotypes typhimurium and dublin and large plasmids of other *Salmonella* serotypes. *Ann Microbiol (Paris)* **135A**: 389-398.
- Popp, J., J. Noster, K. Busch, A. Kehl, G. zur Hellen & M. Hensel (2015) Role of host cell-derived amino acids in nutrition of intracellular *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **83**: 4466-4475.
- Porter, M.E., P. Mitchell, A.J. Roe, A. Free, D.G. Smith & D.L. Gally (2004) Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 1117-1133.
- Porwollik, S. & M. McClelland (2003) Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**: 977-989.
- Raboy, V. (1990) Biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. In: Inositol Metabolism in Plants. D.J. Morr e, W.F. Boss & F.A. Loewus (eds). New York: Wiley-Liss, pp. 55-67.

- Raboy, V. (1997) Accumulation and Storage of Phosphate and Minerals. In: Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. B.A. Larkins & I.K. Vasil (eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 441-477.
- Rabsch, W., H. Tschape & A.J. Bäuml (2001) Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* **3**: 237-247.
- Raffatellu, M., M.D. George, Y. Akiyama, M.J. Hornsby, S.P. Nuccio, T.A. Paixao, B.P. Butler, H. Chu, R.L. Santos, T. Berger, T.W. Mak, R.M. Tsohis, C.L. Bevins, J.V. Solnick, S. Dandekar & A.J. Bäuml (2009) Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* **5**: 476-486.
- Rber, G., M. Belet & J. Deshusses (1977) Myo-inositol transport system in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **131**: 872-875.
- Reddy, N. (2002) Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: *Food Phytates*. R. NR & S. SK (eds). Boca Raton Florida: CRC Press, pp. 25-51.
- Reese, M.G. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**: 51-56.
- Rehmsmeier, M., P. Steffen, M. Hochsmann & R. Giegerich (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* **10**: 1507-1517.
- Repaske, R. & M.A. Clayton (1978) Control of *Escherichia coli* growth by CO₂. *J Bacteriol* **135**: 1162-1164.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.P. Kraehenbuhl & P. Ricciardi-Castagnoli (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**: 361-367.
- Reynolds, T.B. (2009) Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. *Microbiology* **155**: 1386-1396.
- Rice, J.B. & C.K. Vanderpool (2011) The small RNA SgrS controls sugar-phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes. *Nucleic Acids Res* **39**: 3806-3819.
- Robert-Koch-Institut (2016) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015, Berlin.
- Rohmer, L., D. Hocquet & S.I. Miller (2011) Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* **19**: 341-348.
- Rollenhagen, C. & D. Bumann (2006) *Salmonella enterica* highly expressed genes are disease specific. *Infect Immun* **74**: 1649-1660.
- Rothhardt, J.E., C. Kröger, S.P. Broadley & T.M. Fuchs (2014) The orphan regulator ReiD of *Salmonella enterica* is essential for myo-inositol utilization. *Mol Microbiol* **94**: 700-712.
- Ruiz-Albert, J., X.J. Yu, C.R. Beuzon, A.N. Blakey, E.E. Galyov & D.W. Holden (2002) Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol* **44**: 645-661.

- Salmon, D.E. & T. Smith (1886) The bacterium of swine-plague. *Am Mon Microsc J* **7**: 204–205.
- Sampson, E.M. & T.A. Bobik (2008) Microcompartments for B12-dependent 1,2-propanediol degradation provide protection from DNA and cellular damage by a reactive metabolic intermediate. *J Bacteriol* **190**: 2966-2971.
- Sansonetti, P.J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* **4**: 953-964.
- Santos, R.L. & A.J. Bäumler (2004) Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**: 225-233.
- Santos, R.L., M. Raffatellu, C.L. Bevins, L.G. Adams, C. Tukel, R.M. Tsolis & A.J. Bäumler (2009) Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol* **17**: 498-506.
- Saramago, M., C. Barria, R.F. Dos Santos, I.J. Silva, V. Pobre, S. Domingues, J.M. Andrade, S.C. Viegas & C.M. Arraiano (2014) The role of RNases in the regulation of small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **18**: 105-115.
- Schaible, U.E. & S.H. Kaufmann (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**: 946-953.
- Schechter, L.M., S. Jain, S. Akbar & C.A. Lee (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**: 5432-5435.
- Schleif, R. (2003) AraC protein: a love-hate relationship. *Bioessays* **25**: 274-282.
- Schurmann, N., P. Forrer, O. Casse, J. Li, B. Felmy, A.V. Burgener, N. Ehrenfeuchter, W.D. Hardt, M. Recher, C. Hess, A. Tschan-Plessl, N. Khanna & D. Bumann (2017) Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to *Salmonella* and prevents collateral tissue damage. *Nat Microbiol* **2**: 16268.
- Schwan, W.R., X.Z. Huang, L. Hu & D.J. Kopecko (2000) Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun* **68**: 1005-1013.
- Sette, M., R. Spurio, E. Trotta, C. Brandizi, A. Brandi, C.L. Pon, G. Barbato, R. Boelens & C.O. Gualerzi (2009) Sequence-specific recognition of DNA by the C-terminal domain of nucleoid-associated protein H-NS. *J Biol Chem* **284**: 30453-30462.
- Sewell, W.A. & J.A. Young (1975) Secretion of electrolytes by the pancreas of the anaesthetized rat. *J Physiol* **252**: 379-396.
- Shea, J.E., M. Hensel, C. Gleeson & D.W. Holden (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *PNAS* **93**: 2593-2597.
- Shimoni, Y., G. Friedlander, G. Hetzroni, G. Niv, S. Altuvia, O. Biham & H. Margalit (2007) Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view. *Mol Syst Biol* **3**: 138.
- Simon, R., U. Priefer & A. Pühler (1983) A Broad Host Range Mobilization System for *in vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.

- Singh, K., J.N. Milstein & W.W. Navarre (2016) Xenogeneic Silencing and Its Impact on Bacterial Genomes. *Annu Rev Microbiol* **70**: 199-213.
- Sittka, A., V. Pfeiffer, K. Tedin & J. Vogel (2007) The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* **63**: 193-217.
- Soisson, S.M., B. MacDougall-Shackleton, R. Schleif & C. Wolberger (1997) Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science* **276**: 421-425.
- Solovyev, V. & A. Salamov (2011) Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In: Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies. R.W. Li (ed). Nova Science Publishers, pp. 61-78.
- Sorek, R. & P. Cossart (2010) Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* **11**: 9-16.
- Sparvoli, F. & E. Cominelli (2015) Seed biofortification and phytic acid reduction: a conflict of interest for the plant? *Plants (Basel)* **4**: 728-755.
- Srikumar, S., C. Kröger, M. Hebrard, A. Colgan, S.V. Owen, S.K. Sivasankaran, A.D. Cameron, K. Hokamp & J.C. Hinton (2015) RNA-seq brings new insights to the intra-macrophage transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog* **11**: e1005262.
- Staib, L. & T.M. Fuchs (2014) From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology* **160**: 1020-1039.
- Staib, L. & T.M. Fuchs (2015) Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Front Microbiol* **6**: 1116.
- Starke, M., M. Richter & T.M. Fuchs (2013) The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. *Mol Microbiol* **89**: 596-611.
- Stecher, B., A.J. Macpherson, S. Hapfelmeier, M. Kremer, T. Stallmach & W.D. Hardt (2005) Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* **73**: 3228-3241.
- Steeb, B., B. Claudi, N.A. Burton, P. Tienz, A. Schmidt, H. Farhan, A. Maze & D. Bumann (2013) Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. *PLoS Pathog* **9**: e1003301.
- Steege, D.A. (2000) Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA* **6**: 1079-1090.
- Stoebel, D.M., A. Free & C.J. Dorman (2008) Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**: 2533-2545.
- Storz, G., J. Vogel & K.M. Wassarman (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* **43**: 880-891.
- Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn & J.W. Dubendorff (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.

- Sun, Y. & C.K. Vanderpool (2013) Physiological consequences of multiple-target regulation by the small RNA SgrS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**: 4804-4815.
- Sundaram, T.K. (1972) Myo-inositol catabolism in *Salmonella typhimurium*: enzyme repression dependent on growth history of organism. *J Gen Microbiol* **73**: 209-219.
- Thiennimitr, P., S.E. Winter & A.J. Bäumlner (2012) *Salmonella*, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol* **15**: 108-114.
- Thiennimitr, P., S.E. Winter, M.G. Winter, M.N. Xavier, V. Tolstikov, D.L. Huseby, T. Sterzenbach, R.M. Tsohis, J.R. Roth & A.J. Bäumlner (2011) Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *PNAS* **108**: 17480-17485.
- Thijs, I.M., S.C. De Keersmaecker, A. Fadda, K. Engelen, H. Zhao, M. McClelland, K. Marchal & J. Vanderleyden (2007) Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J Bacteriol* **189**: 4587-4596.
- Thomason, M.K. & G. Storz (2010) Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet* **44**: 167-188.
- Thomson, N.R., D.J. Clayton, D. Windhorst, G. Vernikos, S. Davidson, C. Churcher, M.A. Quail, M. Stevens, M.A. Jones, M. Watson, A. Barron, A. Layton, D. Pickard, R.A. Kingsley, A. Bignell, L. Clark, B. Harris, D. Ormond, Z. Abdellah, K. Brooks, I. Cherevach, T. Chillingworth, J. Woodward, H. Norberczak, A. Lord, C. Arrowsmith, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, M. Sanders, S. Whitehead, J.A. Chabalgoity, D. Maskell, T. Humphrey, M. Roberts, P.A. Barrow, G. Dougan & J. Parkhill (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res* **18**: 1624-1637.
- Thornbrough, J.M. & M.J. Worley (2012) A naturally occurring single nucleotide polymorphism in the *Salmonella* SPI-2 type III effector SrfH/Ssel controls early extraintestinal dissemination. *PLoS One* **7**: e45245.
- Tilden, J., Jr., W. Young, A.M. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M.A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S.B. Werner, J. Hollingsworth & J.G. Morris, Jr. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* **86**: 1142-1145.
- Tomljenovic-Berube, A.M., D.T. Mulder, M.D. Whiteside, F.S. Brinkman & B.K. Coombes (2010) Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. *PLoS Genet* **6**: e1000875.
- Turner, B.L., M.J. Paphazy, P.M. Haygarth & I.D. McKelvie (2002) Inositol phosphates in the environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 449-469.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm & S.G. Rozen (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**: e115.

- Urban, J.H. & J. Vogel (2007) Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **35**: 1018-1037.
- Valley, G. & L.F. Rettger (1927) The influence of carbon dioxide on bacteria. *J Bacteriol* **14**: 101-137.
- Van Dyk, T.K. & R.A. Rosson (1998) *Photobacterium luminescens luxCDABE* promoter probe vectors. *Methods Mol Biol* **102**: 85-95.
- Vanderpool, C.K. & S. Gottesman (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **54**: 1076-1089.
- Vanderpool, C.K. & S. Gottesman (2007) The novel transcription factor SgrR coordinates the response to glucose-phosphate stress. *J Bacteriol* **189**: 2238-2248.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A.J. Bäumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W.T. Parks & F.C. Fang (1999) Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**: 804-808.
- Viegas, S.C., V. Pfeiffer, A. Sittka, I.J. Silva, J. Vogel & C.M. Arraiano (2007) Characterization of the role of ribonucleases in *Salmonella* small RNA decay. *Nucleic Acids Res* **35**: 7651-7664.
- Viegas, S.C., I.J. Silva, M. Saramago, S. Domingues & C.M. Arraiano (2011) Regulation of the small regulatory RNA MicA by ribonuclease III: a target-dependent pathway. *Nucleic Acids Res* **39**: 2918-2930.
- Vogel, J. (2009) A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* **71**: 1-11.
- Vogel, J. & B.F. Luisi (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578-589.
- Walker, H.H. (1932) Carbon dioxide as a factor affecting lag in bacterial growth. *Science* **76**: 602-604.
- Walthers, D., R.K. Carroll, W.W. Navarre, S.J. Libby, F.C. Fang & L.J. Kenney (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**: 477-493.
- Walthers, D., Y. Li, Y. Liu, G. Anand, J. Yan & L.J. Kenney (2011) *Salmonella enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* **286**: 1895-1902.
- Wang, Y., E. Holmes, E.M. Comelli, G. Fotopoulos, G. Dorta, H. Tang, M.J. Rantalainen, J.C. Lindon, I.E. Corthesy-Theulaz, L.B. Fay, S. Kochhar & J.K. Nicholson (2007) Topographical variation in metabolic signatures of human gastrointestinal biopsies revealed by high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* **6**: 3944-3951.

- Warda, A.K., R.J. Siezen, J. Boekhorst, M.H. Wells-Bennik, A. de Jong, O.P. Kuipers, M.N. Nierop Groot & T. Abee (2016) Linking *Bacillus cereus* genotypes and carbohydrate utilization capacity. *PLoS One* **11**: e0156796.
- Wassarman, K.M., F. Repoila, C. Rosenow, G. Storz & S. Gottesman (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* **15**: 1637-1651.
- Waters, L.S. & G. Storz (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615-628.
- Will, W.R., W.W. Navarre & F.C. Fang (2015) Integrated circuits: how transcriptional silencing and counter-silencing facilitate bacterial evolution. *Curr Opin Microbiol* **23**: 8-13.
- Winson, M.K., S. Swift, P.J. Hill, C.M. Sims, G. Griesmayr, B.W. Bycroft, P. Williams & G.S. Stewart (1998) Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 193-202.
- Winter, S.E., P. Thiennimitr, M.G. Winter, B.P. Butler, D.L. Huseby, R.W. Crawford, J.M. Russell, C.L. Bevens, L.G. Adams, R.M. Tsolis, J.R. Roth & A.J. Bäuml (2010) Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**: 426-429.
- Worley, M.J., K.H. Ching & F. Heffron (2000) *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* **36**: 749-761.
- Worley, M.J., G.S. Nieman, K. Geddes & F. Heffron (2006) *Salmonella* Typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *PNAS* **103**: 17915-17920.
- Wu, H., R.M. Jones & A.S. Neish (2012) The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection *in vivo*. *Cell Microbiol* **14**: 28-39.
- Xu, X. & M. Hensel (2010) Systematic analysis of the SsrAB virulon of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **78**: 49-58.
- Yang, J., C. Dogovski, D. Hocking, M. Tauschek, M. Perugini & R.M. Robins-Browne (2009) Bicarbonate-mediated stimulation of RegA, the global virulence regulator from *Citrobacter rodentium*. *J Mol Biol* **394**: 591-599.
- Yang, J., E. Hart, M. Tauschek, G.D. Price, E.L. Hartland, R.A. Strugnell & R.M. Robins-Browne (2008) Bicarbonate-mediated transcriptional activation of divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol* **68**: 314-327.
- Yang, J., M. Tauschek & R.M. Robins-Browne (2011) Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends Microbiol* **19**: 128-135.
- Yebra, M.J., M. Zuniga, S. Beaufils, G. Perez-Martinez, J. Deutscher & V. Monedero (2007) Identification of a gene cluster enabling *Lactobacillus casei* BL23 to utilize myo-inositol. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3850-3858.

- Yoshida, K., M. Yamaguchi, T. Morinaga, M. Kinehara, M. Ikeuchi, H. Ashida & Y. Fujita (2008) *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **283**: 10415-10424.
- Yoshida, K., Y. Yamamoto, K. Omae, M. Yamamoto & Y. Fujita (2002) Identification of two *myo*-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 983-991.
- Yoshida, K.I., D. Aoyama, I. Ishio, T. Shibayama & Y. Fujita (1997) Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **179**: 4591-4598.
- Yoshida, K.I., T. Shibayama, D. Aoyama & Y. Fujita (1999) Interaction of a repressor and its binding sites for regulation of the *Bacillus subtilis iol* divergon. *J Mol Biol* **285**: 917-929.
- Zhang, S., R.A. Kingsley, R.L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R.M. Tsois, L.G. Adams & A.J. Bäumlner (2003) Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* **71**: 1-12.
- Zhang, S., R.L. Santos, R.M. Tsois, S. Stender, W.D. Hardt, A.J. Bäumlner & L.G. Adams (2002) The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* **70**: 3843-3855.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.

Danksagung

Die vergangenen Jahre der Forschungsarbeit waren außerordentlich spannend, sehr erfüllend und bereichernd. Dass ich diese positiven Erfahrungen machen durfte, verdanke ich vielen Personen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Dafür, dass jeder auf eine besondere Weise für mich da war, möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken!

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs, der mir sowohl große Freiheiten in der Ausgestaltung meines Forschungsprojektes gewährt hat, als auch jederzeit mit kompetentem Rat, Anregungen und Humor zur Seite stand. Für das entgegengebrachte Vertrauen, seine ständige Hilfsbereitschaft und die vielen Diskussionen, auch über das Thema meiner Dissertation hinaus, danke ich ihm sehr.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie anfertigen zu dürfen, und die familiäre Atmosphäre in seiner Abteilung, die maßgeblich seinem freundlichen Führungsstil zu verdanken ist.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei den Mitarbeitern der AG Fuchs möchte ich mich für die unglaublich tolle Zeit in Freising bedanken. Durch die sehr gute Arbeitsatmosphäre und gute Musik war es mir eine große Freude mit euch zusammenzuarbeiten! Vielen Dank an Jessica Hellinckx, Angela Felsl, Dr. Mandy Knüpfer, Dr. Tanja Kern, Nicoletta Nolle, Patrick Schiweck, Dr. Konstantin Shavkunov, Katharina Springer und Dr. Lena Staib! Ihr seid toll!

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Carsten Kröger für seine Hilfsbereitschaft, die Diskussionen und Ratschläge sowie die Führungen durch Dublin.

Dr. Richard Landstorfer danke ich für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, insbesondere bezüglich Entomologie und Limnologie/Zoologie.

Maria und Gitti danke ich für ihre allzeit große Hilfsbereitschaft und gute Laune.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter sowie meine Studenten Steven Broadley, Julian Esselborn, Daniela Fellner, Christina Loos und Justine Szumielewski des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie für das angenehme Miteinander.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich zu jedem Zeitpunkt mit allen Kräften unterstützt hat und immer für mich da ist. Ihr seid fantastisch! Besonders erwähnen möchte ich hier Rosemarie Bergmann, die mir durch ihre großen Bemühungen geholfen hat, der deutschen Sprache angemessen gerecht zu werden. Vielen Dank für deine Unterstützung!

Zudem möchte ich mich bei allen Freunden und meiner Familie für ihr Verständnis bedanken, dass ich ihnen in den vergangenen Jahren nicht die ihnen angemessene Zeit und Aufmerksamkeit habe entgegen bringen können.

Olivia, Till und Joshua, Worte allein reichen hier einfach nicht aus. DANKE für alles!!!