



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Salmonella Typhimurium-Infektion:
Ernährungsabhängiges Transkriptom und
Charakterisierung eines Galaktitol-spezifischen
Aufnahmesystems

Nicoletta W.K. Nolle

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:

Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. T. Fuchs

2. Prof. Dr. D. Haller

Die Dissertation wurde am 12.01.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.03.2017 angenommen

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	XII
SUMMARY	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Gattung <i>Salmonella</i>	1
1.1.1 Hintergrund und Charakteristika	1
1.1.2 Epidemiologie und Übertragung	2
1.1.3 <i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinseln (SPIs)	2
1.1.4 Weitere Virulenzfaktoren	3
1.1.5 <i>Salmonella</i> Typhimurium als Krankheitserreger - Pathogenese und zelluläre Grundlagen	5
1.2 Interaktion von Pathogenen mit der Mikrobiota	8
1.2.1 Intestinales Mikrobiom.....	8
1.2.2 Funktion der Mikrobiota.....	10
1.2.3 Kolonisierungsresistenz	11
1.2.4 Kolonisierung von Pathogenen im Darm	13
1.3 Metabolismus als Virulenzfaktor	14
1.3.1 Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen als Überlebensstrategie im Darm	14
1.3.2 Der Mucus als Nährstoffquelle	15
1.3.3 Verstoffwechselfähigkeit von 1,2-Propandiol	16
1.3.4 Ethanolamin als Kohlenstoffquelle	16
1.3.5 Aufnahme von alternativen Kohlenstoffquellen durch Phosphotransferase-Systeme (PTS)	17
1.3.6 Aufnahme und Verstoffwechselfung von Galaktitol	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Mikrobiologische Techniken	21
2.1.1 Bakterienstämme	21
2.1.2 Kulturbedingungen, Antibiotika und Medien	21
2.1.3 Lagerung der Bakterien	23
2.1.4 Wachstumsuntersuchungen in Komplex- und Minimalmedium	23
2.1.5 Kompetitiver Index	23

2.1.6	Phänotypische Charakterisierung von <i>S. Typhimurium</i> -Mutanten	23
2.2	Molekulargenetische Methoden.....	25
2.2.1	Oligonukleotide, Plasmide und Molekulargewichtsmarker	25
2.2.2	Präparation von Nukleinsäuren.....	25
2.2.2.1	Plasmidisolierung.....	25
2.2.2.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. Typhimurium</i>	25
2.2.2.3	RNA-Isolation aus <i>S. Typhimurium</i>	26
2.2.2.4	Entfernung der ribosomalen RNA aus RNA Proben	27
2.2.2.5	RNA-Fragmentierung	28
2.2.2.6	DNase Verdau	28
2.2.2.7	Herstellung von cDNA mittels reverser Transkriptase	28
2.2.2.8	Herstellung einer cDNA-Bibliothek (cDNA Bibliothek).....	29
2.2.2.9	Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Ethanolfällung	29
2.2.2.10	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.2.4.1	Standard-PCR	31
2.2.4.2	Kolonie-PCR.....	32
2.2.4.3	Reverse Transkriptase-PCR	32
2.2.4.4	Aufreinigung von PCR-Fragmenten und linearisierten Plasmiden.....	33
2.2.5	Enzymatische Modifikation von DNA	33
2.2.5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	33
2.2.5.2	Dephosphorylierung von DNA	34
2.2.5.3	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von RNA	35
2.2.5.4	Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden	35
2.2.6	DNA-Transfer	36
2.2.6.1	Konjugation.....	36
2.2.6.2	Transformation	37
2.2.6.3	Phagentransduktion.....	39
2.2.7	Konstruktion von <i>Salmonella</i> -Stämmen	40
2.2.7.1	Herstellung von Reporterstämmen in <i>S. Typhimurium</i>	40
2.2.7.2	Herstellung von Deletionsmutanten.....	41
2.2.7.3	Herstellung von Komplementationstämmen	42
2.2.8	Sequenzierung von DNA	43
2.2.8.1	Kontroll-Sequenzierung zur Überprüfung von DNA-Fragmenten und Plasmiden	43
2.2.8.2	Sequenzierung Transkriptom.....	43
2.2.8.3	Sequenzierung der Bakteriengemeinschaft im Mäusedarm.....	43
2.2.9	Bioinformatische Methoden.....	44
2.2.9.1	Phylogenetische Stammbaumanalysen	44
2.2.9.2	Auswertung Bakterienzusammensetzung im Darm.....	45
2.2.9.3	Transkriptomdatenauswertung	45
2.2.10	<i>in vitro</i> Quantifizierung der Biolumineszenz und Fluoreszenz	45
2.2.10.1	Visualisierung der Genexpression mit dem Xenogen In Vivo Imaging System	46
2.2.10.2	Quantifizierung der Genexpression mit dem Wallac Victor3	46
2.2.10.3	Fluoreszenzmikroskopie	46
2.3	Proteinchemische Methoden.....	48
2.3.1	Präparation von Proteinen aus dem Gesamtzellextrakt von <i>S. Typhimurium</i>	48
2.3.2	Überexpression von Proteinen in <i>S. Typhimurium</i>	48
2.3.2.1	Herstellung der pBAD (Amp ^R)-Konstrukte	48

2.3.2.2	Expression heterologer Proteine mit Hilfe von pBAD- <i>Myc/His</i>	49
2.3.2.3	Zellaufschluss mittels French Pressure Cell	49
2.3.2.4	Isolierung von Proteinen aus <i>S. Typhimurium</i> mittels Nickel-Affinitätschromatographie	50
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	51
2.3.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.3.5	Gelmobilitätsstudien	52
2.3.6	Western Blot	53
2.4	<i>in vivo</i> – Mäusversuche	56
2.4.1	Mausstamm	56
2.4.2	Haltungsbedingungen	56
2.4.2.1	Tierhaltung	56
2.4.2.2	Reinigung benutzter Käfige	56
2.4.2.3	Futter und Wasser	57
2.4.2.4	Lagerung sauberer Käfige	57
2.4.2.5	Räume	57
2.4.2.6	Wartungen	57
2.4.2.7	Hygienemanagement	57
2.4.3	Experimentelle Diäten	58
2.4.4	Spezifitätstest von Salmonellen-Antikörpern	59
2.4.4.1	Antikörper-Spezifitätstest mit Bakterienkulturen	59
2.4.4.2	Antikörper-Spezifitätstest mit Darminhalt als Medium	60
2.4.5	Experimenteller Aufbau des Versuches - <i>in vivo</i> Experimente	60
2.4.5.1	Töten der Tiere	60
2.4.5.2	Isolierung des Darminhalts aus der Maus	60
2.4.5.3	Isolierung von <i>S. Typhimurium</i> aus dem Darminhalt	61
2.4.5.4	Bestimmung der Anzahl an <i>S. Typhimurium</i> im Kot	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	Verifizierung der erfolgreichen Etablierung der Methode „Isolation von Salmonellen-RNA aus dem Mäusedarm“	63
3.1.1	Validierung unterschiedlicher Salmonellen-Antikörper bezüglich ihrer Spezifität für <i>S. Typhimurium</i> ST4/74	64
3.1.2	Bestimmung der Bindungseffizienz des BacTrace-Antikörpers an <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 aus dem Darminhalt von Mäusen	66
3.1.3	Wachstumseigenschaften von <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 Δ <i>invA</i> in spezifischen Diäten	67
3.2	Experimentelles Design der <i>in vivo</i> Mäusversuche	68
3.3	Einfluss von Diäten auf das Körpergewicht der Mäuse	70
3.4	Einfluss der unterschiedlichen Diäten auf die Kolonisierungsfähigkeit, die Mikrobiota und das Transkriptom von <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 Δ<i>invA</i> in der Maus	71
3.4.1	Einfluss der unterschiedlichen Diäten auf die <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 Δ <i>invA</i> -Konzentration im Mäusekot	71
3.4.2	Einfluss der Streptomycinbehandlung auf die intestinale bakterielle Mikrobiota	77
3.4.3	Einfluss von <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 Δ <i>invA</i> auf die intestinale bakterielle Mikrobiota	84
3.4.4	Sequenzanalyse des aus dem Mäusedarm isolierten Salmonellen-Transkriptoms	88
3.4.4.1	Schrittweise Synthese der cDNA-Bibliotheken	88
3.4.4.2	Einfluss der Diäten auf das Transkriptom von <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 Δ <i>invA</i>	91

3.5	Charakterisierung eines Galaktitol-spezifischen PTS	95
3.5.1	Genomischer Aufbau des Galaktitol-spezifischen PTS in <i>S. Typhimurium</i> ST4/74 und anderen <i>Salmonella</i> Stämmen	95
3.5.2	Wachstumsverhalten verschiedener Serovar-Typen und Spezies der Gattung <i>Salmonella</i> in Galaktitol- und Tagatose-haltigem M9-Medium	98
3.5.3	Phänotypische Charakterisierung von Deletionsmutanten des Genbereichs <i>gatY-gatR</i>	100
3.5.4	Transkriptionsaktivität der drei putativen Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}	102
3.5.5	Transkriptionsprofil des Genbereichs <i>gatY-gatR</i>	104
3.5.6	Einfluss des CRP-Proteins auf die Regulation des Galaktitol-spezifischen PTS	106
3.6	Charakterisierung des Regulatorproteins GatR	108
3.6.1	<i>In silico</i> Analyse der GatR-Domänen	108
3.6.2	Einfluss von GatR auf die Aktivität der Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}	109
3.6.3	Bindeaffinität des GatR-Proteins zu den Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}	111
3.6.4	Quantifizierung der Bindung von GatR und CRP an Promotorbereiche mittels SPR-Spektroskopie	113
3.6.5	Ausbildung von GatR-Oligomeren	114
3.7	SPI3(III)-Insel	115
3.7.1	SPI3(III)-Region kodiert für ein putatives Zuckeraufnahmesystem	115
3.7.2	Phänotypische Charakterisierung des Wildtyps und der SPI3(III)-Deletionsmutanten	117
3.7.3	Verstoffwechselfähigkeit von Desoxyribose und D-Glucosamin durch die SPI3(III)-Mutante ...	120
3.7.4	Kompetitiver Index	122
3.7.5	Wachstumseigenschaften in verbrauchtem Schweinedarminhalt	123
3.8	Schlussfolgerungen: Einfluss des Metabolismus auf die Virulenz von <i>S. Typhimurium</i>	126
4	DISKUSSION UND AUSBLICK	127
4.1	Zusammenspiel zwischen Ernährung, der Darm-Mikrobiota und <i>S. Typhimurium</i>	127
4.1.1	Einfluss der Ernährung auf die Mikrobiota	127
4.1.2	Diversitätsverlust der Mikrobiota als Folge einer Streptomycin-Behandlung	130
4.1.3	Interpendenz zwischen der Darm-Mikrobiota und <i>S. Typhimurium</i>	132
4.1.4	Diät-abhängiges Transkriptom	133
4.2	Die Verstoffwechslung von Galaktitol	137
4.2.1	Die Rolle des <i>gat</i> -Genclusters in der Virulenz von <i>S. Typhimurium</i>	137
4.2.2	Verstoffwechslung von Galaktitol und D-Tagatose	137
4.2.3	Rolle des DeoR-ähnlichen Regulators in der Expression der <i>gat</i> -Gene	140
4.2.4	DNA-CRP-Komplex aktiviert die Expression der <i>gat</i> -Gene	142
4.2.5	Modell des Regulationsmechanismus des <i>gat</i> -Genclusters durch GatR und CRP	143
5	LITERATURVERZEICHNIS	147
6	ANHANG	167
6.1	Danksagung	203
6.2	Vorveröffentlichungen	205
6.3	Eidesstattliche Erklärung	206

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Modell der Pathogenese von <i>S. Typhimurium</i>	7
Abb. 1.2: Mikrobielle Habitats im menschlichen Gastrointestinal-Trakt.....	9
Abb. 1.3: Mechanismen der Kolonisierungsresistenz.	12
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Aufnahme von Mannitol, Glukose und Mannose mittels PTS.	17
Abb. 3.1: Vom Darmbakterium hin zum Salmonellen-Transkriptom.....	64
Abb. 3.2: Aufreinigung von ST4/74 aus einem Bakteriengemisch im Darminhalt einer Maus.....	67
Abb. 3.3: Wachstumsverhalten von <i>S. Typhimurium</i> $\Delta invA$ in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten.	68
Abb. 3.4: Experimentelles Design des <i>in vivo</i> Mäusversuches.....	69
Abb. 3.5: Gewicht der Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit und der Diät.	70
Abb. 3.6: Infektionsdosis von ST4/74 $\Delta invA$ in der Maus.....	71
Abb. 3.7: Salmonellenbelastung <i>in vivo</i> 24 h nach der Infektion.....	72
Abb. 3.8: Vielfältigkeit der bakteriellen Mikrobiota bei Mäusen in Abhängigkeit von der Mäusediät. 73	
Abb. 3.9: Zusammensetzung der Bakterienphyla im Mäusedarm abhängig von der Diät.....	74
Abb. 3.10: Zusammensetzung der Bakterienklassen im Mäusedarm abhängig von der Diät.	75
Abb. 3.11: Vielfältigkeit der Mikrobiota bei Mäusen 24 h nach der Streptomycinbehandlung.	78
Abb. 3.12: Unterschiede im Vorkommen einzelner Phyla vor und nach Streptomycinbehandlung (Western-Diät).....	79
Abb. 3.13: Unterschiede im Vorkommen einzelner Phyla vor und nach Streptomycinbehandlung (pflanzliche Diät).....	80
Abb. 3.14: Streptomycinabhängige Zusammensetzung der Bakterienphyla im Mäusedarm.....	81
Abb. 3.15: Streptomycinabhängige Zusammensetzung der Bakterienklassen im Mäusedarm.....	82
Abb. 3.16: Vielfältigkeit der intestinalen bakteriellen Mikrobiota bei Mäusen 24 h nach einer Salmonelleninfektion.	84
Abb. 3.17: Zusammensetzung der Bakterienphyla im Mäusedarm nach einer Salmonelleninfektion. 85	
Abb. 3.18: Zusammensetzung der Bakterienklassen im Mäusedarm nach einer Salmonelleninfektion.	86
Abb. 3.19: Fragmentgrößenbestimmung der cDNA-Bibliotheken.	90
Abb. 3.20: Schematischer Aufbau des genomischen Bereichs <i>gatY-gatR</i>	95
Abb. 3.21: Wachstum von <i>S. bongori</i> , <i>S. Newport</i> , <i>S. Enteritidis</i> und <i>S. 4,[5],12:i-</i> in M9+Galaktitol. .	99
Abb. 3.22: Wachstum von <i>S. bongori</i> und <i>S. Enteritidis</i> in M9+Tagatose.....	100
Abb. 3.23: Wachstumsstudien verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9 mit 1 % Galaktitol.101	

Abb. 3.24: Wachstumsstudien verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9-Medium mit 1 % D-Tagatose.	102
Abb. 3.25: <i>gfp</i> -basierte Promotoraktivität von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in M9 mit Galaktitol (Fluoreszenz).	103
Abb. 3.26: <i>lux</i> -basierte Promotoraktivität von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in M9 mit Galaktitol (Lumineszenz).	104
Abb. 3.27: Transkriptionsprofil des genomischen Bereichs <i>gatY-gatR</i> in ST4/74.....	105
Abb. 3.28: Einfluss von CRP auf das Wachstum von ST4/74 in M9 + Galaktitol.	106
Abb. 3.29: Bindungsfähigkeit des CRP-Proteins an die Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}	107
Abb. 3.30: Positionen der CRP-Bindungssequenzen.	108
Abb. 3.31: Domänenstruktur des GatR-Proteins.....	108
Abb. 3.32: Promotoraktivität von P_{rpsM} in M9-Medium mit Galaktitol (Fluoreszenz) in Abhängigkeit der Proteine GatR bzw. ReiD.	110
Abb. 3.33: GatR-Einfluss auf die Promotoraktivität von P_{gatR} in der stationären Phase.	111
Abb. 3.34: Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an die Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}	112
Abb. 3.35: Quantifizierung der DNA-Bindungsfähigkeit von GatR und CRP mittels SPR-Spektroskopie.	114
Abb. 3.36: Western Blot mit aufgereinigtem GatR-Protein.	115
Abb. 3.37: Hypothetisches Model der Funktion des Genbereichs STM3779-3785.	116
Abb. 3.38: Wachstumsverhalten der Mutanten im M9-Medium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle.	117
Abb. 3.39: Venn-Diagramm der Verstoffwechslungsfähigkeit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen von <i>S. Typhimurium</i> LT2 und ST4/74.....	118
Abb. 3.40: Metabolische Aktivität von Wildtyp und SPI3(III)-Mutante unter anaeroben Bedingungen.	119
Abb. 3.41: Metabolische Aktivität von Wildtyp und SPI3(III)-Mutante unter aeroben Bedingung. ...	120
Abb. 3.42: Optische Dichte verschiedener Stämme bei Anwesenheit von Desoxyribose.	121
Abb. 3.43: Optische Dichte verschiedener Stämme bei Anwesenheit von D-Glucosamin.	121
Abb. 3.44: Kompetitiver Index von ST4/74 WT und Δ SPI3(III).	122
Abb. 3.45: Wachstum der Mutante und des Wildtyps in SPENT-Medium.....	123
Abb. 3.46: Wachstumsrate unter kompetitiven Bedingungen im SPENT-Medium.	124
Abb. 3.47: Wachstumsanalyse des Wildtyps und der SPI3(III)-Mutante im mit Gallensalzen versetzten Darminhalt.....	124
Abb. 4.1: Modell des Galaktitol- und Tagatose-spezifischen PTS.	138
Abb. 4.2: D-Tagatose-Diabetes-Modell.	140

Abb. 4.3: Sequenz-Logo der putativen GatR-Consensus-Bindungssequenz.	141
Abb. 4.4: Promotorbereiche mit GatR und CRP-Bindungsstellen.	143
Abb. 4.5: Regulationsmechanismus des <i>gat</i> -Genclusters.	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Charakteristika der Pathogenitätsinseln SPI-1 bis SPI-10 in <i>Salmonella</i>	4
Tab. 2.1: Verwendete Antibiotika	21
Tab. 2.2: PCR-Mastermix	31
Tab. 2.3: PCR-Programm	32
Tab. 2.4: In der Arbeit verwendete Restriktionsenzyme.....	34
Tab. 2.5: Zusammensetzung der experimentellen Diäten	58
Tab. 3.1: Bakterienanzahl vor und nach der immunomagnetischen Auftrennung mit verschiedenen Antikörpern.	65
Tab. 3.2: Absolute und relative Anzahl der gewonnenen Salmonellen aus dem Darminhalt der Maus.	66
Tab. 3.3: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakterienfamilien.	76
Tab. 3.4: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakteriengattungen.....	77
Tab. 3.5: Anzahl der sequenzierten <i>Reads</i> bei den streptomycinbehandelten Proben.....	78
Tab. 3.6: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakterienfamilien nach Streptomycinbehandlung.	83
Tab. 3.7: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakteriengattungen nach einer Streptomycinbehandlung.....	83
Tab. 3.8: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakterienfamilien nach einer Salmonelleninfektion.	87
Tab. 3.9: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakteriengattungen nach einer Salmonelleninfektion.	87
Tab. 3.10: RNA-Menge der einzelnen Darminhaltsproben.....	89
Tab. 3.11: Gene, die einen Diät-abhängigen Unterschied in ihrer Expressionsstärke aufwiesen.....	92
Tab. 3.12: Genbezeichnungen und hypothetische Funktionen der kodierenden Proteine.....	97
Tab. 3.13: : Quantifizierung der Promotoraktivitäten von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in Abhängigkeit von GatR.....	109
Tab. 3.14: Organisation und Eigenschaften der Gene des SPI3(III)-Lokus aus ST4/74.....	116
Tab. 4.1: Prozentualer Anteil der vier dominierende Phyla in der Mikrobiota.....	128

Abkürzungsverzeichnis

S. Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ASP	Säureschockprotein (<i>acid shock protein</i>)
ATR	Säure-Toleranz-Antwort (<i>acid tolerance response</i>)
BF-Gruppe	Gruppe mit Kindern aus Burkina Faso
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
Bprom	Programm zur Vorhersage von bakteriellen Promotoren (<i>bacterial promoter prediction</i>)
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ca.	circa
cAMP	zyklisches AMP
cDNA	komplementäre DNA
Cm	Chloramphenicol
CRP/CAP	<i>cAMP receptor protein / catabolite activator protein</i>
DeoR-Familie	Deoxyribose-Nucleosid-Repressor-Familie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Gelmobilitätsstudie (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
EU-Gruppe	Gruppe mit europäischen Kindern
FDR	<i>false discovery rate</i>
FU	<i>fluorescence unit</i>
g/v	Gramm/Volumen (<i>gram/volume</i>)
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
HF-Diät	Fetteiche Diät (<i>high fat diet</i>)
HTH-Motiv	Helix-turn-Helix-Motiv
IMAC	Metall-Affinitätschromatographie
IMNGS	<i>integrated microbial NGS platform</i>
IMS	Immunomagnetische Auftrennung (<i>immunomagnetic separation</i>)
IVC	<i>Individually Ventilated Cages</i>
IVIS	Bildgebendes System für Biolumineszenz und Fluoreszenz
k_a	Assoziationskonstante
Kan	Kanamycin
KbE/cfu	Koloniebildende Einheiten / <i>colony-forming units</i>
K_D	Affinität

X | Abkürzungsverzeichnis

k_d	Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Marker
M9-Medium	Minimal-Medium
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Mittelwert
NaI	Nalidixin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OTU	<i>operational taxonomic unit</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pD	pflanzliche Diät
<i>pef</i>	<i>plasmid encoded fimbriae</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
Psp-System	Phagenschockprotein-Systeme
PTS	Phosphotransferase System
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
RLU	relative Lichteinheit
R _{max}	Maximale Antwort (SPR)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SAP	Alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SCV	<i>Salmonella containing vesicles</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIF	<i>Salmonella induced filaments</i>
SOC-Medium	Transformationsmedium (<i>super optimal broth with catabolite repression</i>)
SPF	<i>specific-pathogen free</i>
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitäts-Insel
SPR-Spektroskopie	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
Strep	Streptomycin
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
T6SS	Typ-6-Sekretionssystem
TBS	Tris-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin

Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
VAP	<i>vacuole-associated actin polymerization</i>
w/v	Masse/Volumen (<i>weight/volume</i>)
WD	Western-Diät

Physikalische Größen

Da	Dalton
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
T	Temperatur
U	Unit

Zusammenfassung

Vertreter des Genus *Salmonella* sind Verursacher der Salmonellose, einer Magen-Darm-Erkrankung, die über kontaminierte Nahrungsmittel übertragen wird. Für eine erfolgreiche Kolonisierung des terminalen Ileums und des Kolons müssen Salmonellen die residierenden Mikroorganismen überwachsen. Krankheit, die Einnahme von Antibiotikum oder ein Ernährungswechsel können zu einer Änderung in der Zusammensetzung der Mikrobiota führen. Dies wiederum kann es enterischen Pathogenen ermöglichen, die Kolonisierungsresistenz der Mikrobiota zu überwinden und dadurch erfolgreich den Darm zu besiedeln. Über die Substrate, deren spezifische Nutzung den Salmonellen das Überwinden der Kolonisierungsresistenz erlaubt, und die daraus resultierende transkriptionelle Antwort des Pathogens ist noch wenig bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Diät-abhängige bakterielle Zusammensetzung des Mäusedarms und die Auswirkungen der jeweiligen Diät auf das Expressionsmuster des Stammes *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) ST4/74 untersucht. Für die Transkriptomanalyse wurde eine neue Methode etabliert, die es ermöglichte, den Stamm ST4/74 aus nicht keimfreien Mäusen zu isolieren. So konnte erstmals das Transkriptom einer Salmonelle in Anwesenheit einer Mikrobiota und in Abhängigkeit von der Wirtsernährung analysiert werden. Dabei zeigte sich mittels 16S rRNA Analyse, dass die Darm-Mikrobiota von pflanzlich ernährten Mäusen eine höhere Diversität aufwies als die Mikrobiota einer Gruppe, die eine zucker- und fettreiche Western-Diät erhielt. Nach einer zweiwöchigen Fütterungsphase der beiden Diäten wurden die Mäuse mit *S. Typhimurium* ST4/74 infiziert, und 24 Stunden *post infectionem* erfolgte die Keimzahlbestimmung der Salmonellen im Kot. Es stellte sich heraus, dass die Diäten keinen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit von *S. Typhimurium* ST4/74 hatten. Allerdings konnte ein Effekt der Diäten auf das Transkriptom von Salmonellen nachgewiesen werden. Insgesamt konnten 66 Gene identifiziert werden, deren Expression abhängig von der jeweiligen Diät war, wobei nach der Infektion von pflanzlich ernährten Mäusen vor allem metabolisch aktive Gene in *S. Typhimurium* ST4/74 hochreguliert waren. Zu diesen gehörten auch vier Gene, die Teil eines Genbereichs sind, welches für ein Galaktitol-spezifisches PTS kodiert und im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit im Detail charakterisiert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Genbereich für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Galaktitol und D-Tagatose verantwortlich ist und einer Regulation durch das CRP-Protein und den GatR-Repressor unterliegt. Die Bindungsaffinitäten des GatR- und CRP-Proteins zu drei identifizierten Promotoren innerhalb dieses Genbereichs konnten mittels SPR-Spektroskopie quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde somit erfolgreich das Salmonellen-Transkriptom sowohl in Anwesenheit einer residierenden Mikrobiota als auch in Abhängigkeit verschiedener Ernährungsweisen untersucht, wodurch sich neue Einblicke in das komplexe Zusammenspiel zwischen der Mikrobiota, der Nährstoffverfügbarkeit und der Kolonisierungsfähigkeit von Salmonellen ergaben.

Summary

Representatives of the genus *Salmonella* are the cause of salmonellosis, a gastrointestinal disease transmitted through contaminated food. For a successful colonization of the terminal ileum and the colon *Salmonella* needs to overgrow intestinal microorganisms. Diseases, antibiotic treatment or a change in diet can lead to a change in the composition of the microbiota. Conversely, this may enable enteric pathogens to overcome colonization resistance triggered by the microbiota and thus to successfully colonize the gut. Little has been known about the substrates that are used by *Salmonella* to overcome colonization resistance, and about the resulting transcriptional response of the pathogen. In the first part of this work, the diet-dependent composition of the bacterial microbiota and the impact of specific diets on the gene expression pattern of *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) strain ST4/74 were analyzed. A new method was established that allowed the isolation of strain ST4/74 from non-germ free mice. This new method allowed for the first time the analysis of the *Salmonella* transcriptome in the presence of a residing microbiota and in dependency of two different diets. 16S rRNA analysis revealed a higher microbiota diversity of the mice group with a vegetarian diet in comparison with the group that was fed a Western diet rich in sugar and fat. After a feeding period of two weeks, mice were infected with *S. Typhimurium* ST4/74, and microbial counts in the feces were determined 24 hours post infection. At this time point neither of the diets had influenced the ability of *S. Typhimurium* ST4/74 to colonize the gut. However, the diets had an impact on the transcriptome of *S. Typhimurium* ST4/74. A total of 66 genes were identified to be expressed in a diet-dependent way. Noticeable, infection of the mice group fed a vegetarian diet specifically resulted in an expression of metabolically active genes in *S. Typhimurium* ST4/74. Four of these genes are part of a galactitol-specific phosphotransferase system, which was characterized in more detail in the second part of this thesis. It was demonstrated that the *gat* gene cluster is responsible for the uptake and metabolization of galactitol and D-tagatose and that it is regulated by the two regulator proteins CRP and GatR. Finally, the binding affinity of GatR and CRP to all three identified promoters in the gene cluster was quantified via SPR-spectroscopy. In this work, the transcriptome of *Salmonella* was analyzed in the presence of a resident microbiota as well as in dependence of different diets, providing new insights into a complex interaction between the microbiota, the nutrient availability and the colonization ability of *Salmonella*.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Salmonella*

1.1.1 Hintergrund und Charakteristika

Eine erstmalige Beschreibung des Typhus-Erregers erfolgte im Jahr 1880 durch Karl Joseph Eberth, als er stäbchenförmige Bakterien in histologischen Präparaten, u.a. den Lymphknoten, von an *Typhus abdominalis*-erkrankten Patienten identifizieren konnte (Eberth, 1880). Dieser Befund wurde im Jahr 1881 von Robert Koch bestätigt (Koch, 1881), wobei eine erste Kultivierung dieser Bakterien erst drei Jahre später gelang (Gaffky, 1884). Infolge der erfolgreichen Isolation des Erregers der Schweinecholera, welcher zunächst *Salmonella choleraesuis* benannt und schließlich in *Salmonella enterica* umgeändert wurde, definierten Daniel Elmer Salmon und Theobald Smith die Salmonellen erstmals als eine eigene Gattung (Schultz, 2008).

Bis etwa 1907 war man der Überzeugung, dass Salmonellen über kontaminiertes Wasser übertragen werden. Diese Annahme erwies sich als falsch, da man im selben Jahr die erste gesunde, asymptomatische Salmonellen-Trägerin identifizieren konnte. Es handelte sich dabei um die auf Long Island lebende Köchin Mary Mallon, die als Typhus-Mary weltweit bekannt wurde (Marineli *et al.*, 2013). Da sie nicht bereit war ihre Arbeit als Köchin aufzugeben, musste sie bis zu ihrem Tod im Jahr 1938 in Isolation im Riverside Hospital für übertragbare Krankheiten auf der North Brother Island leben (Brooks, 1996). Sie gilt als Hauptverursacherin eines Krankheitsausbruchs im Jahr 1907 in New York, bei dem etwa 3.000 Menschen an *S. Typhi* erkrankten (Marineli *et al.*, 2013).

Bei der Gattung *Salmonella* handelt es sich um Gram negative, fakultativ anaerobe Bakterien, welche eine stäbchenförmige Form aufweisen und aufgrund ihrer flagellenartigen Fortsätze beweglich sind. Sie zählen zur Familie der *Enterobacteriaceae*, haben einen Durchmesser von ca. 0,7-1,5 µm und eine Länge von 2-5 µm (Murray and Microbiology, 1999). Der letzte gemeinsame Vorfahre mit dem *E. coli*-Bakterium existierte vermutlich vor etwa 120-160 Millionen Jahren (Wray and Wray, 2000). Eines der auffälligsten Merkmale, in denen sich die beiden Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* unterscheiden, ist eine nicht intakte 23S rRNA innerhalb der *Salmonella*-Gattung (Winkler, 1979). Die durch intervenierende Sequenzen fragmentierte 23S rRNA kommt in allen *Salmonella*-Spezies und Subspezies vor, sowie in den Gattungen *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Yersinia* (Burgin *et al.*, 1990, Pronk and Sanderson, 2001).

Die Gattung *Salmonella* lässt sich in die zwei Spezies *S. bongori* und *S. enterica* unterteilen. Letztere besteht wiederum aus sechs Subspezies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) und *S. enterica* subsp. *indica* (VI). Die Subspezies von *S. enterica* werden mit Hilfe ihrer Antigene in

Serovar-Typen differenziert, von denen heutzutage mehr als 2.500 bekannt sind. *S. enterica* subsp. *enterica* ist dabei für fast alle Salmonellen-Infektionen in endothermen Tieren, u.a. dem Menschen, verantwortlich. (Agbaje *et al.*, 2011, Su and Chiu, 2007, Tindall *et al.*, 2005, Brenner *et al.*, 2000).

1.1.2 Epidemiologie und Übertragung

Lebensmittel gelten als eine der häufigsten Quellen für schwere Erkrankungen. Alleine im Jahr 2010 gab es weltweit etwa 600 Millionen Krankheitsfälle, die durch kontaminierte Lebensmittel verursacht wurden. Als dritthäufigster Erreger war dabei die Gattung *Salmonella* für ca. 88 Millionen Krankheitsfälle verantwortlich, die mit ca. 78 Millionen Erkrankungen und 59.000 Todesfällen die Salmonellose als häufigstes Krankheitsbild hervorrief. Mit Ausnahme von *S. Typhi* und *S. Paratyphi* bedingen alle Serovar-Typen des Bakteriums *S. enterica* subsp. *enterica* eine Salmonellose (Havelaar *et al.*, 2015). Die häufigsten Verursacher der Salmonellose sind jedoch die beiden Serovar-Typen *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. Innerhalb der Europäischen Union gab es im Jahr 2014 ca. 89.000 gemeldete Erkrankungen, wobei die Mortalität dabei mit 65 bestätigten Todesfällen unter 1 % lag. Von den weltweit erkrankten Patienten waren in Deutschland etwa 16.000 Menschen betroffen. Obwohl in den letzten Jahren innerhalb der EU eine Abnahme der Krankheitsfälle beobachtet werden konnte, war die Gattung *Salmonella* im Jahr 2014 mit 20,0 % nach den Viren immer noch für die zweithöchste Anzahl an lebensmittelbedingten Ausbrüchen verantwortlich (European Food Safety Authority, 2015). Dokumentierte Ausbrüche verschiedener *Salmonella* Serovar-Typen fanden im Vereinigten Königreich, Canada, Australien, Irland, USA oder Pakistan statt (O'Brien, 2013, Tighe *et al.*, 2012, Khan *et al.*, 2012, Majowicz *et al.*, 2010, Miller *et al.*, 2008, Scallan *et al.*, 2005). Der herkömmliche Übertragungsweg von Salmonellen erfolgt üblicherweise durch kontaminierte Nahrung, ist aber auch durch Kontakt zu infizierten Tieren möglich. Die durchschnittliche Infektionsdosis liegt dabei bei etwa 10^6 Bakterien, wobei bei einem zeitgleichen Konsum von Nahrungsmitteln auch geringere Mengen (< 100 Zellen) ausreichend sein können (Waterman and Small, 1998). *S. Typhimurium* verursacht beim Menschen die sogenannte nicht-typhöse Salmonellose, die von Symptomen wie Erbrechen, Durchfall und Abdominalschmerzen begleitet wird (Layton and Galyov, 2007, Blaser and Newman, 1982, Mastroeni and Grant, 2011).

1.1.3 *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPIs)

Pathogenitätsinseln sind 10-200 kb große Bereiche im Genom von Pathogenen, die für eine Vielzahl von Virulenzgenen kodieren und meist im Genom stromabwärts eines *tRNA*-Gens liegen (Schmidt and Hensel, 2004). In Salmonellen werden solche Genbereiche als *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPIs) bezeichnet. Bis heute konnten insgesamt 23 SPIs identifiziert werden (Tab. 1.1 und Anhang Tabelle A 6). Für die Virulenz von *S. Typhimurium* sind hauptsächlich fünf SPIs (SPI-1 bis SPI-5) von

Bedeutung (Fabrega and Vila, 2013). Eine Auflistung der ersten zehn SPIs der Gattung *Salmonella* und deren Charakteristika findet sich in Tab. 1.1.

1.1.4 Weitere Virulenzfaktoren

Neben den chromosomal-kodierten Pathogenitätsinseln besitzen Salmonellen auch episomale Elemente, die für die Virulenz entscheidend sind, z.B. das pST-Plasmid. Dieses Plasmid kommt hauptsächlich in Serovar-Typen vor, die eine nicht-typhöse Erkrankung hervorrufen. In *S. Typhimurium* ist es ca. 90 kb groß und beinhaltet unter anderem das *spv*-Operon und die *pef* (*plasmid encoded fimbriae*; Plasmid-kodierende Fimbrien) Gene (Rotger and Casadesus, 1999). Letztere sind in der späten Phase der Infektion bei der Adhäsion an Epithelzellen ausschlaggebend. Das *spv*-Operon kodiert fünf Gene, unter anderem das Gen *spvB*. Dieses kodiert ein zytotoxisches Protein, das Aktin modifizieren kann und dadurch dessen Polymerisierung blockiert. Ein auf diesem Operon kodierender Effektor (SpvC) spielt eine Rolle bei der Verzögerung der Immunantwort (Mazurkiewicz *et al.*, 2008). Manche *S. Typhimurium*-Stämme besitzen ein modifiziertes pST-Plasmid (pUO-StVR2), welches zusätzlich noch Resistenzgene u.a. gegen die Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Spectinomycin, Sulfonamide und Tetrazyklin integriert hat (Herrero *et al.*, 2008).

Für die Virulenz von Bedeutung sind zusätzlich verschiedene Adhäsine, wobei im *S. Typhimurium*-Genom insgesamt 13 Fimbrien-Loci ausfindig gemacht werden konnten (McClelland *et al.*, 2001). Diese Fimbrien (z.B. Typ-I-Fimbrien oder Curli-Fimbrien) erlauben die Adhäsion von Salmonellen an spezifische Epithelzellen, was eine Auswirkung auf die intestinale Flüssigkeitsansammlung (Bäumler *et al.*, 1996), die intestinale Persistenz von Salmonellen in der Maus (Weening *et al.*, 2005) oder die Ausbildung von Biofilmen hat (Austin *et al.*, 1998). Des Weiteren besitzt *S. Typhimurium* noch Flagellen, deren Funktion in der Beweglichkeit und Chemotaxis des Bakteriums liegt (Chilcott and Hughes, 2000).

4 | Einleitung

Tab. 1.1: Charakteristika der Pathogenitätsinseln SPI-1 bis SPI-10 in *Salmonella*. Aufgelistet sind die ersten 10 Pathogenitätsinseln (SPI-1 bis SPI-10) innerhalb der Gattung *Salmonella*. Angegeben ist jeweils die Länge der Pathogenitätsinsel in kb, der GC-Gehalt (%), der Insertionspunkt im Genom, die Verbreitung und (mögliche) Virulenz-assoziierte Funktion in der *Salmonella*-Gattung. Eine Übersicht der SPI-Inseln kann aus folgenden Quellen entnommen werden: (Hensel, 2004, Amavisit *et al.*, 2003, Fabrega and Vila, 2013). Tabelle modifiziert von (Hensel, 2004) mit Erlaubnis von Elsevier.

	Länge [kb]	GC-Gehalt [%]	Insertionspunkt	Verbreitung	Funktion	Referenz
SPI-1	39,8	47,0	<i>flhA-mutS</i>	<i>Salmonella spp.</i>	Invasion in Epithelzellen	(Mills <i>et al.</i> , 1995, Galan, 2001, Que <i>et al.</i> , 2013, Bäumler, 1997)
SPI-2	39,7	44,6	tRNA <i>vaIV</i>	<i>S. enterica</i>	Überleben in Makrophagen	(Shea <i>et al.</i> , 1996, Hensel <i>et al.</i> , 1999b, Galan, 2001, Abrahams and Hensel, 2006, Andrews-Polymenis <i>et al.</i> , 2010)
SPI-3(I)	17,3	47,3	tRNA <i>selC</i>	<i>Salmonella spp.</i>	Mg ²⁺ -Aufnahme	(Blanc-Potard and Groisman, 1997, McClelland <i>et al.</i> , 2001, Retamal <i>et al.</i> , 2009, Blanc-Potard <i>et al.</i> , 1999)
SPI-4	27,0	44,8	(tRNA ähnlich)	<i>Salmonella spp.</i>	T1SS, <i>siIE</i>	(Wong <i>et al.</i> , 1998, Kiss <i>et al.</i> , 2007, Morgan <i>et al.</i> , 2004, Morgan <i>et al.</i> , 2007)
SPI-5	7,6	43,6	tRNA <i>serT</i>	<i>Salmonella spp.</i>	T3SS-Effektoren	(Knodler <i>et al.</i> , 2002)
SPI-6	59,0	51,5	tRNA <i>aspV</i>	subsp. I, Teile in IIIB, IV, VII	T6SS, Fimbrien	(Parkhill <i>et al.</i> , 2001, Sana <i>et al.</i> , 2016)
SPI-7	133,0	49,7	tRNA <i>pheU</i>	subsp. I Serovare	Vi-Antigen, <i>sopE</i> , Pilus Assemblierung	(Parkhill <i>et al.</i> , 2001, Seth-Smith, 2008, Pickard <i>et al.</i> , 2003, Faucher <i>et al.</i> , 2005)
SPI-8	6,8	38,1	tRNA <i>pheV</i>	subsp. I Serovare	unbekannt	(Parkhill <i>et al.</i> , 2001, Faucher <i>et al.</i> , 2005)
SPI-9	16,3	56,7	prophage	subsp. I Serovare	unbekannt	(Parkhill <i>et al.</i> , 2001, Velasquez <i>et al.</i> , 2016)
SPI-10	32,8	46,6	tRNA <i>leuX</i>	subsp. I Serovare	Sef Fimbrien	(Parkhill <i>et al.</i> , 2001, Shah <i>et al.</i> , 2005, Saroj <i>et al.</i> , 2008)

1.1.5 *Salmonella Typhimurium* als Krankheitserreger - Pathogenese und zelluläre Grundlagen

Beim herkömmlichen Übertragungsweg gelangen die Salmonellen mittels der Nahrung in ihren Wirt und sind zunächst dem geringen pH-Wert im Magen ausgesetzt. Das Überleben von *S. Typhimurium* unter extrem sauren Bedingungen erfolgt durch die Induktion einer Säuren-Toleranz-Antwort (ATR; *acid tolerance response*). Dabei werden pH Homöostase-Systeme aktiviert, Säureschockproteine (ASP; *acid shock proteins*) synthetisiert und die Membranzusammensetzung modifiziert (Alvarez-Ordóñez, 2011, Audia *et al.*, 2001, Rychlik and Barrow, 2005). Haben die pathogenen Bakterien dieses Hindernis überwunden, gelangen sie in den Darm, wo sie weiteren Stressfaktoren, z.B. der Gallenflüssigkeit, dem osmotischen Schock, den anaeroben Bedingungen, der Anwesenheit von antimikrobiellen Peptiden und der kommensalen Mikrobiota (siehe Abschnitt 1.2.4), ausgesetzt sind. *S. Typhimurium* hat verschiedene Strategien gegen diese Stressfaktoren entwickelt. So erreicht das Bakterium eine Toleranz gegen Gallensäure durch das Einsetzen von Efflux-Pumpen (z.B. AcrAB), Zweikomponentensystemen (z.B. PhoQP), Regulatoren (z.B. marRAB Operon), DNA-Reparatur-Proteinen und das Synthetisieren von Proteinen, die für den Erhalt der Membranintegrität verantwortlich sind (Baucheron *et al.*, 2014, Prouty *et al.*, 2004b, Prouty *et al.*, 2004a, Antunes *et al.*, 2011a, Begley *et al.*, 2005). Auf die hohen Salzkonzentrationen von ca. 0,3 M NaCl im Darm reagiert *S. Typhimurium* mit einem biphasischen Verlauf, indem es zuerst Kaliumionen (K⁺) aufnimmt, wodurch es dann in einer zweiten Phase zur Aufnahme von kompatiblen Soluten kommt, die einen Schutz gegen den osmotischen Stress liefern (Sleator and Hill, 2002, Frymier *et al.*, 1997). Durch den extrem geringen durchschnittlichen Sauerstoffgehalt im Darmlumen des Caecums (< 1 mmHg) sind die Bakterien dazu gezwungen, auf den anaeroben Stoffwechsel umzuschalten (Albenberg *et al.*, 2014). In *S. Typhimurium* sind für den Wechsel vom aeroben zum anaeroben Metabolismus der Regulator Fnr und das Zweikomponentensystem ArcAB zuständig (Rychlik and Barrow, 2005, Bowden *et al.*, 2010). Das Protein ArcA zeigt unter anaeroben Bedingungen seine höchste Aktivität (Sevcik *et al.*, 2001) und bewirkt dabei unter anderem die Expression der beiden Operons *cob* und *pdu*, die für die Synthese und Verstoffwechslung von Cobalamin und Propandiol zuständig sind (Ailion *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1994). Unter Anwesenheit von Cobalamin, welches nur unter anaeroben Bedingungen *de novo* gebildet werden kann, und dem Elektronenakzeptor Tetrathionat kann Propandiol verstoffwechselt werden (Price-Carter *et al.*, 2001). Die Gene, die für die Tetrathionat-Atmung zuständig sind, werden dabei von dem Fnr-Protein reguliert (Hensel *et al.*, 1999a). ArcAB und Fnr ermöglichen *S. Typhimurium* somit ein schnelles Umschalten auf die anaeroben Bedingungen und die Nutzung neuer Energiequellen unter diesen veränderten Bedingungen. Die im Darm vorkommenden antimikrobiellen Peptide sind Teil des angeborenen Immunsystems, die eine weitere Barriere gegen eindringende Bakterien bilden. Für die Resistenz gegen antimikrobielle Peptide ist der

alternative Sigmafaktor σ^E von Bedeutung, da er die Expression alternativer Elektrontransportwege fördert, welche den Protonengradienten erhalten (Crouch *et al.*, 2005).

Erreicht *S. Typhimurium* die intestinale Mucusschicht, so durchdringt es diese mit Hilfe von Effektor-Proteinen und verschiedenen Fimbrien-Typen, z.B. Typ 1-Fimbrien und SPI-10-kodierenden Sef-Fimbrien (Shah *et al.*, 2005, Saroj *et al.*, 2008). Danach kann *S. Typhimurium* an die Epithelzellen adhären, wobei es bevorzugt an M-Zellen, spezielle Epithelzellen, welche die Peyer-Plaques überdecken, bindet. Die Adhäsion erfolgt unter anderem mit Hilfe des SPI-4-kodierenden SiiE-Adhäsins (Morgan *et al.*, 2007) oder eines Fibronektin-bindenden Autotransporters MisL, dessen Gen *misL* auf der SPI-3 lokalisiert ist (Blanc-Potard and Groisman, 1997, Blanc-Potard *et al.*, 1999). Durch das gezielte Einschleusen von SPI-1- und SPI-5-Effektoren in die Wirtszelle über das Typ-3-Sekretionssystem (T3SS-1) der SPI-1, erfolgt eine Umstrukturierung des Wirt-Cytoskeletts, wodurch *S. Typhimurium* von der Epithelzelle aufgenommen wird. Dieser Invasionsprozess ist im Wesentlichen abhängig von der SPI-1. Diese Insel beinhaltet etwa 40 Gene und kodiert neben dem bereits genannten T3SS-1 noch Regulatorproteine, Effektoren und Chaperone (Mills *et al.*, 1995, Galan, 2001, Fabrega and Vila, 2013, Que *et al.*, 2013). Da die SPI-1 in der gesamten Gattung *Salmonella* vorzufinden ist, geht man davon aus, dass die Insel vor etwa 50-100 Mio. Jahren, und somit noch vor der evolutionären Aufspaltung von *S. bongori* und *S. enterica*, in das Genom integriert wurde (Bäumler, 1997).

In den Epithelzellen liegen die Salmonellen in Vesikeln (SCV, *Salmonella-containing vacuoles*) vor. Mittels Effektoren, die über das T3SS-2 der SPI-2 ausgeschleust werden, wird eine Verschmelzung der SCVs mit den Lysosomen des Wirts und eine Aufnahme von antimikrobiellen Wirtsfaktoren verhindert und somit das Überleben in der Wirtszelle ermöglicht (Hensel *et al.*, 1999b, Galan, 2001, Hensel, 2004, Abrahams and Hensel, 2006, Andrews-Polymenis *et al.*, 2010). Neben dem T3SS-2 beinhaltet die SPI-2 auch noch Gene, die für Chaperone, Regulatoren und Effektoren kodieren und einem für die Respiration von Tetrathionat zuständigen Gencluster (Details siehe 1.3.1). Die SPI-2 ist ausschließlich in *S. enterica* zu finden, so dass deren Aufnahme mittels horizontalen Gentransfers zeitlich später als die der SPI-1 stattgefunden hat (Hensel, 2000, Fabrega and Vila, 2013). Durch das Verhindern einer Verschmelzung der SCVs mit den Lysosomen kann sich *S. Typhimurium* ungestört innerhalb der Vakuolen vermehren. Einige Stunden nach der Aufnahme in die Epithelzellen kommt es zur Polymerisierung des Aktins an den SCVs (VAP; *vacuole-associated actin polymerization*), das für den Erhalt und die Stabilität der SCV-Membran notwendig ist. Anschließend migrieren die SCVs durch die Ausbildung von Filamenten (SIF; *Salmonella induced filaments*) in Richtung der Submukosa. Nach der Freisetzung in diese Gewebsschicht wird *S. Typhimurium* von Phagozyten, in denen sie wie in den Epithelzellen innerhalb von SCVs überleben und sich vermehren können, aufgenommen. Eine

systemische Salmonellen-Infektion basiert auf diesen infizierten Phagozyten, die sich über die Lymphflüssigkeit und den Blutstrom im Wirtskörper verteilen (siehe Abb. 1.1; Übersicht in folgenden Publikationen: (Fabrega and Vila, 2013), (Mastroeni and Grant, 2011), (Andrews-Polymenis *et al.*, 2010) und (Santos *et al.*, 2009)).

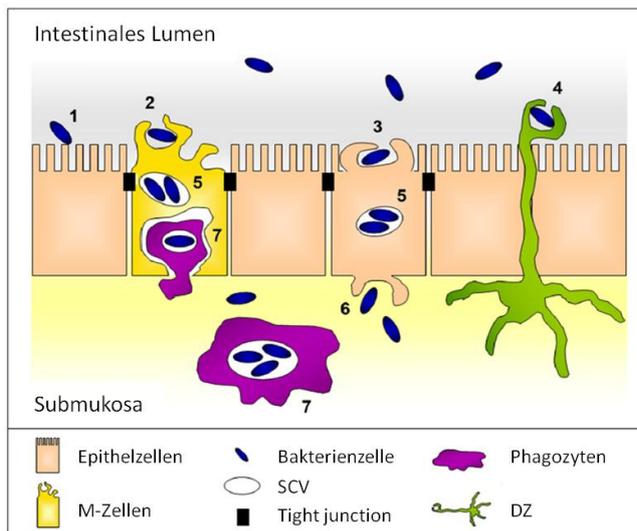


Abb. 1.1: Modell der Pathogenese von *S. Typhimurium*. (1) Das Bakterium adhärirt mit Hilfe von Adhäsinen, die unter anderem auf der SPI-3 und der SPI-4 kodiert vorliegen, an das intestinale Epithelium. (2+3) Mit Hilfe von verschiedenen Virulenzfaktoren der SPI-1 und SPI-5 wird *S. Typhimurium* im nächsten Schritt von den Epithelzellen mittels Phagozytose aufgenommen. (5) In den Epithelzellen sind die Pathogene in der Lage in SCVs zu überleben und sich zu replizieren. Wichtige Faktoren für diesen Prozess liegen dabei auf der SPI-5 und dem pSLT Plasmid. (6) In den SCVs wandern die Bakterien Richtung basolaterale Membran und werden in die Submukosa freigesetzt. (4) Salmonellen können im Darm auch direkt von Dendritischen Zellen phagozytiert werden, wodurch sie in die Submukosa gelangen. (7) In der unteren Gewebsschicht, der Submukosa, wird *S. Typhimurium* von Phagozyten aufgenommen, in welchen es erneut in SCVs überlebt. Wichtig sind hierfür die SPI-2, die SPI-3 und das pSLT Plasmid. Mit Hilfe der infizierten Phagozyten können sich die Bakterien über die Lymphflüssigkeit und dem Blutstrom systemisch ausbreiten. Quelle: (Fabrega and Vila, 2013), modifiziert, mit Erlaubnis der BMJ Publishing Group und ASM.

1.2 Interaktion von Pathogenen mit der Mikrobiota

1.2.1 Intestinales Mikrobiom

Der Mensch beherbergt mit rund 100 Billionen Mikroorganismen, von denen sich annäherungsweise 70 Billionen im Gastrointestinal-Trakt befinden und die sogenannte Darm-Mikrobiota bilden, etwa zehnmal mehr Mikroorganismen als eigene Körperzellen (Luckey, 1972, Whitman *et al.*, 1998). Eine aktuelle Publikation korrigiert allerdings die Anzahl der körpereigenen Bakterien auf etwa 39 Billionen, wodurch der Mensch nun in etwa so viele Bakterien wie eigene Körperzellen besitzt (Sender *et al.*, 2016). Vor der Geburt gilt der Gastrointestinal-Trakt des Fötus mit einer vernachlässigbaren Menge an Bakterien als steril und wird bei der Geburt mit den ersten, meist aerotoleranten, Kolonisierern besiedelt. Abhängig von dem Geburtsvorgang stammen diese entweder von der vaginalen Mikrobiota bei einer natürlichen Geburt oder im Falle eines Kaiserschnitts von der Haut-Mikrobiota der Mutter ab (Huurre *et al.*, 2008). Bei letzterem zeigte sich in der Mikrobiota eine geringere Anzahl an *Bifidobacteria* und eine stärkere humorale Immunantwort des Babys, was auf einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems hindeuten könnte (Huurre *et al.*, 2008). In den ersten Lebensjahren nimmt die bakterielle Vielfalt im Darm zu, wobei die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota abhängig ist von der Ernährungsweise des Kindes, der Chemikalienbelastung und der Entwicklung des Immunsystems (Penders *et al.*, 2006, Sjogren *et al.*, 2009). Im erwachsenen Menschen ist die Darm-Mikrobiota relativ stabil (Faith *et al.*, 2013) und kann in etwa 500-1000 Bakterienspezies unterteilt werden (Sekirov *et al.*, 2010), wobei in einem gesunden Menschen die beiden Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* dominieren (Bäckhed *et al.*, 2005, Eckburg *et al.*, 2005, Human_Microbiome_Project_Consortium, 2012). Die Darm-Mikrobiota weist in Abhängigkeit des jeweiligen Darm-Abschnitts eine unterschiedliche Zusammensetzung auf (Abb. 1.2). So findet sich im Caecum und dem hinterem Bereich des Dickdarms die höchste Dichte und größte Diversität an Bakterien, wobei es sich hier hauptsächlich um fermentative, Polysaccharid-abbauende Anaerobier handelt (siehe Abb. 1.2).

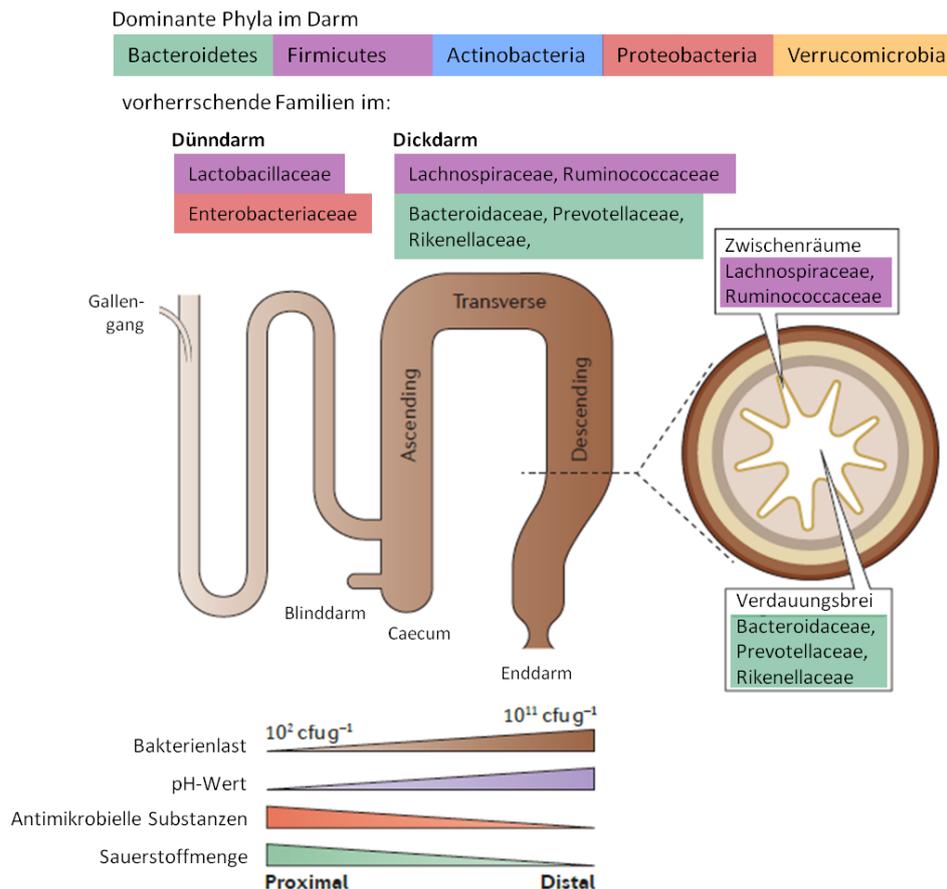


Abb. 1.2: Mikrobielle Habitate im menschlichen Gastrointestinal-Trakt. Im Darm auftretende dominante Phyla sind *Bacteroidetes* (grün), *Firmicutes* (lila), *Actinobacteria* (blau), *Proteobacteria* (rot) und *Verrucomicrobia* (orange). Zwischen den einzelnen Bereichen des Darms (Dünndarm und Dickdarm) bestehen physiologische Unterschiede. So sinkt die Sauerstoffmenge, der Gallensalzgehalt und die Konzentration an antimikrobiellen Substanzen zum distalen Darmende ab, wohingegen der pH-Wert und die in cfu (*colony-forming units*)-angegebene Bakterienlast steigt. Diese Unterschiede üben einen Einfluss auf die Anwesenheit spezieller Bakterienfamilien aus. So dominieren im Dünndarm die Bakterienfamilien *Lactobacillaceae* und *Enterobacteriaceae*, im Dickdarm die Familien *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* (die Farben entsprechen dem jeweils zugehörigen und übergeordneten Phylum). Im Querschnitt des hinteren Dickdarms zeigt sich, dass Bakterienfamilien des Phylums *Bacteroidetes* im Verdauungsbrei dominant vorliegen, und das Phylum *Firmicutes* in den Bereichen zwischen den Falten des Magen-Darm-Traktes (Zwischenräume). Quelle: (Donaldson *et al.*, 2016), modifiziert mit Erlaubnis der Nature Reviews Publishing Group.

Die Stabilität und Zusammensetzung der Mikrobiota im erwachsenen Menschen kann durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden. Dazu zählt neben der Antibiotikaeinnahme (Clemente *et al.*, 2012) und der Genetik des Wirts (Nicholson *et al.*, 2012) auch das Alter und die Geographie (Greenhalgh *et al.*, 2016, Yatsunenکو *et al.*, 2012, Costello *et al.*, 2009). Den größten Einfluss übt aber die Ernährungsweise auf die Zusammensetzung der Mikrobiota aus (Turnbaugh *et al.*, 2009, Carlisle *et al.*, 2013, Scott *et al.*, 2013, Brinkworth *et al.*, 2009).

Um die Auswirkungen der Ernährung auf die Mikrobiota detaillierter zu untersuchen, wurde in einer Studie die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota zweier Gruppen verglichen, die sich stark in ihrer Ernährungsweise unterschieden. Die erste Gruppe bestand aus Kindern, die aus einem Dorf in Burkina Faso in Afrika stammten, und überwiegend vegetarisch ernährt wurden. Zum Vergleich bildeten Kinder aus Italien, deren Ernährungsweise geprägt war von einfachem Zucker und großen Mengen an Fleisch, die zweite Gruppe. Es konnte gezeigt werden, dass in der ersten Gruppe in der

Darm-Mikrobiota das Phylum *Bacteroidetes* dominierte, wohingegen in der zweiten Gruppe das Phylum *Firmicutes* die höchste Prävalenz zeigte (De Filippo *et al.*, 2010). Weitere Studien konnten beweisen, dass eine fettreiche Ernährung einen Einfluss auf die Mikrobiota und deren Diversität in der Maus hat (Daniel *et al.*, 2014, Sonnenburg and Sonnenburg, 2014) und dadurch auch das Wachstum von pathogenen Bakterien gefördert werden kann (Agus *et al.*, 2016). Ebenso können bereits einzelne Wirkstoffe oder Nahrungsmittel wie z.B. die Weizenkleie oder die Kiwi einen Einfluss auf das Wachstum von speziellen Bakterien der Darm-Mikrobiota ausüben (Duncan *et al.*, 2016, Parkar *et al.*, 2012). Letztendlich kann es bei einer einseitigen Ernährung über mehrere Generationen hinweg zu einem deutlichen Verlust in der Bakterienvielfalt kommen (Sonnenburg *et al.*, 2016, Sonnenburg and Sonnenburg, 2014). Eine veränderte Zusammensetzung der Mikrobiota wird häufig auch mit verschiedenen Krankheiten assoziiert (Sekirov *et al.*, 2010), darunter die Fettleibigkeit (Ohtani *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014, Turnbaugh *et al.*, 2008, Turnbaugh *et al.*, 2006, Ley *et al.*, 2005), Allergien (Hormansperger *et al.*, 2012, Noverr and Huffnagle, 2005), Diabetes (Larsen *et al.*, 2010) und entzündliche Darmerkrankungen (Neuman and Nanau, 2012).

1.2.2 Funktion der Mikrobiota

Der Mikrobiota im Darm werden vier Hauptfunktionen zugeordnet, nämlich eine metabolische, eine trophische, eine immunologische und eine schützende Funktion (McKenney and Pamer, 2015). In ihrer metabolischen Rolle fermentiert sie vom Wirt unverdauliche Kohlenhydrate wie komplexe Polysaccharide oder Alkohole (Flint *et al.*, 2012, Koropatkin *et al.*, 2012). Da sich im menschlichen Proteom nur etwa 17 Glykosid-Hydrolasen und keine Polysaccharid-Lyasen finden, verfügt der Mensch über ein deutlich geringeres Repertoire an abbauenden Enzymen als eine Modell-Mikrobiota aus etwa 160 Spezies, die über etwa 9000 Glykosid-Hydrolasen und 2000 Polysaccharid-Lyasen besitzt (El Kaoutari *et al.*, 2013). Insgesamt konnten bisher 130 Glykosid-Hydrolase-, 22 Polysaccharid-Lyase- und 16 Kohlenhydrat-Esterase-Familien identifiziert werden, von denen die meisten in mikrobiellen Genomen kodiert vorliegen (Cantarel *et al.*, 2009). Durch diese Vielfalt an Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen ist die Mikrobiota in der Lage, Polysaccharide wie Cellulose, Xylan, Mannan oder Pectin abzubauen. Bei der Verstoffwechslung entstehen hierbei meist die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Butyrat und Propionat, die vom Wirt absorbiert werden können (Wong *et al.*, 2006). Werden diese Endprodukte von dem Wirt nicht als eine zusätzliche Energiezufuhr verwendet (Bergman, 1990), so können sie ihre regulatorischen Funktionen ausüben, z.B. in der Regulierung der Acetylierung der Histone (Davie, 2003), in Signalwegen über G-Proteingekoppelte Rezeptoren (Brown *et al.*, 2003) oder in der Homöostase von regulatorischen T-Zellen (Smith *et al.*, 2013). Zusätzlich spielt die Mikrobiota eine wichtige Rolle bei der Vitaminsynthese, wie z.B. B₁₂ (Kräutler, 2005, Yatsunenko *et al.*, 2012). Das Vitamin B₁₂, auch bekannt als Cobalamin, ist essentiell für den Menschen, kann aber nicht von diesem selbst synthetisiert werden (Nielsen *et al.*,

2012). Die Fähigkeit der Mikrobiota dieses Vitamin herzustellen (Martens *et al.*, 2002), kann daher sehr nützlich sein, ist jedoch ohne zusätzliche Aufnahme über die Nahrung nicht ausreichend, da auch pathogene Bakterien Cobalamin nutzen (Ailion *et al.*, 1993, Price-Carter *et al.*, 2001, Srikumar and Fuchs, 2011). Die Mikrobiota hat in ihrer trophischen Funktion einen Einfluss auf das Zellwachstum und die Differenzierung der Epithelzellen, ebenso wie auf die Zusammensetzung des mit dem Darm assoziierten Lymphgewebes, das Teil des Immunsystems ist (Guarner and Malagelada, 2003). So inhibiert das von der Mikrobiota-produzierte Butyrat beispielsweise die Zellproliferation und stimuliert stattdessen die Zelldifferenzierung von Epithelzellen (Siavoshian *et al.*, 2000, Kruh *et al.*, 1994). Ein weiterer Effekt der Darm-Mikrobiota ist die Stimulation des Immunsystems des Wirts. CD4⁺-T-Zellen werden dabei durch ein Polysaccharid des Bakteriums *Bacteroides fragilis* aktiviert, was zur Cytokin-Produktion und damit zur Reifung der Immunsystemzellen führt (Mazmanian *et al.*, 2005). Ebenso können einige kommensale Bakterien die Entwicklung von anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen beeinflussen (Atarashi *et al.*, 2013). Zu guter Letzt bieten residierende Bakterien der Mikrobiota einen Schutz vor der Kolonisierung pathogener Bakterien (Kolonisierungsresistenz, siehe 1.2.3) und können die Invasion von Pathogenen in Wirtszellen verhindern (Stecher and Hardt, 2011).

1.2.3 Kolonisierungsresistenz

Bei der Kolonisierungsresistenz handelt es sich um die Fähigkeit der Darm-Mikrobiota den Wirt vor einer von Pathogenen-verursachten Infektion zu schützen (Stecher *et al.*, 2013a). Dieses Phänomen wurde 1962 zum ersten Mal erwähnt, als gezeigt werden konnte, dass die Vorbehandlung der Maus mit Streptomycin zu einer verringerten Infektionsdosis von *S. Enteritidis* führte (Bohnhoff and Miller, 1962). Einige Jahre später konnte der Nachweis erbracht werden, dass anaerobe Bakterien im Darm den Wirt vor der Kolonisierung von Pathogenen (u.a. *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) schützen und es wurde der Begriff Kolonisierungsresistenz eingeführt (van der Waaij *et al.*, 1971). Auch im Falle von *S. Typhimurium* führt eine Antibiotikabehandlung zu einer erhöhten Sensitivität des Wirts gegenüber dem Bakterium und dadurch zu einer verstärkten Infektion (Sekirov *et al.*, 2008). Insgesamt gibt es vier Faktoren, die mit zur Kolonisierungsresistenz beitragen: (I) die direkte Bakterien-Inhibierung, (II) den Erhalt der Mucus-Barriere, (III) die Stimulation des Immunsystems und (IV) die Verstoffwechslung von limitierenden Nährstoffen (siehe Abb. 1.3). Die direkte Inhibierung der Bakterien erfolgt hierbei über die Produktion von antimikrobiellen Peptiden, z.B. Bacteriocinen, oder durch die Freisetzung von hemmenden Metaboliten, z.B. Acetat und Butyrat, die das direkte Wachstum von Pathogenen verhindern können (Stecher and Hardt, 2011). Zusätzlich regulieren die kommensalen Bakterien im Darm die Dicke und Festigkeit der Mucus-Schicht. Antibiotika-Behandlungen oder bereits eine Änderung der Wirts-

Ernährung können zu einer Veränderung in der Dicke der Mucus-Schicht führen (Wlodarska *et al.*, 2011, Earle *et al.*, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass bereits bakterielle Produkte ausreichend sind, die Mucus-Synthese zu stimulieren (Johansson *et al.*, 2015). Defekte Mucus-Schichten, die eine erhöhte Permeabilität aufweisen, führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen Colitis (Johansson *et al.*, 2014). Indem kommensale Bakterien die Mucus-Produktion anregen, erschweren sie die Kontaktbildung von den darunterliegenden Epithelzellen mit Pathogenen (McKenney and Pamer, 2015). Ein weiterer Nebeneffekt der Darm-Mikrobiota ist die natürliche Stimulation des Immunsystems des Wirts. So fördern z.B. Bakterien des *Clostridia*-Clusters XIVa die Entwicklung von anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen (Atarashi *et al.*, 2013). Weitere kommensale Bakterien können CD4⁺-T-Zellen aktivieren und Cytokin-Produktion fördern (Mazmanian *et al.*, 2005). Indem Bakterien der Mikrobiota Rezeptoren des angeborenen Immunsystems stimulieren, kommt es zu einer gesteigerten Expression von bakteriziden C-Typ-Lektinen durch Epithelzellen, wodurch das Wachstum von Bakterien gehemmt werden kann (Vaishnava *et al.*, 2011). Eine weitere auf Kompetitivität beruhende Schutzfunktion kann über den Nährstoffverbrauch erfolgen. Dabei führt die Diversität der normalen Mikrobiota zu einer fast vollständigen Verwertung aller Ressourcen, wodurch den aufgenommenen pathogenen Bakterien keine Nährstoffquellen zu Verfügung stehen und sich daher nicht vermehren können (McKenney and Pamer, 2015, Stecher and Hardt, 2011, Kamada *et al.*, 2013, Stecher *et al.*, 2013a).

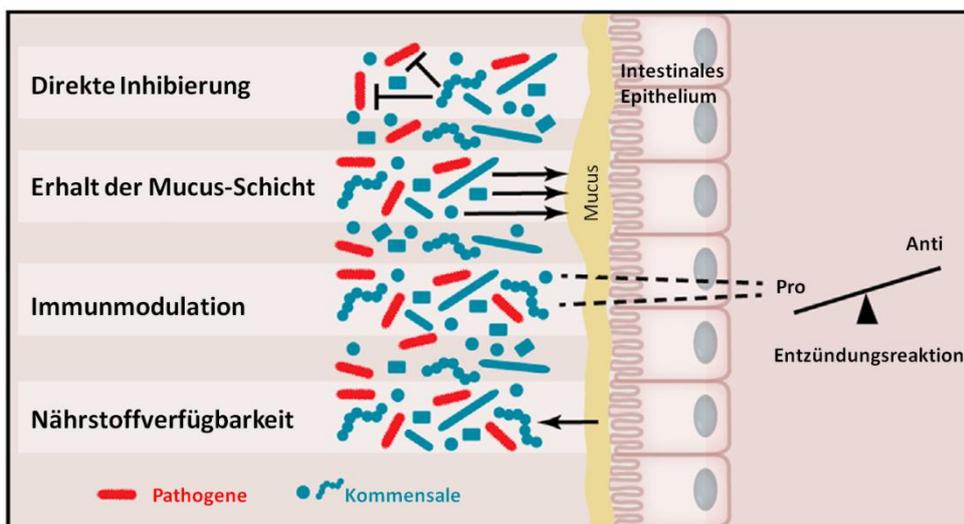


Abb. 1.3: Mechanismen der Kolonisierungsresistenz. Die Mikrobiota des Darms verfügt über vier verschiedene Funktionen, die zur Kolonisierungsresistenz beitragen. (1) Die direkte Inhibition erfolgt durch die Synthese von toxischen Komponenten von benachbarten Bakterien. (2) Durch den Erhalt der als Barriere-dienenden Mucus-Schicht erschwert die Mikrobiota invasive Bakterien, die dahinterliegenden Epithelzellen zu erreichen. (3) Durch die Regulierung der Immunantwort, können Pathogene frühzeitig eliminiert werden. (4) Die effiziente Verringerung des Nährstoffangebots in der Umgebung, wie z.B. Polysaccharide, durch die Kommensalen limitiert die Ausbreitung von weniger gut angepassten Bakterien. Quelle: (McKenney and Pamer, 2015), modifiziert, mit Erlaubnis von Elsevier.

1.2.4 Kolonisierung von Pathogenen im Darm

Zur Überwindung der Kolonisierungsresistenz und erfolgreichen Besiedelung des Darms haben pathogene Bakterien verschiedene Strategien entwickelt. So findet in dem *E. coli*-Bakterium im Laufe einer erfolgreichen Kolonisierung des Wirts eine Anhäufung von Mutationen statt, die es dem Bakterium ermöglichen, alternative Kohlenstoffquellen zu erschließen und effizient neue Nischen zu besetzen (Giraud *et al.*, 2001). Ebenso besitzt *S. Typhimurium* innerhalb der SPI-6 ein Typ-6-Sekretionssystem (T6SS), durch das eine antibakterielle Amidase in kommensale Bakterien eingeschleust werden kann und diese zur Lyse bringt, wodurch sich die Salmonellen einen Vorteil in der Kolonisierung des Darms verschaffen (Sana *et al.*, 2016). Neben dieser antibakteriellen Amidase produziert *S. Typhimurium* auch das toxische Colicin Ib, welches durch Porenbildung in der inneren Membran nah verwandte Bakterien, wie z.B. kommensale *E. coli*-Stämme, abtötet (Nedialkova *et al.*, 2014). Eine weitere, jedoch gegensätzliche Strategie sich gegen andere Bakterien durchzusetzen ist das gezielte Hervorrufen einer Immunreaktion (Stecher *et al.*, 2013a, Stecher *et al.*, 2013b). Durch die erhöhte Widerstandsfähigkeit vieler Pathogener gegenüber der angeborenen Immunantwort, können sie sich unter diesen Bedingungen einen Wachstumsvorteil verschaffen. So weisen Salmonellen im Gegensatz zu den kommensalen Bakterien eine Resistenz gegen das antimikrobiell-wirkende Lektin RegIII β auf, welches bei einer Salmonellen-Infektion verstärkt vom Wirt produziert und im Darm freigesetzt wird (Stelter *et al.*, 2011). Eine Entzündungsreaktion im Darm kann auch zu einem starken Anstieg an horizontalem Gentransfer innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* führen, was die Verbreitung von Fitness-, Virulenz- und Antibiotika-Resistenz-Genen unterstützt (Stecher *et al.*, 2012). *S. Typhimurium* ist zusätzlich sogar in der Lage aufgrund einer Entzündungsreaktion Tetrathionat als einen neuen Elektronenakzeptor zu nutzen (Winter *et al.*, 2010). Wie bereits erwähnt, besitzt die Pathogenitätsinsel SPI-2 neben den T3SS-2 kodierenden noch weitere, für den Abbau von Tetrathionat zuständige Gene (Hensel *et al.*, 1999a). Aufgrund der Abwesenheit von Tetrathionat im Darm wurde lange Zeit angenommen, dass dieser Genbereich keine Rolle in der Virulenz von *Salmonella* spielt (Hensel *et al.*, 1999b). Erst 2010 konnte ein komplexer Mechanismus identifiziert werden, der eine Verbindung zur Virulenz herstellen konnte. Hierbei produziert die Mikrobiota Schwefelwasserstoff als Stoffwechselendprodukt, welches eine toxische Substanz für den Wirt darstellt. Als Gegenmaßnahme wandelt die intestinale Mucosa daher diese Substanz in nicht-toxisches Thiosulfat um. Kommt es durch die Infektion von *Salmonella* zu einer Entzündungsreaktion, so gelangen Phagozyten in den Darm und setzen zur Abwehr u.a. reaktive Sauerstoffspezies frei. Diese wiederum gehen mit dem Thiosulfat eine chemische Reaktion ein, wodurch Tetrathionat als Endprodukt entsteht. Das Tetrathionat kann schließlich von den Salmonellen als alternativer Elektronakzeptor verwendet werden, wodurch sich das Bakterium einen Wachstumsvorteil gegenüber der restlichen Mikrobiota verschafft (Winter *et al.*, 2010).

1.3 Metabolismus als Virulenzfaktor

Die erfolgreiche Vermehrung von Bakterien im Wirt ist abhängig von der Verfügbarkeit notwendiger Nährstoffe. Das Beziehen dieser essentiellen Energiequellen stellt während der Infektion für pathogene Bakterien allerdings eine Herausforderung dar, da die Abwehr des Wirts den Zugang zu essentiellen Nährstoffen, wie z.B. Eisen, einschränkt (Abu Kwaik and Bumann, 2013). Pathogene haben daher hocheffiziente Strategien entwickelt, die dem Nährstoffentzug entgegenwirken (Winter *et al.*, 2010, Steeb *et al.*, 2013). So produziert beispielsweise *Salmonella* das Eisen-bindende Siderophor Salmochelin, welches resistent gegen den Abbau durch Lipocalin-2 ist. Das vom Wirt produzierte Lipocalin-2 inaktiviert während einer Entzündungsreaktion die anderen bakteriellen Siderophore. Dadurch verschafft sich *Salmonella* einen kompetitiven Vorteil gegenüber der Mikrobiota, da es einen effizienteren Zugang zum essentiellen Eisen besitzt (Raffatellu and Bäumlner, 2010). Die Fähigkeit, neue metabolische Nischen zu erschließen, verschafft den pathogenen Bakterien ebenfalls einen Wachstumsvorteil. Diese neuen metabolischen Stoffwechselwege sind meist, wie z.B. das Tetrathionat-Gencluster, auf Pathogenitätsinseln lokalisiert (Hensel *et al.*, 1999a, Schmidt and Hensel, 2004, Winter *et al.*, 2010). Ebenso verschafft die Fähigkeit, Sialinsäuren zu verstoffwechseln, dem Bakterium *Vibrio cholerae* einen Vorteil in der Kolonisierung des Intestinal-Trakts (McDonald *et al.*, 2016). Ein weiterer, im Magen verfügbarer Nährstoff ist Urea, der von dem Bakterium *Helicobacter pylori* mittels einer Nickel-Transporter-abhängigen Urease in Ammoniak umgewandelt werden kann. Diese Urease-Aktivität ermöglicht den Erhalt des Protonengradienten und ist essentiell für die Kolonisierung des Wirts (Nolan *et al.*, 2002). *Campylobacter jejuni*, welches aufgrund fehlender glykolytischer Phosphat-Fruktose-Kinasen keine Zucker als Kohlenstoffquellen verwerten kann, bezieht seine Energie hauptsächlich über freie Amino- und Ketosäuren. Bereits durch minimale genetische Veränderungen im Genom des Pathogens können neue Substrate als Kohlenstoffquellen verwendet werden, die eine Kolonisierung spezieller Wirts-Gewebe ermöglichen (Hofreuter *et al.*, 2008).

1.3.1 Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen als Überlebensstrategie im Darm

Da im Darm eine hohe Nährstoffkonkurrenz zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien herrscht, sind Pathogene dazu gezwungen, sich metabolische Nischen zu suchen, die ihnen genügend Energie zum Überleben und Replizieren liefern (Fuchs *et al.*, 2012). Dabei ist die zeitlich angepasste und differenzierte Regulation der Expression von metabolischen und Virulenz-Genen notwendig, damit das pathogene Bakterium die Mikrobiota überwachsen kann. So konkurriert der pathogene enterohämorrhagische *E. coli* EHEC O157:H7 im Darm in der Anwesenheit von kommensalen *E. coli*-Stämmen nicht um die reichlich vorkommende Kohlenstoffquelle Fucose, sondern verstoffwechselt alternative Zucker, wie z.B. Mannose (Fabich *et al.*, 2008). Durch die zeitgleiche niedrige Expression

von Virulenzgenen ist es dem Pathogen möglich, sich in dieser Nische erfolgreich gegen die Mikrobiota durchzusetzen. Erst beim Erreichen der Epithelzelloberfläche werden die Virulenzgene in einem Quorum Sensing-abhängigem Prozess aktiviert und die Infektion kann voranschreiten (Pacheco *et al.*, 2012). Ebenso erfolgt die Nutzung alternativer Substrate durch Stoffwechselwege, die in avirulenten Stämmen häufig nicht vorkommen. So sind z.B. pathogene *E. coli*-Stämme in der Lage, die Substanz Deoxyribose zu verstoffwechseln, was ihnen einen Wachstumsvorteil während der intestinalen Kolonisierung verschafft (Martinez-Jehanne *et al.*, 2009). Des Weiteren sind Salmonellen in der Lage das im Darm vorkommende *myo*-Inositol zu verstoffwechseln. Zuständig für den Abbau von *myo*-Inositol sind die *iol*-Gene, die auf einer 22,6 kb genomischen Insel (GEI4417-4436) liegen (Kröger and Fuchs, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die *iol*-Gene notwendig sind für die Darm-Kolonisierung von Huhn, Schwein, Rind und Maus (Chaudhuri *et al.*, 2013).

Das in Lebensmitteln als Stabilisator, Füllstoff und Konservierungsmittel vorkommende Maltodextrin fördert das Überleben und die mukosale Kolonisierung von *S. Typhimurium* (Nickerson *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu vermittelt der Mineralstoff Calcium und dessen Salze eine erhöhte intestinale Resistenz gegenüber *S. Enteritidis*-Infektionen (Ten Bruggencate *et al.*, 2011). Die Nährstoffzusammensetzung im Darm hat somit maßgeblich Einfluss auf die Virulenz von pathogenen Bakterien und deren Infektiosität. Auf genetischer Ebene zeigt sich eine Verbindung zwischen Metabolismus und der Virulenz von pathogenen Bakterien darin, dass einige Virulenzgene, z.B. *hapR* in *Vibrio cholerae*, der Kontrolle der Katabolitrepression unterliegen (Poncet *et al.*, 2009, Görke and Stulke, 2008), bzw. metabolisch-aktive Regulatoren, wie z.B. das Cra-Protein in *Shigella flexneri*, die Expression von Virulenzgenen beeinflussen können (Dong and Schellhorn, 2010, Gore and Payne, 2010). Doch nicht nur ein breites Spektrum an alternativen Kohlenstoffquellen, auch die Wahl des Elektronenakzeptors kann für die Kolonisierung bedeutend sein. So führt die Nutzung von Fumarat, Nitrat und Tetrathionat (siehe 1.2.4) als alternative Elektronenakzeptoren zu einem Wachstumsvorteil der pathogenen Bakterien (Guccione *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2011, Winter and Bäumlner, 2011).

In den nächsten drei Abschnitten wird beispielhaft die Nutzung von drei alternativen Kohlenstoffquellen und deren Auswirkung auf das Wachstum von Kommensalen und Pathogenen im Darm detailliert beschrieben.

1.3.2 Der Mucus als Nährstoffquelle

Der Gastrointestinal-Trakt ist mit einer Mucusschicht ummantelt, die im Magen und Dickdarm einen zweischichtigen Aufbau aufweist. Die untere Schicht steht in direktem Kontakt zu den Epithelzellen und hat eine Dicke von 50-200 µm. Die darüber liegende Schicht hat eine lockerere Struktur und dient als Nische für Bakterien (Hansson, 2012). Der Mucus besteht größtenteils aus Wasser und

Glykoproteinen, sogenannte Mucine. Insgesamt gibt es mehr als 100 verschiedene Mucin-Oligosaccharide (Robbe *et al.*, 2004), wobei Hexosamine wie N-Acetyl-Glucosamin und Zucker wie Mannose, Galaktose, Fucose und Glukose in die Kohlenhydratkette des Mucins eingebaut sind. Ist ein Bakterium in der Lage, diese Kohlenhydrate enzymatisch abzuspalten, so kann er diese Bausteine als Nährstoffquelle nutzen (Staib and Fuchs, 2014). Terminale Kohlenhydrate sind unter anderem der Zucker L-Fucose und die Sialinsäure N-Acetyl-Neuraminsäure. Das pathogene Bakterium *Vibrio cholerae* ist in der Lage diese Sialinsäure enzymatisch vom Mucin abzuspalten und zu verstoffwechseln, wobei eine Mutation im Sialinsäure-spezifische Transporter zu einer attenuierten Kolonisierung in der Maus führt (McDonald *et al.*, 2016). Kommensale, wie z.B. *Bacteroides thetaiotaomicron* spalten mit Hilfe von Sialidasen die für sie nicht verstoffwechselbaren Sialinsäuren ab, um an die restlichen Kohlenhydrate im Mucus zu gelangen. Enteropathogene wie *Clostridium difficile* und *S. Typhimurium* machen sich dies zu Nutze, indem sie die so freigesetzten Sialinsäuren verwerten. *S. Typhimurium* selbst besitzt u.a. Gene für die Verstoffwechslung von L-Fucose zu 1,2-Propandiol, wobei deren Deletion ebenfalls zu einem attenuierten Phänotyp in der Maus führt (Ng *et al.*, 2013).

1.3.3 Verstoffwechslungsfähigkeit von 1,2-Propandiol

1,2-Propandiol ist ein Zwischenprodukt bei der Verstoffwechslung von L-Fucose oder L-Rhamnose. *E. coli* exkretiert 1,2-Propandiol während der Fucose-Fermentation aktiv aus der Zelle und liefert dadurch anderen Bakterien im Darm eine alternative Energiequelle (Cocks *et al.*, 1974). Für die Metabolisierung dieser Substanz benötigt *S. Typhimurium* die im *pdu*-Operon kodierenden Proteine, den Elektronenakzeptor Tetrathionat und den Cofaktor Cobalamin (Price-Carter *et al.*, 2001). Die Gene des *pdu*-Operons sind insofern essentiell für die Kolonisierung, da deren Expression beim Wachstum von *S. Typhimurium* in Makrophagen, Epithelzellen und im Darm von Hühnern hochreguliert ist und eine Deletion dieser Gene zu einem attenuierten Wachstum in Mausmakrophagen führt (Staib and Fuchs, 2014, Klumpp and Fuchs, 2007). Da auch die pathogenen Bakterien *Listeria*, *Clostridium*, *Shigella* und *Yersinia* in der Lage sind, 1,2-Propandiol zu verwerten, scheint dieser anaerobe Abbauweg einen allgemeinen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Bakterien, die nicht fähig sind solche Fermentationsendprodukte zu verstoffwechseln, zu schaffen.

1.3.4 Ethanolamin als Kohlenstoffquelle

Neben 1,2-Propandiol ist *S. Typhimurium* ebenso in der Lage Ethanolamin zu verstoffwechseln. Ethanolamin kommt neben der Nahrung auch in Bakterien und Epithelzellen vor, da Ethanolamin die polare Kopfgruppe im Phosphatidylethanolamin bildet. Letzteres ist ein Phospholipid, welches für die Bildung der Doppellipidschicht der Zellmembran zuständig ist. Ebenso wie bei 1,2-Propandiol ist für die Verstoffwechslung von Ethanolamin ein spezifisches Gencluster (*eut* Gene), der

Elektronenakzeptor Tetrathionat und der Cofaktor Cobalamin notwendig (Staub and Fuchs, 2014, Price-Carter *et al.*, 2001, Khan, 2014). Der Abbau von Ethanolamin erlaubt die verbesserte Proliferation der Bakterien im Darm, wobei die *eut* Gene in *S. Typhimurium* im Hühnerdarm hochreguliert sind (Harvey *et al.*, 2011). Deletionen in den *eut* Genen führen zu einer verminderten Kolonisierung von *S. Typhimurium* in Nematoden (Srikumar and Fuchs, 2011) und zu einem Wachstumsnachteil im Mäusedarm (Thiennimitr *et al.*, 2011). Interessanterweise kommt es im Mäusedarm nur im Zusammenhang mit einer entsprechenden Entzündungsreaktion zu einem Wachstumsvorteil durch die Ethanolamin-Verstoffwechslung.

1.3.5 Aufnahme von alternativen Kohlenstoffquellen durch Phosphotransferase-Systeme (PTS)

Ungefähr 3,2% aller Gene im Genom eines einzelnen Bakteriums kodieren für Proteine, die Komponenten in verschiedensten PTS darstellen (Saier *et al.*, 2005). Erstmalig beschrieben wurden PTS in *E. coli* im Jahr 1964 als eine Art neuartiges Zuckeraufnahmesystem, welches Phosphoenolpyruvat (PEP) als Energiequelle für die Phosphorylierung der Zucker verwendete (Kundig *et al.*, 1964). Proteine, die wichtige Funktionen im PTS einnehmen, sind EI, HPr, EIIA, EIIB und EIIC, wobei die drei letzteren (EIIA, B und C) entweder als Domänen oder einzelne Proteine vorliegen (Postma *et al.*, 1993).

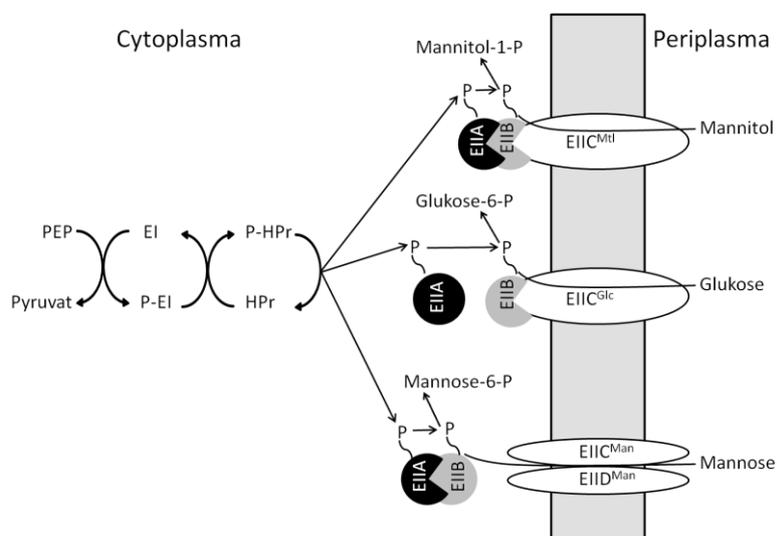


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Aufnahme von Mannitol, Glukose und Mannose mittels PTS. Die zwei Proteine EI und HPr gelten als universelle Proteine aller PTS. Ausgehend von dem Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP) wird das Protein EIIA über eine Phosphorylierungskaskade phosphoryliert. Das P~EIIA-Protein transferiert die Phosphatgruppe zum verwandten EIIB-Protein, welches daraufhin das Phosphat auf das Substrat überträgt. Das Substrat ist hierbei an das Membran-integrierte EIIC-Protein gebunden. Während des Prozesses wird das Substrat aus dem Periplasma ins Zytoplasma transportiert. EIIA, EIIB und EIIC (und EIID) sind jeweils spezifisch für einen speziellen Kohlenstoff. Gezeigt sind hier drei unterschiedliche EI-Proteine spezifisch für Mannitol (EIIA, EIIB, EIIC^{Mtl}), Glukose (EIIA, EIIB^{Glc}) und Mannose (EIIAB, EIIC^{Man}, EIID^{Man}). Dabei besitzt das Mannitol-spezifische PTS ein EIIB-Protein, das aus drei Domänen (EIIA, B und C) zusammengesetzt ist, das Glukose-spezifische PTS zwei EIIB-Proteine, EIIA und EIIB^{Glc} (aus zwei Domänen), und das Mannose-spezifische PTS die drei EIIB-Proteine EIIAB (aus zwei Domänen), EIIC und EIID. Die Abbildung wurde von (Postma *et al.*, 1993) übernommen und mit Erlaubnis von American Society for Microbiology (ASM) modifiziert.

In Anwesenheit von zweiwertigen Kationen und PEP wird das dimerische Protein EI phosphoryliert und überträgt die Phosphatgruppe auf das HPr Protein. Beide Proteine zählen zu den universellen PTS-Proteinen, da sie nicht substratspezifisch sind und speziell in *E. coli* und *S. Typhimurium* Teil verschiedener PTS sind. Das HPr Protein überträgt die Phosphatgruppe auf das EIIA Enzym. Die Enzyme EIIA, EIIB und EIIC sind spezifisch und können entweder als einzelne Proteine oder Domänen innerhalb eines Proteins vorliegen (Abb. 1.4). Eine Besonderheit stellt hierbei das Mannose-spezifische PTS dar, da hier noch ein weiteres, in die Membran integriertes Protein EIID vorhanden ist (Deutscher *et al.*, 2014, Postma *et al.*, 1993).

Die Hauptfunktion von PTS sind die Bindung, Aufnahme und die Phosphorylierung von Kohlenhydraten. Allerdings werden den Systemen noch weitere Funktionen zugeordnet, unter anderem (i) dem Transport von nicht PTS-Zucker (King and O'Brian, 2001), (ii) die Nettoproduktion von Kohlenstoffen und Energiespeicherquellen (Pries *et al.*, 1991), (iii) Wechsel zwischen Fermentation und Atmung (Koo *et al.*, 2004), (iv) in der Zellbeweglichkeit, (v) Pathogenität, (vi) Zellphysiologie, (vii) Zellteilung (Powell *et al.*, 1995) und (viii) in der Genexpression (Barabote and Saier, 2005, Deutscher *et al.*, 2014).

1.3.6 Aufnahme und Verstoffwechslung von Galaktitol

Galaktitol zählt neben Mannitol und Sorbitol zu einem der drei natürlich vorkommenden Zuckeralkohole, der erstmalig von Laurent aus der Dulcit-Manna Pflanze in Madagaskar isoliert wurde (Habermehl, 2008). Die Substanz ist Bestandteil von Algen, Pilzen und höheren Pflanzen (Nowitzki-Grimm *et al.*, 2015), wobei hier speziell in den *Celastraceae* (Spindelbaumgewächse), *Scrophulariaceae* (Braunwurzgewächse) und *Orobanchaceae* (Sommerwurzgewächse) (Lewis, 1984). Galaktitol kann als Kohlenstoffquelle von Bakterien genutzt werden und wird durch ein spezifisches PTS in die Zelle aufgenommen. Erstmals wurde die Aufnahme von Galaktitol in *E. coli* K12 beschrieben, wobei nur wenige K12-Stämme in der Lage sind, Galaktitol zu verwerten (Wolff and Kaplan, 1956, Lengeler, 1975a, Lengeler, 1975b). Zusätzlich zeigt sich in *E. coli* noch eine temperatursensitive Galaktitolverwertung, die nur unter 35 °C erfolgt (Lengeler, 1977). In *E. coli* wird Galaktitol über das EIIC^{Gat}-Protein in die Zelle transportiert, wobei es von EIIB phosphoryliert wird. Nach der Aufnahme wird Galaktitol-1-Phosphat von der GatD-Dehydrogenase in Tagatose-6-Phosphat umgewandelt (Nobelmann and Lengeler, 1995, Nobelmann and Lengeler, 1996). Durch eine weitere Phosphorylierung durch die Phosphofruktokinase PfkA entsteht in *E. coli* Tagatose-1,6-Bisphosphat, das durch eine Aldolase in GAP und DHAP umgewandelt wird und in die Glykolyse eingebracht werden kann (Brinkkötter *et al.*, 2002).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Gastrointestinal-Trakt des Menschen beherbergt etwa 70 Billionen Mikroorganismen, die in etwa 500-1000 Bakterienspezies unterteilt werden können. Zusammen bilden die Bakterien ein komplexes, dynamisches und hoch konkurrierendes Ökosystem. In den letzten zehn Jahren verbesserte sich aufgrund der Verwendungsmöglichkeit neuer Technologien, wie *next generation sequencing* (NGS), das Verständnis in den physiologischen und pathologischen Prozessen, die durch die kommensale Mikrobiota beeinflusst werden. Zudem gibt es vermehrt Anzeichen für eine direkte Korrelation zwischen einer veränderten Mikrobiota-Zusammensetzung und verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes oder Fettleibigkeit. Weitere Faktoren, die maßgeblich Einfluss haben, sind das Alter, Immunsystem und die Ernährung des Wirts. So zeigt die Darm-Mikrobiota von Jägern und Sammlern, bzw. Populationen, die eine traditionelle ackerbaugesellschaftliche Ernährung zu sich nehmen, eine höhere Artenvielfalt als die der westlichen Population. In einem gesunden Menschen bildet die Darmmikrobiota einen natürlichen Schutz gegen eindringende pathogene Bakterien. Diese Kolonisierungsresistenz kann unter anderem durch die Einnahme von Antibiotikum oder einem Ernährungswechsel aufgehoben werden, was eine Kolonisierung von enterischen Pathogenen, wie z.B. *S. Typhimurium*, begünstigt. Da im Gastrointestinal-Trakt eine starke Konkurrenz um Nährstoffe zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien herrscht, sind letztere gezwungen sich metabolische Nischen zu suchen, in denen sie überleben und replizieren können. Diese Strategie wird durch die Nutzung von alternativen Substraten als Kohlenstoffquelle erreicht, wodurch diese Keime meist über zusätzliche Stoffwechselwege, die in avirulenten Stämmen nicht vorkommen, verfügen. So sind unter anderem die Lebensmittel-Pathogene *S. Typhimurium*, *Clostridium difficile* und *Listeria monocytogenes* in der Lage, Substrate wie 1,2-Propandiol und Ethanolamin als Kohlenstoffquelle zu nutzen, wodurch sie sich gegenüber der nativen Mikrobiota einen Wachstumsvorteil verschaffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Ernährung des Wirtes auf die Pathogenität von Salmonellen untersucht werden, da die komplexen Wechselwirkungen, die bei der Ernährung zwischen Wirt, Mikrobiota und Pathogenen stattfinden, noch weitestgehend unverstanden sind. Dazu wurde zunächst der Einfluss zwei unterschiedlicher Diäten auf die Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota in einem *in vivo* Mausversuch untersucht. Parallel dazu wurde überprüft, inwiefern sich die Ernährung der Mäuse auf eine Salmonellen-Infektion und deren Transkriptom auswirkt.

Die Transkriptomanalyse trug dazu bei, Virulenzgene zu identifizieren, deren Expression in Abhängigkeit zu verabreichten Diäten stehen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Galaktitol-spezifisches Aufnahmesystem auf molekularer Ebene charakterisiert, wobei der Schwerpunkt auf der proteinchemischen Analyse des Regulatorproteins lag.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien (Anhang Tabelle A 1) werden größtenteils von den Unternehmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Zusätzlich werden Verbrauchsmaterialien (Anhang Tabelle A 2) bei der Firma VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) erworben. Geräte und Verbrauchsmaterialien speziell für die Tierhaltung werden hauptsächlich bei Tecniplast Deutschland GmbH (Hohenpeißenberg, Deutschland) gekauft und sind im Anhang Tabelle A 2 aufgelistet. Weitere eingesetzte Geräte und deren Herkunft können ebenfalls im Anhang Tabelle A 2 eingesehen werden. Verwendete molekularbiologische Kits stammen von den Unternehmen Stratec Biomedical AG (Birkenfeld, Deutschland) und Macherey-Nagel GmbH und Co. KG (Düren, Deutschland). Die Herstellung von Puffern und Medien erfolgt mit Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn, Deutschland). Die so gewonnenen Lösungen werden autoklaviert oder mittels Membranfilter (Millipore, Eschborn, Deutschland) sterilfiltriert.

2.1 Mikrobiologische Techniken

2.1.1 Bakterienstämme

Die verwendeten und hergestellten Bakterienstämme sind im Anhang Tabelle A 3 beigefügt.

2.1.2 Kulturbedingungen, Antibiotika und Medien

Die Bakterienstämme werden, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C entweder im Komplexmedium (*lysogeny broth*; LB) oder im Minimalmedium (M9) angezogen. Bei Bedarf werden Arabinose (Endkonzentration: 0,2 %) als Induktor oder Antibiotika (zur Selektion) zum Medium hinzugegeben. In Tab. 2.1 sind die hier verwendeten Antibiotika mit den jeweils gewählten Konzentrationen zusammen gestellt.

Tab. 2.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]	Hersteller
Ampicillin	Milli-Q	50	150	Roth
Chloramphenicol	100 % Ethanol	10	20	USB
Kanamycin	Milli-Q	50	50	Roth
Nalidixin	Milli-Q	10	20	Fluka
Streptomycin	Milli-Q	50	50	Sigma-Aldrich
Tetrazyklin	70 % Ethanol	12	12	Sigma-Aldrich

Als Kohlenstoffquelle im Minimalmedium dient entweder Glukose, Arabinose oder Galaktitol, wobei die Anzucht von Zellen in Galaktitol-haltigem Medium unter sauerstoffarmen Bedingungen (nicht geschüttelt) erfolgt. Bakterienzellen mit temperaturempfindlichen Plasmiden werden bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist wie folgt:

LB Medium (Bertani, 1951)	10 g	Trypton aus Casein
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1000 ml Milli-Q-Wasser autoklavieren (121 °C, 20 min)	
M9 Medium - Standard (Sambrook and Russell, 2001)	440 ml	Milli-Q-Wasser (steril)
	50 ml	10-fach M9 Salze
	5 ml	20 % (w/v) Glukose bzw. 20 % (w/v) Arabinose bzw. 20 % (w/v) Fruktose
	1 ml	1 M MgSO ₄
	50 µl	1 M CaCl ₂
M9 Medium mit Galaktitol (Sambrook and Russell, 2001)	280 ml	Milli-Q-Wasser (steril)
	50 ml	10-fach M9 Salze
	167 ml	3 % (w/v) Galaktitol
	1 ml	1 M MgSO ₄
	50 µl	1 M CaCl ₂
10-fach M9 Salze (Sambrook and Russell, 2001)	70 g	Na ₂ HPO ₄
	30 g	KH ₂ PO ₄
	5 g	NaCl
	10 g	NH ₄ Cl
	ad 1000 ml Milli-Q-Wasser sterilfiltrieren	

Da Galaktitol als Zuckeralkohol nur eine maximale Löslichkeit von 31 g/l in Wasser besitzt (3,1 %), wird eine 3 %ige Galaktitol-Stammlösung vorgefertigt. Zusätzlich muss man bei der Herstellung des M9 Mediums beachten, dass alle Komponenten einzeln sterilfiltriert bzw. autoklaviert werden. Bei der Herstellung von Agar wird dem Medium bzw. Milli-Q-Wasser vor dem Autoklavieren noch 1,5 %

Agar-Agar beigesetzt. Das benötigte Antibiotikum oder der Induktor können beigemischt werden, sobald der flüssige Agar auf ca. 50 °C abgekühlt ist.

2.1.3 Lagerung der Bakterien

Zur kurzfristigen Lagerung (max. 4 Wochen) können die auf LB- oder Selektiv-Platten gewachsenen Bakterienstämme bei 4 °C gelagert werden. Für eine dauerhafte Aufbewahrung der Stämme wird eine Übernachtskultur (ÜNK) im Verhältnis 1:2 mit einer 50 %igen Glycerin-Lösung gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.1.4 Wachstumsuntersuchungen in Komplex- und Minimalmedium

Für Standard-Wachstumskurven werden 50 ml LB Medium oder Minimalmedium mit 500 µl (Verhältnis 1:100) einer ÜNK beimpft. Die Zellen werden, soweit nicht anders vermerkt, bei 37 °C schüttelnd, bzw. im Fall von M9 mit Galaktitol nicht schüttelnd, inkubiert. Die optische Dichte der Kultur wird dabei stündlich bei einer Lichtwellenlänge von bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt, bis die Kultur in die stationäre Phase eintritt und die Zellen kein Wachstum mehr zeigen. Für durchgängige Messungen über 24 h werden 400 µl des frisch angeimpften Mediums (soweit nicht anders angegeben) im Verhältnis 1:100 in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die OD_{600} stündlich im Bioscreen CTM (Bioscreen, Piscataway, USA) bestimmt.

2.1.5 Kompetitiver Index

Zur Bestimmung der relativen Fitness einer Mutante im Vergleich zum Wildtyp werden die Stämme in einem kompetitiven Experiment untersucht. Dazu werden die Bakterien separat in LB-Medium bei 37 °C und 150 UpM im Schüttler auf eine OD_{600} von 0,5 angezogen. Die Kulturen werden in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander gemischt und in frisches M9 Medium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle gemischt. Zur Unterscheidung der Mutante vom Wildtyp besitzen die Deletionsmutanten noch eine Kanamycin-Resistenzkassette im deletierten Gen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten werden die Kolonie-bildenden Einheiten pro ml (KbE/ml Kultur) bestimmt. Dazu werden Proben der Bakterienkultur auf Kanamycin-haltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die relative Fitness wird durch das Verhältnis der KbE/ml der einzelnen Stämme berechnet.

2.1.6 Phänotypische Charakterisierung von *S. Typhimurium*-Mutanten

Die Charakterisierung von Mutanten im Hinblick auf den Metabolismus erfolgt mit *PM MicroPlates*TM der Firma BIOLOG (Hayward, CA, USA), mit denen die Verwertung von Kohlenstoffquellen getestet werden kann. Wildtyp und Mutante werden dazu über Nacht in LB-Medium angezogen. Die Zellen werden zweimal mit sterilem PBS gewaschen und in Minimalmedium (ohne Kohlenstoffquelle), versetzt mit Tetrazoliumviolett, resuspendiert. Die Inokulationsdichte liegt bei einer OD_{600} von 0,06.

Nach Beimpfung der Mikrotiterplatten PM1 und PM2 erfolgt eine Inkubation über 24 h bei 37 °C. Kann dabei ein Kohlenstoff vom Stamm verstoffwechselt werden, erfolgt die Produktion von NADH, wodurch Tetrazoliumviolett reduziert wird. Dies führt zur Violettfärbung des sonst farblosen Tetrazoliumvioletts und ermöglicht so eine visuelle Auswertung. Parallel dazu wird das quantitative Wachstum der Stämme in den einzelnen Kohlenstoffquellen gemessen. Hierfür wird auf die Zugabe von Tetrazoliumviolett verzichtet und die OD_{600} nach 24 h gemessen.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Oligonukleotide, Plasmide und Molekulargewichtsmarker

Eine Übersicht der verwendeten Plasmide und Oligonukleotide (Primer) findet sich in den Anhängen Tabelle A 4 und Tabelle A 5. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wird der Molekulargewichtsmarker *Gene Ruler DNA Ladder Mix* und zur Identifizierung der Größe von Proteinen der *Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder* verwendet, beide bezogen von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Braunschweig, Deutschland).

2.2.2 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Plasmidisolierung

Die Aufreinigung von Plasmiden mittels des Kits „Invisorb® Spin Plasmid Mini Two“ der Firma Stratec Biomedical AG (Birkenfeld, Deutschland) basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, die zur Isolierung der Plasmid-DNA mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an einen Filter führt. Hierfür werden 2 ml einer Plasmid-haltigen ÜNK in einem Eppendorf-Gefäß abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 250 µl Lösung A gelöst. Zur Lyse der Zellen wird Lösung B dazugegeben und vorsichtig invertiert. Nach Zugabe von Lösung C wird das Gemisch 5 min zentrifugiert. Der Überstand kann nun auf die Säule (*Spin-Filter*) pipettiert und 1 min bei 11.000 g zentrifugiert werden. Dabei bindet die Plasmid-DNA an die *Spin-Filter* Membran. Zum Waschen werden 750 µl Waschlösung auf die Säule gegeben und ebenfalls 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Dem Waschschrift folgt eine dreiminütige Zentrifugation, um die Säule von Restflüssigkeiten zu befreien. Abschließend wird die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die Plasmid-DNA mittels ddH₂O eluiert.

2.2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. Typhimurium*

Zur Isolierung der genomischen DNA werden zuerst 1,5 ml einer ÜNK durch Zentrifugation pelletiert (1 min, 13.000 g). Durch Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml in Lyse-Puffer) und 15 min Inkubation auf Eis werden die Bakterien lysiert. Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen folgt eine Inkubation über Nacht bei 55 °C mit 10 µl 10 %iger SDS-Lösung und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml). Anschließend wird zur Fällung der DNA 500 µl Isopropanol dazugegeben. Die DNA kann nun mit einer Pipettenspitze entnommen werden. Es folgen noch zwei Waschschriffe in 96 %igem Ethanol und

70 %igem Ethanol, bevor die DNA bei 37 °C getrocknet werden kann. Zum Schluss wird sie in 150 µl ddH₂O gelöst und kann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.3 RNA-Isolation aus *S. Typhimurium*

Ein wichtiger Aspekt bei der RNA-Isolation ist, den unkontrollierten Abbau durch RNAsen zu verhindern. Diese sind praktisch in jedem biologischen Material vorhanden und müssen daher deaktiviert werden. Die RNA wird, abhängig vom Ausgangsmaterial, mittels zweier verschiedener Methoden isoliert.

RNA-Isolation von *S. Typhimurium* ST4/74 aus dem Caecum von Mäusen

Ausgangsmaterial ist hierbei eine 1 ml Bakteriensuspension, die zuvor mittels immunomagnetischer Aufreinigung aus dem Darminhalt der Maus gewonnen werden kann (2.4.5.3). Wegen der zwangsläufig geringen Menge an Ausgangsmaterial je Maus und der begrenzten Anzahl an Proben wird die RNA mit Hilfe des Kits NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) isoliert und aufgereinigt. Bei dieser Methode erfolgt die Deaktivierung vorhandener RNAsen bereits im Lyse-Puffer, welcher große Mengen an chaotropischen Ionen besitzt (Vonhippel and Wong, 1964). Dabei wird gemäß Herstellerangaben wie folgt vorgegangen: Nach kurzem Zentrifugieren wird das Bakterienpellet in 100 µl TE-Puffer (mit 1 mg/ml Lysozym) gelöst und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum vollständigen Aufbrechen der Zellen wird 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl Mercaptoethanol dazugeben und das Ganze mit dem Vortex gut gemischt. Die Probe wird zur Filtrierung des Lysats auf eine lila-markierte Säule gegeben und 1 min bei 11.000 *g* zentrifugiert. Im Fall einer Pelletbildung muss der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden. Dazu werden 350 µl vom 70 %igen Ethanol hinzugegeben und wie oben gemischt. Zur Bindung der Nukleinsäuren wird das Lysat auf eine weitere Säule (blau-markiert) gegeben und 30 s bei 11.000 *g* abzentrifugiert. Es folgt ein Schritt zur Entsalzung der Silica-Membran, an welche die Nukleinsäuren gebunden haben. Dazu werden 350 µl MDB Puffer hinzugefügt und 1 min bei 11.000 *g* zentrifugiert. Die Entfernung der Salze auf der Membran sorgt anschließend für einen effizienteren DNA Verdau, der direkt im Anschluss folgt. Dazu müssen vorbereitend 10 µl rDNase mit 90 µl des entsprechenden Reaktionspuffers gemischt werden. Von diesem Gemisch werden 95 µl auf die entsalzte Silica-Membran pipettiert und das Ganze für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit folgen drei Waschschrte, beginnend mit dem Puffer RAW2 (200 µl für 30 s bei 11.000 *g*) und gefolgt von dem Puffer RA3 mit 600 µl (30 s bei 11.000 *g*) und 250 µl (2 min bei 11.000 *g*). Die Säule wird anschließend in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA

in 60 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Zur Steigerung der RNA-Konzentration werden die 60 µl nach dem Zentrifugieren erneut auf die Membran pipettiert und der Elutionsschritt wiederholt.

RNA-Isolation aus Bakterienkulturen

Kann die RNA, z. B. für Transkriptionsstudien, aus 50 ml Bakterienkulturen isoliert werden, erfolgt die Isolation mittels einer einfachen Phenolextraktion. Zur Inaktivierung von RNAsen wird Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet, das an primäre und sekundäre Amine bindet und durch die resultierende kovalente Bindung Nukleasen funktionsunfähig macht (Mühlhardt, 2009). Im Versuch wird dazu bidestilliertes Wasser, das zur Herstellung der benötigten Puffer verwendet wird, vorab mit DEPC über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert, um das DEPC zu deaktivieren.

50 ml einer Bakterienkultur werden abzentrifugiert (10 min, 6.500 g) und das Pellet in 1 ml Trizol resuspendiert. Trizol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, in dessen wässriger Phase sich die RNA sammelt und Proteine, Lipide und DNA in der organischen Phase verweilen. Die Zellsuspension wird in ein vorgefertigtes 2 ml Eppendorf-Gefäß, gefüllt mit einer kleinen Menge an 0,1 mm *Zirkonia/Silica-Beads* (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA), gegeben und mittels des *Ribolysers* (FastPrep®-24, MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) zerkleinert (dreimal 45 s bei 6.500 UpM). Zwischen den einzelnen Schritten wird das Eppendorf-Gefäß immer 1 min auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss der Zellen werden 400 µl Chloroform dazupipettiert und das Ganze 10 s lang stark geschüttelt. Anschließend wird das Eppendorf-Gefäß für 2-5 min bei RT inkubiert, bevor es 15 min bei 13.000 g und RT zentrifugiert wird. Die wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 450 µl Isopropanol wird das Gemisch für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine 30-minütige Zentrifugation bei RT und 13.000 g. Danach wird das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Abschließend wird die isolierte RNA in 25 µl RNase-freiem H₂O gelöst.

2.2.2.4 Entfernung der ribosomalen RNA aus RNA Proben

Die Gesamt-RNA einer Bakterienzelle besteht zu etwa 90-95 % aus ribosomaler RNA (rRNA). Für die Analyse eines kompletten Transkriptoms ist die rRNA nicht von Interesse und sollte daher aufgrund ihres überproportionalen Anteils im Vorfeld entfernt werden. Dazu wird das Ribominus™ Transcriptome Isolation Kit (Yeast and Bacteria) der Firma Invitrogen verwendet. Hierbei erfolgt eine Bindung der rRNA an spezifischen Biotin-markierten Oligonukleotidsonden. Biotin wiederum bindet an Streptavidin, das an magnetische Kügelchen gekoppelt ist, wodurch die rRNA mittels magnetischer Kräfte aus der Probe entfernt werden kann. Die Durchführung erfolgt nach

Herstellerangaben. Um die RNA im Anschluss aufzukonzentrieren, wird eine Ethanol-Fällung (ebenfalls nach Herstellerangaben) durchgeführt. Die Proben werden dann entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder können sofort für die Fragmentierung (2.2.2.5) verwendet werden.

2.2.2.5 RNA-Fragmentierung

Zur Herstellung einer cDNA Bibliothek für eine Transkriptomsequenzierung muss die von rRNA befreite RNA (2.2.2.4) mit dem Covaris E220 (Covaris, Woburn, MA, USA) fragmentiert werden. Ausgangsmaterial sind dabei 300 ng RNA, gelöst in 50 μl Nuklease-freiem H_2O , die auf eine Fragmentlänge von ca. 150 bp zerkleinert werden. Dabei werden folgende Geräteeinstellungen gewählt: 180 Sekunden, 10 % Einschaltdauer, 175 Watt, 200 Zyklen/Stoßeinheit. Nach der Fragmentierung werden die Proben mittels Ethanolfällung (2.2.2.9) auf ein Volumen von 25 μl reduziert und im Anschluss dephosphoryliert (2.2.5.3).

2.2.2.6 DNase Verdau

Nach der RNA-Phenolextraktion (2.2.2.3) wird im Normalfall ein DNase Verdau durchgeführt, um etwa vorhandene DNA-Verunreinigungen nach der RNA-Isolation zu entfernen. Dazu werden 80 μl RNA mit 10 μl RQ1 RNase-freie DNase (1 U/ μl) und 10 μl 10-fach RQ1 RNase-freier DNase-Puffer (Promega, Fitchburg, Massachusetts, USA) gemischt und für 45 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zur nachfolgenden Entfernung der DNase werden 100 μl Chloroform hinzugegeben, das Ganze 15 s geschüttelt und danach 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13.200 g abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und es folgt eine einfache Ethanolfällung. Dabei wird die RNA zweimal mit 100 bzw. 70 %igem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Sind alle Ethanolreste entfernt, wird die RNA in 80 μl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration kann mittels des NanoDrops ND-1000 (Thermo Scientific) bestimmt werden. Zur Verifizierung der erfolgreichen DNA-Entfernung wird eine DNA-spezifische Kontroll-PCR (2.2.4) durchgeführt. Danach kann die RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.2.2.7 Herstellung von cDNA mittels reverser Transkriptase

Die für die Transkriptionsanalyse benötigte cDNA wird unter Verwendung von dem qScriptTM cDNA SuperMix (Quanta Bioscience, Gaithersburg, MD, USA) hergestellt. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers. 1 μg RNA Template wird mit 4 μl qScript cDNA SuperMix (5-fach) gemischt

und mit RNase- und DNase-freiem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Der cDNA SuperMix beinhaltet bereits alle Komponenten, die für eine cDNA-Synthese notwendig sind. Dazu gehören 2'-Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), MgCl₂, Puffer, Primer, ein RNase Inhibitor, eine reverse Transkriptase sowie Stabilisatoren. Bei den Primern handelt es sich um eine Mischung aus zufällig gewählten Hexanukleotiden und Oligo-dT-Primer (komplementär zum PolyA-Schwanz der mRNA). Das Reaktionsgemisch wird 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und zuletzt 5 min bei 85 °C inkubiert. Die cDNA kann bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Zur Transkriptionsanalyse wird eine PCR nach Standardverfahren (2.2.4.1) durchgeführt.

2.2.2.8 Herstellung einer cDNA-Bibliothek (cDNA Bibliothek)

Die Generierung einer cDNA Bibliothek zur Transkriptomsequenzierung erfolgt mit dem TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina, Inc., Investor Relations, San Diego, CA, USA). Dabei wird die fragmentierte und rephosphorylierte RNA (2.2.2.5 und 2.2.5.3) mittels einer reversen Transkriptase in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Der komplementäre Strang wird durch die DNA-Polymerase I und RNase H synthetisiert. Nach erfolgter Adapterligation kann die cDNA Bibliothek für die Sequenzierung verwendet werden (2.2.8.2).

2.2.2.9 Aufreinigung von Nucleinsäuren mittels Ethanol-fällung

Mit Hilfe der Ethanol-fällung lassen sich Nucleinsäuren aufreinigen und aufkonzentrieren. Dabei wird 1 µl Glycogen (20 µg/µl) und 1 ml 100 %iger EtOH zur Probe dazugegeben und gut gemischt. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C wird die Probe für 15 min bei 12.000 g abzentrifugiert, wodurch die Nucleinsäuren ein Pellet ausbilden. Durch zwei Waschschriffe mit 500 µl 70 %igem EtOH werden die Nucleinsäuren von Kontaminationen befreit. Im Anschluss wird das Pellet getrocknet und in 25 µl RNase- und DNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.2.10 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von RNA bzw. DNA erfolgt mittels des NanoDrops ND-1000 (Thermo Scientific). Es handelt sich um eine spektrophotometrische Messung, bei der bereits 1 µl Probe für ein genaues und reproduzierbares Ergebnis ausreicht. Dabei wird zuerst reines bidestilliertes Wasser (*Blank*) und anschließend die Probe gemessen. Die Konzentration errechnet sich aus der Extinktion bei 260 nm (optimaler Absorptionsbereich für Nucleinsäuren, E₂₆₀). Zusätzlich

werden die Extinktionen bei 230 nm (Absorptionsbereich für Salze, E_{230}) und 280 nm (Absorptionsbereich von Proteinen, E_{280}) gemessen. Aus den Quotienten E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. Optimale Werte für das Verhältnis von E_{260}/E_{280} liegen für DNA bei ca. 1,8 und für RNA bei ungefähr 2,0. Kleinere Werte lassen auf Verunreinigungen durch Proteine, Phenole oder andere Kontaminanten schließen. Der optimale Wert für das Verhältnis von E_{260}/E_{230} liegt zwischen 1,8 und 2,2. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf die Anwesenheit von verschiedenen Zuckerarten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird verwendet, um geladene Moleküle (unter anderem DNA) anhand ihrer unterschiedlichen Größe zu trennen. In einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNA Proben auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Das Gel liegt hierbei in einer Gelelektrophoresekammer, die mit einer ionischen Pufferlösung (1-fach TAE-Puffer) gefüllt ist. Von der Probe werden 5 μ l, gemischt mit 1 μ l 6-fach Loading Dye (Thermo Scientific), in eine Tasche des Gels pipettiert. Für den Größenvergleich der Fragmente wird ein Standard (Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder) neben die DNA Probe in eine freie Reihe auf das Gel aufgetragen. Ist die Gelelektrophoresekammer an den Spannungsgeber angeschlossen, wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung im einwirkenden elektrischen Feld in Richtung Anode (positiver Pol). Da größere Fragmente durch die im Gel vorhandenen Poren langsamer vorankommen, kommt es zu einer Größenaufftrennung. Die Laufzeit der Gelelektrophorese beträgt 30-60 min. Anschließend wird das Gel für 15-20 min in einer GelRed-Lösung gefärbt und durch UV-Transillumination bei 320 nm im ImageMaster® (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) visualisiert. Aus den Wegstrecken lässt sich die Fragmentgröße und aus der Farbintensität dessen Häufigkeit ablesen.

1 %iges Agarose-Gel	1,0 g	Agarose
	100 ml	1-fach TAE Puffer aufkochen
50-fach TAE-Puffer	2 M	Tris
	50 mM	EDTA
		pH 8,0 (mittels Eisessig)

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.4.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) dient zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten. Die Amplifikation wird dabei wie folgt durchgeführt: zunächst wird das DNA-Template auf 95 °C erhitzt, wodurch sich die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen lösen, was zur Ausbildung von einzelsträngiger DNA führt (Denaturierung). Durch Absenken der Temperatur auf ca. 55 °C binden kurze, spezifische Oligonukleotide (Primer) an die DNA (Annealing). Die Annealing-Temperatur muss individuell an die Primer angepasst werden und errechnet sich aus der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer. Die gebundenen Primer dienen der *Taq*-Polymerase als Ausgangspunkt, um bei einer Temperatur von 72 °C (Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase) aus der einzelsträngigen wieder eine doppelsträngige DNA zu synthetisieren (Elongation). Durch Wiederholung dieser drei Schritte (ca. 30- bis 35-mal) kommt es zur Vervielfältigung des spezifischen DNA-Fragments (Tab. 2.3). Bei der praktischen Durchführung wird zuerst ein Mastermix erstellt, der die in Tab. 2.2 aufgelisteten Komponenten beinhaltet.

Tab. 2.2: PCR-Mastermix

	Substanz	Volumen [µl]
1-fach	10-fach Reaktionspuffer	5
25 mM	MgCl ₂	3
20 mM	dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2
10 pmol/µl	Primer <i>Forward</i>	1
10 pmol/µl	Primer <i>Reverse</i>	1
20-100 ng	Template	1-10
5 U/µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,5
	ddH ₂ O	ad 50 (Milli-Q)

Tab. 2.3: PCR-Programm

	Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [min]
	Initiale Denaturierung	95	5
30-35 Zyklen	Denaturierung	95	0,5
	Annealing	45-55	0,5
	Elongation	72	0,5-3 (1000 bp/min)
	Finale Elongation	72	8
	Lagerung	8	unbegrenzt

Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang Tabelle A 5 aufgelistet. Sie werden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen und auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ l eingestellt. Die Länge der Primer beträgt im Schnitt 18-24 bp (mit Ausnahme von Deletionsprimern, die eine Länge von ca. 50 bp haben). Die Schmelztemperatur T_M berechnet sich nach folgender Formel:

$$T_M = 2^\circ\text{C} * (N_A + N_T) + 4^\circ\text{C} * (N_C + N_G),$$

wobei N_x für die Anzahl der Basen A, T, C oder G steht. Mit Hilfe der Schmelztemperatur kann die Annealingtemperatur bestimmt werden, die optimaler Weise 0,5 °C niedriger als die Schmelztemperatur ist.

2.2.4.2 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wird verwendet, um spezifische DNA-Fragmente auf Plasmiden oder genomischer DNA zu identifizieren, ohne diese vorher speziell aufzureinigen. Die Reaktion erfolgt in einem Endvolumen von 25 μ l (alle Volumina laut Tab. 2.2 werden halbiert). Als Template-DNA dient 1 μ l einer in 100 μ l H₂O gelösten Kolonie.

2.2.4.3 Reverse Transkriptase-PCR

Bei der Reversen Transkriptase (RT)-PCR wird als Template eine in cDNA umgeschriebene RNA verwendet. Das Pipettierschema und das Protokoll entspricht der Standard-PCR (2.2.4.1).

2.2.4.4 Aufreinigung von PCR-Fragmenten und linearisierten Plasmiden

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten und linearisierten Plasmiden erfolgt mittels des Kits Invisorb® Fragment Clean Up (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland). Sie wird durchgeführt, wenn das Template für eine neue Reaktion in einem anderen Puffer vorliegen muss. Für PCR-Reaktionen mit einem Volumen von 50 µl werden diese mit 250 µl Bindepuffer gemischt. Bei größeren Volumen wird die Menge an Bindepuffer entsprechend angepasst. Die Suspension wird auf einen *Spin*-Filter aufgetragen und für 2 min bei 11.000 *g* zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Membran des *Spin*-Filters und kann im Anschluss mit 30-50 µl ddH₂O in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eluiert werden. Dazu wird das ddH₂O auf die Membran pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und zum Schluss 1 min bei 11.000 *g* abzentrifugiert. Die DNA kann anschließend bei -20 °C gelagert werden.

2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die spezifische Nukleotid-Sequenzen erkennen und diese innerhalb ihrer Sequenz schneiden. Ihre natürliche Funktion in Bakterien dient dem Schutz vor Phagenbefall durch Abbau von Fremd-DNA. Allerdings finden Restriktionsenzyme in der Molekularbiologie häufig Verwendung bei der Klonierung. Für einen präparativen Restriktionsverdau werden hierfür die Enzyme von Thermo Scientific (Braunschweig, Deutschland) bezogen, wobei die Reaktion im jeweils vom Unternehmen vorgegebenen Puffer stattfindet. Die Ausgangsmenge der zu verdauenden DNA beträgt bei PCR-Fragmenten 1 µg und bei Plasmiden 5-10 µg. Für einen optimalen Verdau müssen einige Aspekte berücksichtigt werden, insbesondere die einzusetzende Menge an Enzyme (in Units) und die zeitliche Dauer, um einen Überverdau der DNA zu vermeiden. Bei Restriktionsenzymen ist 1 Unit definiert als die Reaktionsbedingung, bei der 1 µg genomischer *lambda* (λ)-DNA in 60 min von dem Enzym geschnitten wird. Unter Berücksichtigung dieser einzelnen Aspekte ergibt sich folgende Formel:

$$N_U = \frac{G_\lambda}{G_{DNA}} * \frac{N_{SDNA}}{N_{S\lambda}} * \frac{m_{DNA}}{t_s} * (1 + m_{ÜVD})$$

mit

- N_U = Anzahl einzusetzender Units [Units]
- G_λ = Größe λ-Genom [bp]
- G_{DNA} = Größe DNA-Fragment [bp]
- N_{SDNA} = Anzahl Schnittstellen im DNA-Fragment

N_{SA}	=	Anzahl Schnittstellen im λ -Genom
m_{DNA}	=	DNA-Menge [μg]
t_s	=	Dauer [h]
$m_{ÜVD}$	=	prozentualer Überverdau

Daraus kann das einzusetzende Volumen (V_{end}) der Restriktionsenzyme (Tab. 2.4) berechnet werden:

$$V_{end} = \frac{N_U}{c_E}$$

mit

N_U	=	Anzahl einzusetzender Units [Units]
c_E	=	Konzentration der Enzyme [Units/ μl]

Durch die oben beschriebene Formel kann die einzusetzende Menge an Enzym und die Dauer des Verdau in Abhängigkeit von der Größe und Menge der DNA-Fragmente bestimmt werden (die Inkubationszeit variiert zwischen 1-5 h). Die Temperatur während der Inkubation beträgt 37 °C (soweit nicht anders angegeben). Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgt mittels Hitze (falls möglich) oder durch Aufreinigung (2.2.4.4).

Tab. 2.4: In der Arbeit verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Units	Erkennungssequenz	Puffer	Hersteller
HindIII	10 U/ μl	AAGCTT	1-fach R-Puffer	Thermo Scientific
KpnI	10 U/ μl	GGTACC	1-fach Cfr9I-Puffer	Thermo Scientific
NotI	10 U/ μl	GCGGCCGC	1-fach Cfr9I-Puffer	Thermo Scientific
PstI	10 U/ μl	CTGCAG	1-fach SacI-Puffer oder 1-fach Tango-Puffer	Thermo Scientific
SacI	10 U/ μl	GAGCTC	1-fach Cfr9I-Puffer	Thermo Scientific
Scal	10 U/ μl	AGTACT	1-fach Scal-Puffer	Thermo Scientific
XhoI	10 U/ μl	CTCGAG	1-fach R-Puffer	Thermo Scientific
Cfr9I (XmaI)	10 U/ μl	CCCGGG	1-fach Cfr9I-Puffer	Thermo Scientific

2.2.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung einer Religation, bei der ein bereits geschnittenes Plasmid ohne Aufnahme eines Inserts ligiert, werden die Plasmide nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert. Dies erfolgt mittels einer alkalischen Phosphatase (*FastAP*) und dem dazugehörigen *FastAP*-Puffer (Thermo

Scientific). Hierfür muss nach Zugabe der Komponenten die DNA für 15 min bei 37 °C inkubiert werden. Die Inaktivierung der *FastAP* erfolgt für 5 min bei 75 °C.

2.2.5.3 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von RNA

Fragmentierte RNA (2.2.2.5) muss zur effizienten Adapterligierung bei Transkriptomsequenzierungen dephosphoryliert und anschließend wieder phosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung erfolgt nach folgendem Schema:

Dephosphorylierung	25 µl	Fragmentierte RNA (300 ng)
	3 µl	10-fach antarktischer Phosphatase Puffer
	2,0 µl	Antarktische Phosphatase

Der Ansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels des Kits miRNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 30 µl RNase-freiem ddH₂O eluiert. Im Anschluss erfolgt die Phosphorylierung der Probe nach folgendem Schema:

Phosphorylierung	30 µl	Dephosphorylierte RNA
	3,5 µl	10-fach T4 Polynukleotidkinase Puffer
	2 µl	T4 Polynukleotidkinase

Der Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert und ebenfalls mit dem miRNeasy Mini Kit aufgereinigt. Eluiert wird die RNA in 30 µl RNase-freiem ddH₂O. Im Anschluss daran wird die Konzentration mit Hilfe des NanoDrops bestimmt und 0,2-1 µg gelöste RNA mittels der SpeedVac (Eppendorf) auf ein Endvolumen von 5 µl aufkonzentriert. Die prozessierte Probe kann dann zur Herstellung einer cDNA Bibliothek (2.2.2.8) weiter verwendet werden.

2.2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Das Zusammenfügen einzelner DNA-Fragmente wird durch die T4 Ligase katalysiert, welche die Phosphate am 5'-Ende mit Hydroxylgruppen am 3'-Ende von DNA-Molekülen verknüpfen kann. Für die Ligation werden Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:5 gemischt, wobei, soweit nicht anders angegeben, 100 ng Insert eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgt 1 h bei 16 °C.

Ligationsansatz	100 ng	Insert
	1-15 µl	Plasmid (1/5 der molaren Menge vom Insert)
	1 µl	T4 Ligase
	2 µl	10-fach T4 Ligasen Puffer
		ad 20 µl Milli-Q-Wasser
		1 h bei 16 °C inkubieren

2.2.6 DNA-Transfer

Der Austausch von DNA bietet den Bakterien einen evolutionären Vorteil, da sie durch Aufnahme von Fremd-DNA, z.B. Antibiotikaresistenzen, erwerben können. Dabei gibt es drei im Labor verwendete Hauptmechanismen, die Konjugation, die Transformation oder die Phagentransduktion, welche für den Austausch verantwortlich sind und so für die künstliche DNA-Übertragung gezielt eingesetzt werden.

2.2.6.1 Konjugation

Das Prinzip der Konjugation besteht darin, dass der Träger der DNA (Donor) die DNA durch Zell-Zell-Kontakt (Pili) in einen Empfänger (Akzeptor) überträgt. Verwendet wird diese Methode speziell für die Vektoren pUTs-*lux*(Cm) und pUTs-*gfp*(Cm) mit dem *E. coli* Stamm S17.1 λ *pir* als Donor und dem *S. Typhimurium* Wildtyp-Stamm ST4/74 als Akzeptor.

Festkonjugation

Zur Festkonjugation müssen sowohl Donor als auch Akzeptor zur Ausbildung der Pili frisch auf Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Anschließend werden Kolonien vom Donor abgenommen und auf einer frischen LB Platte (ohne Antibiotikum) in Form eines Kreises mit ca. 2 cm Durchmesser (Größe einer 1 Euro-Münze) verteilt. Die doppelte Menge des Akzeptorstammes wird nachfolgend mit der Impföse abgenommen, mit dem Donor auf der LB Platte vermischt und für 6 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Bakterien von der Platte abgenommen, in 1 ml LB Medium resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika, die selektiv für Plasmid und Akzeptor sind, ausgestrichen.

Flüssigkonjugation

Für die Flüssigkonjugation werden ÜNK von Donor und Akzeptor in frisches LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 bei 37 °C kultiviert. 2,5 ml der Donorkultur werden mit 1,5 ml der Akzeptorkultur gemischt und sofort pelletiert (5 min bei

7.500 UpM bei RT). Nach einem Waschschrift mit 10 ml LB-Medium wird das Bakteriengemisch in 0,5 ml LB Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz wird auf einen Membranfilter (MilliPore) gegeben, der auf einer vorgewärmten LB-Platte (ohne Antibiotikum) liegt, und vorsichtig unter der Cleanbench getrocknet. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei 37 °C werden die Bakterienzellen vorsichtig von der Membran abgenommen und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Davon werden 200 µl auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte, die selektiv für Plasmid und Akzeptor ist, ausplattiert und im Brutschrank über Nacht angezogen.

2.2.6.2 Transformation

Für eine DNA-Übertragung mittels Transformation müssen die Bakterienzellen im Vorfeld künstlich kompetent, d.h. aufnahmefähig gemacht werden. Je nach Art der Transformation werden die Zellen entsprechend vorbehandelt. Eine gängige Methode ist die Elektroporation, bei der die Bakterienzellen durch einen elektrischen Impuls dazu gebracht werden, die Fremd-DNA aufzunehmen. Bei der zweiten Methode wird ein Hitzeschock als Stimulus für die DNA-Aufnahme verwendet (CaCl₂-Methode).

Herstellung elektrokompetenter Zellen

50 ml vorgewärmtes LB-Medium (bei Bedarf mit Antibiotikum) wird 1:100 mit einer ÜNK angeimpft. Die Kultur wird bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.6 geschüttelt. Anschließend wird die Kultur für 15 min auf Eis gestellt und in ein Zentrifugationsröhrchen (*Falcon-Tube*) überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (7 min bei 6.500 UpM und 4 °C) erfolgen drei Waschschriffe mit 5 %igem Glycerin (50 ml, 25 ml, 5 ml). Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in 400 µl 10 %igem Glycerin resuspendiert, daraus Aliquots á 40 µl hergestellt und die nun elektrokompetenten Zellen bei -80 °C eingefroren.

Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten Zellen

Von einer ÜNK werden 0,5 ml in 50 ml frisches LB-Medium (bei Bedarf mit Antibiotikum) überimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Die Zellen werden dann 15 min auf Eis gekühlt und im Anschluss 10 min bei 4.000 UpM und 4 °C pelletiert. Die Zellen werden in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in 5 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert (40 µl) und bei -80 °C gelagert.

Transformation mittels Elektroporation

Zur Transformation mittels Elektroporation werden die elektrokompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 1-5 µl der zu transformierenden DNA-Lösung (die in die Bakterienzelle eingefügt werden soll) wird mit dem Aliquot und 40 µl sterilem Milli-Q-Wasser vermischt. Der gesamte Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette (Peqlab) pipettiert und dort ein elektrischer Impuls im Elektroporator (Peqlab) ausgelöst (25 µF; 200 Ohm; 2,5 kV). Der Ansatz wird sofort in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend können 100 µl auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert werden.

SOC-Medium	47 ml	SOB
	1 ml	1 M MgCl ₂
	1 ml	1 M MgSO ₄
	1 ml	1 M Glukose
		sterilfiltrieren
SOB-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	0,2 g	KCl
		ad 1000 ml Milli-Q-Wasser
		autoklavieren (121 °C, 20 min)

Transformation mittels Hitzeschock

Für die Transformation mittels Hitzeschock werden Calciumchlorid-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl der zu transformierenden DNA dazu pipettiert. Nachdem der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert worden ist, erfolgt der Hitzeschock. Dazu muss das Eppendorf-Gefäß mit den Zellen 90 s bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt werden. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium werden die Zellen 45 min bei 37 °C inkubiert. Am Schluss werden 100 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert.

2.2.6.3 Phagentransduktion

Bei der Phagentransduktion wird DNA mittels des Phagen P22 (Maloy, 1990) übertragen, wobei eine Kanamycin-Resistenzkassette auf eine effiziente Art in einen neuen Stamm eingebracht werden kann. Dazu erfolgt zuerst die Herstellung eines Phagenlysats, dem die Transduktion folgt. Verwendung findet diese Methode bei der Herstellung von Deletionsmutanten (2.2.7.2), wenn im bakteriellen Genom mittels homologer Rekombination ein Gen durch eine Resistenzkassette ersetzt werden soll. Die Rekombinase, die für die Rekombination verantwortlich ist, besitzt eine hohe Aktivität, die zu ungewollten Schäden im Genom führen kann. Durch die Phagentransduktion wird die Kanamycin-Resistenzkassette in einen Rekombinase-unberührten Stamm eingebracht.

Herstellung des Phagenlysats

Als Ausgangspunkt des Phagenlysats dient eine ÜNK, welche die transduzierende Kanamycin-Resistenzkassette im Genom besitzt. 10 ml frisches LB-Medium mit Kanamycin wird 1:100 mit der ÜNK angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,15-0,2 kultiviert. Anschließend werden 5 ml in ein Reagenzglas überführt und 5 μ l des P22-Phagenwildtyps (P22(WT)) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 h bei 37 °C werden die Zellen in ein 15 ml *Falcon-Tube* überführt und zum Aufbrechen der Bakterienzelle mit 50 μ l Chloroform gemischt. Nach Inkubation des Ansatzes für 2 h bei 4 °C wird dieser 10 min bei 4 °C und 7.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die P22-Phagen befinden, wird abgenommen und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt dann bei 4 °C im Kühlschrank.

Phagentransduktion

Für die Phagentransduktion wird eine ÜNK des Stammes benötigt, welcher die Kanamycin-Resistenzkassette erhalten soll (Rezipient). 200 μ l der ÜNK werden in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 10 μ l des hergestellten Phagenlysats gemischt und 1 h bei 37 °C stehend inkubiert. Anschließend wird der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Kanamycin als Selektionsmittel ausplattiert. Um eine Kontamination ausschließen zu können, werden parallel dazu noch 100 μ l der ÜNK, sowie 50 μ l des Phagenlysats ausplattiert. Am nächsten Tag werden gewachsene Kolonien auf *Green Plates* (+ Kanamycin) ausgestrichen und erneut bei 37 °C inkubiert. Mittels *Green Plates* können Bakterien identifiziert werden, die zum einen das Antibiotikaresistenzgen aufgenommen haben, zum anderen aber phagenfrei sind. Phageninduzierte Lyse führt zu einem Absenken des pH-Wertes, wodurch der in den *Green Plates* enthaltende pH-Indikator seine Farbe von grün (neutraler pH-Wert) zu dunkelblau (saurer pH-Wert) wechselt. Blaue Kolonien deuten damit auf die

Anwesenheit von Phagen hin, weiße Kolonien bedeuten phagenfreie Zellen. Mehrfaches Passagieren weißer Kolonien ermöglicht eine sichere Selektion von phagenfreien Bakterien. Am Ende erfolgt ein Ausstrich einer weißen Kolonie auf LB-Platte mit Kanamycin. Die Transduktion wird mittels Kolonie-PCR und eines Überkreuzausstrichs verifiziert. Für den Überkreuzausstrich wird der transduzierte Stamm in Form eines waagrechten Striches auf eine Green Plate und im 90 ° Winkel dazu der P22(WT) als Strich ausgestrichen. Ohne Kontakt mit P22(WT) sollten die Kolonien ein weißes Erscheinungsbild haben, durch Kontakt mit dem Phagen jedoch eine blaue Koloniemorphologie sichtbar sein.

Green Plates	8 g	Trypton
	1 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	15 g	Agar
		ad 1000 ml Milli-Q-Wasser, autoklavieren (121 °C, 20 min)
		anschließend noch dazufügen
	21 ml	40 % (w/v) Glukose
	25 ml	2,5 % (w/v) Alizarinengelb G
	3,3 ml	2 % (w/v) Anilinblau

Für die Herstellung der Green Plates werden die 40 %ige Glukose-Lösung und das Alizarinengelb G vorher separat autoklaviert. Das Anilinblau wird mit einem 0,22 µm Filter (Millipore) sterilfiltriert. Alizarinengelb G muss vor jeder Verwendung durch leichtes Erhitzen in der Mikrowelle gelöst werden, bevor es zum Agar gegeben werden kann.

2.2.7 Konstruktion von *Salmonella*-Stämmen

2.2.7.1 Herstellung von Reporterstämmen in *S. Typhimurium*

Zur Verifizierung der bioinformatischen Promotoranalyse und quantitativen Bestimmung der Transkriptionsaktivität einzelner Gene werden die putativen Promotorbereiche mit verschiedenen Reportergenen fusioniert. Verwendet werden hierbei die Vektoren pUTs-*gfp* und pUTs-*luxCDABE* (kurz: pUTs-*lux*), die beide eine Chloramphenicol-Resistenzkassette besitzen (Vektorkarten s. Anhang Abbildung A 1 und Abbildung A 2). Bei beiden Vektoren pUTs-*lux* und pUTs-*gfp* handelt es sich um Pir-abhängige Suizidvektoren (Starke *et al.*, 2013), die sich nur in Bakterienstämmen, die ein Pir-

Protein synthetisieren können (*E. coli* S17.1 λ pir), erfolgreich replizieren können. Der Vektor pUTs-*gfp* verwendet *gfp* (*green fluorescence protein*, GFP) als Reporter gen, welches für ein grün fluoreszierendes Protein, isoliert aus *Aequoria victoria*, kodiert (Chalfie *et al.*, 1994). Die Lumineszenzkassette (*luxCDABE*) kodiert für ein Luziferase-Enzymsystem, welches durch eine katalytische Reaktion von Luziferin mit Sauerstoff Licht produziert. Für eine chromosomale Integration der Reportergene werden 300 bp große DNA-Fragmente stromaufwärts der Gene, vor denen sich der putative Promotor befindet, aus dem *S. Typhimurium* ST4/74 Genom amplifiziert (2.2.4.1). Die dazu verwendeten Primer sind im Anhang Tabelle A 5 angegeben. Mit den Enzymen *SacI* und *KpnI* bzw. *SacI* und *XmaI* (2.2.5.1) können die Fragmente in den Vektor pUTs-*lux* mittels Restriktionsverdau (2.2.5.2) und Ligation (2.2.5.3) eingebracht werden. In den pUTs-*gfp* Vektor erfolgt das Klonieren der DNA-Fragmente mit den Enzymen *NotI* und *KpnI*. Durch Elektroporation (2.2.6.2) werden die Ligationsprodukte in den *E. coli* Stamm S17.1 eingebracht und die resultierenden Klone durch Kolonie-PCR (2.2.4.2) auf eine korrekte Integration des PCR-Fragments in den Vektor überprüft. Die Konjugation (2.2.6.1) ermöglicht die Übertragung der Plasmide in den Endstamm *S. Typhimurium* ST4/74. Da diesem Stamm das Pir-Protein fehlt, sind die Plasmide gezwungen, sich durch homologe Rekombination in das Genom von *S. Typhimurium* ST4/74 zu integrieren. Die *S. Typhimurium* ST4/74 Exkonjuganten werden auf Nalidixin- und Chloramphenicol-haltigen LB-Platten selektiert. Die Überprüfung des korrekten Einbaus des Plasmids erfolgt mittels Kolonie-PCR (2.2.4.2).

2.2.7.2 Herstellung von Deletionsmutanten

Die Herstellung der Deletionsmutanten wird gemäß der Methode von Datsenko&Wanner (Datsenko and Wanner, 2000) durchgeführt. Dabei erfolgt mittels homologer Rekombination ein Austausch des Gens durch eine Kanamycin-Resistenzkassette und im folgenden Schritt entfernt eine weitere Rekombinase die Kanamycin-Resistenzkassette mittels FRT-Stelle, wodurch eine markerfreie Mutante resultiert.

Vorbereitend dazu müssen zunächst elektrokompente Zellen vom Wildtyp-Stamm hergestellt werden, in die das Plasmid pKD46 transformiert (2.2.6.2) werden kann. Die Inkubation erfolgt hier bei 30 °C, da es sich bei pKD46 um ein Plasmid mit temperatursensitivem Replikationsursprung (*origin of replication*, *ori*) handelt. Parallel dazu wird ein spezifisches DNA-Fragment mittels PCR (2.2.4.1) hergestellt. Die Primer (Tabelle A 5) haben eine Länge von 69 bzw. 70 Nukleotiden, von denen 50 Basen homolog zu den flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens und die restlichen 19 bzw. 20 Basen zu einem Teil der Kanamycin-Resistenzkassette des Vektors pKD4 sind.

Als Template der PCR dient das Plasmid pKD4 (2.2.4.1). Das gewonnene PCR-Fragment besteht somit aus einer Kanamycin-Resistenzkassette, die von homologen Bereichen des zu deletierenden Gens flankiert ist. Nach der Aufreinigung des PCR-Fragmentes (2.2.4.4) und dessen Konzentrationsbestimmung (2.2.2.10) wird es durch Elektroporation in den Wildtyp-Stamm, der das Plasmid pKD46 besitzt, eingefügt (2.2.6.2). Die Integration des PCR-Fragmentes in das Genom des Wildtyp-Stammes erfolgt durch homologe Rekombination, wobei das zu deletierende Gen ersetzt wird. Für den Austausch verantwortlich ist die *Red* Rekombinase, die auf dem Plasmid pKD46 kodiert ist und durch Zugabe des Induktors L-Arabinose (1 mM) aktiviert wird. Nach der Transformation werden die Zellen auf Kanamycin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und bei 37 °C angezogen. Durch mehrmaliges Passagieren auf Kanamycin-haltigen LB-Platten bei 37 °C kommt es aufgrund der Temperatursensitivität zu einem Verlust des Plasmids pKD46. Kontrolliert wird dies durch einen parallelen Kontrollausstrich auf Ampicillin-haltigen LB-Platten, da das Plasmid pKD46 eine Ampicillin-Resistenzkassette aufweist. Im nächsten Schritt wird von diesem Stamm ein Phagenlysat hergestellt und eine Phagentransduktion (2.2.6.3) in einen frischen *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp-Stamm durchgeführt. Der Grund hierfür ist die starke Aktivität der *Red* Rekombinase, die zu weiteren, jedoch ungezielten Mutationen im Genom führen und einen entsprechend unbeabsichtigten Phänotyp zur Folge haben kann. Daher wird die Kanamycin-Resistenzkassette mittels des Phagen P22 in einen von der *Red* Rekombinase unberührten Wildtyp-Stamm eingefügt. Nachdem der Stamm phagenfrei ist, erfolgt eine Kontrolle mittels Kolonie-PCR (2.2.4.2). Daraufhin werden erneut kompetente Zellen hergestellt und das Plasmid pCP20 hineintransformiert (2.2.6.2). Die Zellen werden über Nacht auf Chloramphenicol-haltigen LB-Platten bei 30 °C inkubiert. Das Plasmid pCP20 kodiert für eine FLP Rekombinase, die die Kanamycin-Resistenzkassette durch homologe Rekombination an den FRT-Stellen entfernt. Durch mehrmaliges Passagieren auf Nalidixin-haltigen Platten bei 37 °C wird das Plasmid aufgrund seiner Temperatursensitivität entfernt. Kontrollausstriche erfolgen auf Kanamycin- (Nachweis der Entfernung der Kan^R-Resistenzkassette) und Chloramphenicol-haltigen Platten (Nachweis der Entfernung des Plasmids pCP20). Zur Überprüfung der Deletion wird eine Kontroll-PCR angesetzt (2.2.4.2) und der Bereich sequenziert (2.2.8).

2.2.7.3 Herstellung von Komplementationsstämmen

Die Herstellung von Komplementationsstämmen ist notwendig zum Nachweis, dass ein phänotypischer Effekt einer Deletionsmutante auf die Abwesenheit des Gens zurückzuführen ist und nicht auf Nebenmutationen basiert. Die Komplementationsmutante sollte in der Lage sein, diesen phänotypischen Effekt zu kompensieren. Als Komplementationsplasmid dient der Vektor pBR322, bei dem es sich um ein *low-copy* Plasmid, d.h. es liegt in geringer Kopienzahl (15-20-fach) in der Zelle vor,

handelt. Für die Herstellung des Komplementationsstammes werden das zu komplementierende Gen durch eine Standard-PCR amplifiziert (2.2.4.1), mittels der Enzyme PstI und PvuI verdaut (2.2.5.1) und in den mit denselben Enzymen verdauten und dephosphorylierten (2.2.5.2) Vektor pBR322 ligiert (2.2.5.3). Das Ligationsprodukt wird in *E. coli* Top10 transformiert (2.2.6.2) und die erfolgreiche Insertion mittels Kolonie-PCR (2.2.4.2) überprüft. Ausgehend von positiven Klonen wird eine Plasmidpräparation (2.2.2.1) durchgeführt und durch Sequenzierung auf die korrekte Nukleotidsequenz hin überprüft (2.2.8). Das Komplementationsplasmid kann anschließend in den Deletionsstamm transformiert werden (2.2.6.2).

2.2.8 Sequenzierung von DNA

2.2.8.1 Kontroll-Sequenzierung zur Überprüfung von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Die Kontroll-Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wird vom Unternehmen GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dazu werden 20 µl des Primers (Konzentration: 10 pmol/µl) und 20 µl des Plasmids (Konzentration: 30-100 ng/µl) oder PCR-Fragments (Konzentration: 10-50 ng/µl) eingeschickt. Die Sequenzierung der Proben erfolgt dort mittels der **SUPREMERUN**-Technik (Sanger-Sequenzierung). Die Sequenzen können anschließend mit den *in silico* konstruierten Sequenzen bei Clone Manager und BioEdit verglichen werden.

2.2.8.2 Sequenzierung Transkriptom

Die Sequenzierung der cDNA Bibliothek (2.2.2.8) erfolgt mittels des Gerätes Illumina HiSeq2500 (Illumina, Inc., Investor Relations, San Diego, CA, USA). Es handelt sich um einen *multiplexed single-indexed, single-read* Lauf, bei dem ein *Read* 51 Zyklen lang ist. Als Programm nutzt der HiSeq2500 die Software HiSeq Control 2.2.58. Mit Hilfe des Programmes CASAVA BCL2FASTQ Conversion Software 1.8.3 werden die Daten in fastq-Dateien umgewandelt.

2.2.8.3 Sequenzierung der Bakteriengemeinschaft im Mäusedarm

Zur Bestimmung der bakteriellen Zusammensetzung im Darm, werden Kotproben von Mäusen in 1 ml *Stool DNA Stabilizer* (Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Isolierung der chromosomalen DNA und die Amplifizierung der bakteriellen 16S rRNA Gene erfolgt in der *ZIEL Core Facility: Mikrobiom / Next-Generation-Sequencing (NGS)* der TU München (Lagkouvardos *et al.*, 2015). Abschließend werden die

Proben in dieser *ZIEL Core Facility* mittels einer MiSeq (Illumina, Inc., Investor Relations, San Diego, CA, USA) sequenziert.

2.2.9 Bioinformatische Methoden

Verschiedene Computerprogramme und Online-Plattformen werden zur genaueren Untersuchung des genomischen Bereiches, der für das putative Galaktitol-Aufnahmesystem kodiert, eingesetzt. Dazu gehören die Identifizierung bzw. Vorhersage putativer Promotoren und Terminatoren und ebenso die phylogenetische Verbreitung der genomischen Insel und ihre genetische Organisation in verschiedenen *Salmonella*-Stämmen. Des Weiteren erfolgt die Analyse der bakteriellen Zusammensetzung im Darm und des *Salmonella*-Transkriptoms aus *in vivo Salmonella*-Infektionsstudien durch Sequenzauswertung mittels verschiedener Programme.

Zur *in silico* Klonierung wird das Programm Clone Manager Professional 9.4 verwendet, da es passende Restriktionsschnittstellen finden, Moleküle schneiden und deren Enden nach Modifizierung auch ligieren kann. Des Weiteren werden mit diesem Programm Primer und Sequenzalignments erstellt. Das Programm arbeitet im cm5-Format, kann aber ebenfalls FASTA-Formate erstellen und bearbeiten. Zusätzlich dazu wird zur Alignmentserstellung ClustalΩ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) verwendet, eine Nachfolger-Online-Plattform von ClustalW, das vom *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) entwickelt wurde. Für die Translation von Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wird das Programm ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) verwendet. Das Programm BPROM von Softberry (<http://www.softberry.com/>) wird zur Vorhersage von putativen Promotoren herangezogen.

2.2.9.1 Phylogenetische Stammbaumanalysen

Alle 10 Gene des genomischen Bereichs, der für das putative Galaktitol-Aufnahmesystem kodiert, werden einzeln mittels des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), welches vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) entwickelt wurde, auf ihr Vorkommen in weiteren Bakterienstämmen überprüft (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die Suche wird sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene durchgeführt.

Mit Hilfe des Programms Mega6 (<http://www.megasoftware.net/>) können Alignments auf Nukleotid- oder Aminosäureebene durchgeführt werden und phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen ermittelt werden. In diesem Programm erfolgt das Alignment mittels ClustalW oder MUSCLE. Für die Darstellung der phylogenetischen Stammbäume werden die Algorithmen Neighbor-Joining und Maximum Likelihood verwendet.

2.2.9.2 Auswertung Bakterienzusammensetzung im Darm

Zur Analyse der bakteriellen Vielfalt im Mäusedarm werden die fastq-Dateien der MiSeq (2.2.8.3) auf den Internetserver IMNGS (*integrated microbial NGS platform*; <https://www.imngs.org/>) hochgeladen (Lagkourdos *et al.*, 2016). Dort erfolgt die Zuordnung der 16S rRNA Sequenzen in einzelne *operational taxonomic units* (OTUs). Die OTUs-Sequenzen werden mittels des Programmes RStudio in folgenden 5 Schritten weiter bearbeitet:

1. Normalisierung der sequenzierten *Read*-Anzahlen
2. Bestimmung der α -Diversität
3. Bestimmung der β -Diversität
4. Taxonomische Zuordnung der OTUs
5. Statistische Auswertung der einzelnen OTUs im Hinblick auf ihr Vorkommen

Die Vorlage der Auswertung liefert das *ZIEL Core Facility: Mikrobiom / Next-Generation-Sequencing (NGS)* der TU München (Lagkourdos *et al.*, 2017).

2.2.9.3 Transkriptomdatenauswertung

Die fastq-Dateien (2.2.8.2) werden auf den Internetserver Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) hochgeladen. Auf diesem Server werden die Daten mittels Bowtie2 auf das Genom von *S. Typhimurium* ST4/74 *gemappt* (Zuordnung einer Sequenz auf seine entsprechende Stelle im Genom). Das Genom und die jeweils *gemappten* Sequenzen können in dem Programm Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>) dargestellt werden. Unter Umständen ist im Vorfeld eine Sortierung der *Reads* nach Koordinaten notwendig. Dies erfolgt über das IT-Werkzeug Picard (<http://sourceforge.net/projects/picard/files/picard-tools>). In Artemis kann eine Datei erstellt werden, welche die Anzahl der Reads pro Gen in Tabellenformat aufzeigt. Mittels des Programmes *R* erfolgt die statistische Analyse der Sequenzdaten.

2.2.10 *in vitro* Quantifizierung der Biolumineszenz und Fluoreszenz

Zur Bestimmung der Promotoraktivität werden verschiedene Reportergene, deren Genproduktaktivität gemessen werden kann, verwendet (2.2.7.1). Die Stärke des Reportersignals ist abhängig von der Promotoraktivität und entspricht der Expression des zu untersuchenden Gens.

2.2.10.1 Visualisierung der Genexpression mit dem Xenogen In Vivo Imaging System

Mit Hilfe des *Xenogen In Vivo Imaging Systems* (IVIS) der Firma Xenogen Corporation (Alameda, Kalifornien, USA) kann die Expression der Gene bildlich dargestellt werden. Es handelt sich hierbei um eine hoch sensitive, nicht invasive Methode die genetische Aktivität von lebenden Organismen in Echtzeit zu bestimmen. Dabei können beide Reportersysteme, *gfp* und *luxCDABE*, verwendet werden. Zur Messung werden die Reporterstämme auf LB-Platten oder selektiven M9-Platten ausgestrichen und 24 bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert. Zur Visualisierung werden die Platten in die Detektionskammer gelegt. Das Emissionslicht wird durch eine *cooled charge-coupled device* (CCD)-Kamera (C2400-75H, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) gemessen und anschließend mittels des Programms *Xenogen Controls and Analysis Software Living Image™* V. 4.01 ausgewertet.

2.2.10.2 Quantifizierung der Genexpression mit dem Wallac Victor3

Für die Quantifizierung der Genexpression wird eine Bakterien-ÜNK in frisches Medium 1:100 überimpft und bei 37 °C in Mikrotiterplatten inkubiert. Die stündliche Messung erfolgt im Mikrotiterplatten-Leser *Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter* (PerkinElmer, Massachusetts, USA) und wird als technisches Triplikat durchgeführt. Pro Messung wird dabei die OD₆₀₀ (600 nm für 0,1 s) und die Fluoreszenz- (Fluorescein, 485 nm für 0,1 s) bzw. Lumineszenzstärke (490 nm für 0,1 s) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit Microsoft Excel. Die Biolumineszenzwerte werden als relative Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) angegeben, da sie mit den entsprechenden OD₆₀₀-Werten normalisiert (RLU/OD₆₀₀) werden. Bei den Fluoreszenzmessungen wird die Eigenfluoreszenz des Wildtyp-Stammes (ohne Fluoreszenzkassette) abgezogen und ebenfalls mit den OD₆₀₀-Werten normalisiert (Fluoreszenz/OD₆₀₀).

2.2.10.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine zeitliche und räumliche Lokalisierung eines fluoreszenzmarkierten Proteins in der Bakterienzelle. Dabei werden 10 µl einer geeigneten Bakterienkultur, die unter entsprechenden Bedingungen angezogen wird, zu verschiedenen Zeitpunkten auf einen Objektträger pipettiert und mikroskopiert. Das Präparat kann unter dem BX51-Mikroskop (Olympus, Hamburg, D) betrachtet werden, in dem Hellfeld-Filter-Aufnahmen und anschließend Fluoreszenzaufnahmen unter Anregung mit UV-Licht im geeigneten *gfp*-Filter angefertigt werden. Die Bildaufnahmen erfolgen bei 100-facher Vergrößerung mit einer

Belichtungszeit von 1 s (soweit nicht anders vermerkt). Die Digitalisierung der Ergebnisse erfolgt mittels des Programms *F-cell* (Olympus, Hamburg, D).

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Präparation von Proteinen aus dem Gesamtzellextrakt von *S. Typhimurium*

Für eine schnelle und effiziente Optimierung der Überexpressionsrate eines speziellen Gens, wird der Gesamtzellextrakt auf ein SDS-Gel aufgetragen, da diese Methode schnell und effizient ist. Dazu werden 50 ml LB-Medium 1:100 mit einer ÜNK angeimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zur gewünschten OD₆₀₀ inkubiert. Im Falle einer Untersuchung der Expressionskinetik werden bei einer OD₆₀₀ von 0,5 zur Induktion L-Arabinose (0,2 %) dazugegeben und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen. Dabei werden 1,5 ml der Kultur abgenommen, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 10 min bei 4 °C und 12.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 80 µl Milli-Q-Wasser und 20 µl Laemmli-Puffer resuspendiert. Nach zehninütiger Inkubation bei 100 °C wird noch einmal 1 min bei 12.000 g abzentrifugiert und die Probe anschließend bei -20 °C eingefroren oder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (2.3.4).

5-fach Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970)	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

2.3.2 Überexpression von Proteinen in *S. Typhimurium*

2.3.2.1 Herstellung der pBAD (Amp^R)-Konstrukte

Für die Überexpression wird das zu überexprimierende Gen in die beiden Vektoren pBAD-His und pBAD-Myc/His (Invitrogen) kloniert. Nach der Standard-PCR (2.2.4.1) werden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels HindIII und XhoI verdaut (2.2.5.1) und mit den verdauten und dephosphorylierten (2.2.5.2) Vektoren pBAD-His und pBAD-Myc/His ligiert (2.2.5.3). Die Plasmide unterscheiden sich darin, dass der pBAD-His Vektor ein His₆-Tag stromaufwärts der *multiple cloning site* (MCS) besitzt, wogegen sich beim pBAD-Myc/His Vektor der His₆-Tag *downstream* der MCS befindet. Daraus resultiert, dass das translatierte Protein einen His₆-Tag am N-terminalen Ende (pBAD-His) bzw. am C-terminalen Ende (pBAD-Myc/His) besitzt. Die Überexpression des entsprechenden Gens kann mittels Arabinose induziert werden, da dem klonierten Gen ein Arabinose-abhängiger Promotor vorangeschaltet ist. Nachdem das Ligationsprodukt in *E. coli* Top10 transformiert ist (2.2.6.2), werden die Konstrukte mit Hilfe einer Kolonie-PCR (2.2.4.2) und einer Sequenzierung (2.2.8.1) auf ihre

Richtigkeit hin überprüft. Die korrekten Überexpressionsvektoren werden zum Schluss mittels Elektroporation (2.2.6.2) in den Bakterienstamm ST4/74 $\Delta araA$ eingebracht.

2.3.2.2 Expression heterologer Proteine mit Hilfe von pBAD-*Myc/His*

Aufgrund der Fähigkeit von *S. Typhimurium* ST4/74, Arabinose unter natürlichen Bedingungen zu metabolisieren, werden für die Überexpression Stämme verwendet, die einen Defekt im Arabinose-Stoffwechsel aufweisen. Für die Überexpression werden 400 ml LB-Medium 1:100 mit einer ÜNK der oben erwähnten Stämme angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Überexpression erfolgt durch Zugabe von 0,2 % Arabinose. Nach 4 h wird die Kultur abzentrifugiert (7 min bei 6.500 g) und das Pellet bei -20 °C weggefroren.

2.3.2.3 Zellaufschluss mittels French Pressure Cell

Bei der *French Pressure Cell* erfolgt der Zellaufschluss durch einen starken Druckabfall und die dabei entstehenden Scherkräfte. Hierbei wird im Vorfeld das Pellet aus 2.3.2.2 in 5 ml Lyse-Puffer gelöst und zusätzlich 0,5 mM Proteasehemmer (Pefablock), 12,5 μ l Lysozym (10 mg/ml) und 12,5 μ l DNase I (1 U/ μ l) dazugegeben. Im Anschluss werden die Zellen in die vorgekühlte Zelle der *French Pressure Cell* (SLM Instruments, Inc., Rochester, New York, USA) überführt. Dort werden die Bakterienzellen einem hohen Druck zwischen 800 und 900 psi ausgesetzt. Indem sie anschließend durch eine schmale Öffnung in einem Bereich ohne Überdruck gepresst werden, kommt es zu einem starken Druckabfall, der die Zellen zum Platzen bringt. Dies wird so noch zweimal wiederholt und die Zellen im Anschluss auf Eis gelagert. Nach dem Zellaufschluss durch die *French Pressure Cell* wird das Zelllysate zweimal 30 min bei 6.500 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wird sterilfiltriert und für die Affinitätschromatographie weiter verwendet (2.3.2.4)

Lyse-Puffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH 8,0

2.3.2.4 Isolierung von Proteinen aus *S. Typhimurium* mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie erfolgt die Trennung von Biomolekülen oder Proteinen durch eine reversible Interaktion mit einem spezifischen Ligand, der an eine chromatographische Matrix gebunden ist. Für die Isolierung der Proteine aus *S. Typhimurium* wird der *Äktapurifier*TM (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) verwendet. Hierbei erfolgt die Aufreinigung durch eine sogenannte immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Die IMAC nutzt die Fähigkeit der Aminosäure Histidin an Übergangsmetallchelate (*chelated transition metal ions*), z.B Nickel (Ni^{2+}), zu binden. Dazu muss das Zielprotein mit einem His₆-Tag versehen sein, der mit Ni^{2+} einen Komplex ausbilden kann. Der His₆-Tag ist einer der am häufigsten genutzten Tags, da es sich hierbei um einen kleinen Protein-Tag handelt, der selten mit der Funktion, Aktivität oder Struktur des Zielproteins interferiert. Etwa vorhandene Oberflächen-exponierte Histidinreste können in Proteinen zu unspezifischen Bindungen führen. Da die Bindungsaffinität von diesen Proteinen aber oft geringer ist als die eines mit einem His₆-Tag versehenen Proteins, ist die Trennung unter stringenteren Bedingungen möglich. In den meisten Fällen wird deswegen Imidazol als kompetitives Agens hinzugenommen.

Für die Aufreinigung des Zielproteins mit dem *Äktapurifier* wird eine HisTrap-HP-1 ml Säule der Firma GE Healthcare verwendet. Die HisTrap-HP-1 ml Säule besteht aus Polypropylen, das keine Interaktion mit Biomolekülen aufweist. Außerdem ist sie mit *Ni²⁺ Sepharose High Performance* bepackt, einer stark quervernetzten Agarose mit einer Porengröße von 34 μm , durch die die Proteine laufen müssen. Durch die Verwendung dieser kleinen Porengröße bilden sich klare Peaks mit hohen Zielproteinkonzentrationen. Die Probe (2.3.2.3) wird auf die HisTrap-HP-1 ml Säule aufgetragen und läuft im Lysepuffer über die Säule. Das Zielprotein bindet dabei an den Liganden, wobei unspezifische Proteine heraus gewaschen werden. Die Durchflussrate beträgt dabei 1 ml pro Minute. Die Elution des Zielproteins erfolgt mit einem Elutionspuffer, bei dem die Imidazol-Konzentration stufenweise von 10 mM auf 500 mM ansteigt. Mit Hilfe des Fraktionierers (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) wird das Eluat in je 0,5 ml Volumen gesammelt. Der Teil des Aliquots mit dem Zielprotein wird zur Überprüfung der Reinheit auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das restliche Protein wird bei -80 °C eingefroren, nachdem die Konzentration mittels der Methode nach Bradford (2.3.3) bestimmt wurde. Zur kurzfristigen Lagerung kann das Protein bei 4 °C gelagert werden.

Lyse-Puffer	50 mM	NaH_2PO_4
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH 8,0

Elutions-Puffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
		pH 8,0

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Um die Konzentration von gelösten Proteinen zu bestimmen wird die Lösung Roti®-Quant der Firma Roth verwendet, deren Wirkmechanismus auf der Bradford-Methode basiert. Dabei bildet sich ein Komplex zwischen dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 und dem Protein, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm führt. Die Absorptionsänderung ist dabei proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Die Proteinbestimmung erfolgt im Mikrotiterplattenformat. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe im Bereich 20-100 µg/ml mit dem als Standard mitgeführtem Protein BSA hergestellt und 50 µl jeder Verdünnungsstufe mit je 200 µl der Bradford Arbeitslösung (2 Teile 5-fach Roti®-Quant mit 5,5 Teilen H₂O_{dd}) vermischt. Parallel dazu werden Verdünnungen (1:20 und 1:40) von der zu messenden Probe aus 2.3.2.4 hergestellt und ebenso mit der Bradford Arbeitslösung vermischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die OD₆₀₀ im Plattenleser *Wallac Victor*³ gemessen.

Mit Hilfe der bekannten BSA Proteinmengen und der dazugehörigen optischen Dichte kann eine Standardkurve ermittelt werden, mit der die Proteinkonzentration der unbekannt Probe errechnet werden kann.

2.3.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung von Proteinen erfolgt in einem Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-Gel). Das Gel wird aus Acrylamid hergestellt, welches nach Zugabe des Radikalenspenders Ammoniumpersulfat (APS) und dem Katalysator TEMED polymerisiert und ein gleichmäßiges Gel bildet. Da es sich bei Acrylamid um ein starkes Nervengift handelt, das hauptsächlich über die Haut, aber auch über Atemwege und Gesichtsschleimhäute, aufgenommen werden kann, wird die weniger gefährliche Rotiphorese-Fertiglösung verwendet. Durch die Zugabe von SDS und dessen Bindung wird die Eigenladung der Proteine maskiert (ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein). Dadurch reduziert sich die Trennung der Proteine im Gel schließlich auf die Kettenlänge und Molekülmasse. Als Größenstandard dient der Marker *PageRuler*TM *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

12,5 %iges Trenngel (für 2 Gele)	6,25 ml	Rotiphorese® 30 % (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)
	3,75 ml	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
	1,42 ml	99 % Glycerin
	100 µl	15 % (w/v) SDS
	3,32 ml	Milli-Q-Wasser
	10 µl	TEMED
	150 µl	10 % (w/v) APS
6 %iges Sammelgel (für 2 Gele)	1,1 ml	Rotiphorese® 30 % (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)
	0,6 ml	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
	50 µl	15 % (w/v) SDS
	3,2 ml	Milli-Q-Wasser
	3 µl	TEMED
	50 µl	10 % (w/v) APS
10-fach SDS-Laufpuffer	250 mM	Tris-Base
	1920 mM	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
		ad 1000 ml Milli-Q-Wasser

2.3.5 Gelmobilitätsstudien

Gelmobilitätsstudien (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) sind eine geeignete Methode, um Protein-DNA-Interaktionen zu untersuchen. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass ungebundene DNA in einem nativen Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzt als DNA-Protein-Komplexe. Mit zunehmender Menge an Protein ist daher im nativen Gel ein *Shift* der DNA-Fragmente zu erkennen. In jedem Ansatz wird zusätzlich ein DNA-Kontrollfragment mitgeführt zum Nachweis, dass keine unspezifischen Bindungen zwischen DNA und Protein vorliegen. Verwendet wird hierbei ein Abschnitt aus dem *argS* Gen, welches für eine Arginin-tRNA-Synthetase kodiert. Bei der experimentellen Durchführung muss zuerst der gewünschte Genombereich, hier die Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} , amplifiziert (2.2.4.1) und aufgereinigt (2.2.4.4) werden. In einem Ansatz werden jeweils 50 ng des DNA-Kontrollfragmentes und 50 ng des zu untersuchenden DNA-Fragmentes mit 4 µl 5-fach TBE-Puffer vermischt. Das Protein wird in aufsteigender Konzentration beigemischt. Die Proben werden mit Milli-Q-Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Nach 45 min Inkubation bei RT können die Proben auf ein nicht-denaturierendes Gel aufgetragen werden. Zuvor werden sie mit 4 µl 6-fach Orange Loading Dye gemischt. Als Marker dient der *Gene Ruler DNA Ladder Mix* der Firma Thermo Scientific (Braunschweig, D). Die Proben werden im elektrischen Feld bei 120 V und 4 °C aufgetrennt. Anschließend können die Banden nach

Färbung im Gel-Red-Bad mittels UV-Transillumination bei 320 nm im ImageMaster® (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) sichtbar gemacht werden. Bei Verwendung des CRP-Proteins wird zur besseren Auftrennung sowohl im Proben-Ansatz als auch im nativen Polyacrylamid-Gel und dem 1-fach TBE Laufpuffer noch als Cofaktor das zyklische Adenosin-Monophosphat (cAMP; 20 µM) zugefügt.

10-fach TBE Puffer	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
		ad 1000 ml Milli-Q-Wasser
5-fach TBE Puffer	54 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
		ad 1000 ml Milli-Q-Wasser
12 %iges natives PAGE-Gel (für 2 Gele)	4,8 ml	Rotiphorese® 30 % (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)
	3 ml	5-fach TBE Puffer
	7 ml	Milli-Q-Wasser
	15 µl	TEMED
	150 µl	10 % (w/v) APS
1-fach TBE-Laufpuffer	20 ml	10-fach TBE Puffer
	980 ml	Milli-Q-Wasser

2.3.6 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis eines Proteins werden beim Western Blot Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen und mittels Antikörper detektiert. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgt mittels SDS-PAGE (2.3.4). Zur Vorbereitung des Western Blots werden zum einen die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) auf die Größe des SDS-Gels (ca. 8 cm*10 cm) und zum anderen Whatmanpapiere auf eine Größe von 10 cm*11 cm zurecht geschnitten. Nachdem die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt worden sind, werden drei Whatmanpapiere, die zuvor mit Blotpuffer getränkt worden sind, luftblasenfrei auf eine Blotapparat einer Semi-Dry-Blotter gelegt.

Die PVDF-Membran wird zuerst 10 s in 100 %igem Methanol getränkt und anschließend 5 min in bidestilliertem Wasser gewaschen, um dann 10 min im Blotpuffer äquilibriert zu werden. Das SDS-Gel wird parallel dazu 10 min im Blotbuffer äquilibriert und kann dann auf die drei Whatmanpapiere gelegt werden. Die PVDF-Membran wird auf das SDS-Gel überführt. Beim Schichten muss beachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen. Nachdem drei weitere Whatmanpapiere die Membran bedecken, kann die Apparatur an den Spannungsregler angeschlossen und 30 min bei 12 V betrieben werden. Im Anschluss wird die Membran über Nacht bei 4 °C in TBS-T Puffer mit 5 % (g/v) Magermilchpulver unter Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wird die PVDF-Membran zweimal für jeweils 10 min in TBS-T Puffer gewaschen. Währenddessen wird der 1. Antikörper (Anti-His₆-Tag-Antikörper aus der Maus) 1:2000 mit 1-fach TBS-T, versetzt mit 10 % (v/v) FCS, verdünnt. Die PVDF-Membran wird 1 h schüttelnd bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgen zwei Waschschrte mit TBS-T, bevor der 2. Antikörper (1:10000 verdünnt mit TBS-T und 10 % FCS) dazugegeben wird und das Ganze 1 h bei RT schüttelnd inkubiert wird. Nach zwei weiteren zehnminütigen Waschschrten mit TBS-T Puffer wird die Membran in AP-Puffer 2 min äquilibriert und die Membran anschließend in der Detektionslösung gefärbt. Zum Beenden der Detektion wird eine 3 %ige TCA-Lösung dazugegeben. Die Membran kann jetzt zwischen zwei Whatmanpapieren getrocknet und im Dunkeln gelagert werden.

10-fach Blotpuffer	143 g	Glycin
	30 g	Tris-HCl
	10 g	SDS
		ad 1000 ml Milli-Q-Wasser
1-fach Blotpuffer	100 ml	10-fach Blotpuffer
	200 ml	Methanol
	700 ml	Milli-Q-Wasser
10-fach TBS	100 mM	Tris (pH 8,0)
	1,5 M	NaCl
TBS-T	100 ml	10-fach TBS
	1 ml	Tween20
	899 ml	Milli-Q-Wasser

AP-Puffer	100 mM	Tris-HCl (pH 9,5)
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
Detektionslösung	132 µl	BCIP (50 mg/ml in DMF)
	66 µl	NBT (50 mg/ml in 70%igem DMF)
		ad 10 ml AP-Puffer

2.4 *in vivo* – Mäusversuche

Die Tierversuche wurden mit Erlaubnis der Regierung von Oberbayern unter der Genehmigungsnummer 55.2-1-54-2532-214-2014 durchgeführt.

2.4.1 Mausstamm

Für die durchgeführten Tierversuche werden Mäuse des Stammes C57/BL6 verwendet, die von der SPF-Haltung des Kleintierforschungszentrums Weihenstephan, Gregor-Mendel-Str. 2, 85350 Freising stammen. Ort der Versuchstierhaltung sind die Räume: U/3.07 und U/3.03 im Gebäude Nr. 4124, ZIEL, Abteilung Mikrobiologie, Weihenstephaner Berg 3, Freising.

2.4.2 Haltungsbedingungen

2.4.2.1 Tierhaltung

Die Tiere haben nach dem Transport aus der *specific pathogen free* (SPF) – Haltung der Gregor-Mendel-Str. 2 in den Raum U/3.07 der Abteilung Mikrobiologie (ZIEL, Weihenstephaner Berg 3) eine Woche Zeit, sich an die neuen Haltungsbedingungen zu akklimatisieren. Die Unterbringung erfolgt in *Individually Ventilated Cages* (IVCs; Sealsafe Plus®, Tecniplast), die nach heutigem Stand der Technik für hygienisch optimale Bedingungen sorgt. Zur Gewährleistung einer durchgehenden Belüftung sind die Käfige mit einem RettungsfILTER versehen. Pro Käfig werden 2-6 Mäuse in einer Gruppe gehalten. Die Umsetzung der Tiere in frisch autoklavierte Käfige mit frischem Einstreu erfolgt einmal wöchentlich. Zur Verbesserung der Haltungsbedingungen wird neben dem Einstreu noch Nestmaterial und ein für Mäuse lichtundurchlässiges Häuschen, das als Unterschlupf dient, bereitgestellt.

2.4.2.2 Reinigung benutzter Käfige

Benutzte Käfige werden für die Sterilisierung in Autoklaviersäcke eingepackt. Die verschlossenen Säcke werden in den Autoklavierraum gebracht und dort 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die sterilen Käfige werden gemäß den Angaben der Firma Tecniplast getrocknet, gewaschen und in sauberem Zustand wieder mit Einstreu und Nestmaterial befüllt. Nach einem weiteren finalen Autoklavierschritt werden die Käfige bis zur Nutzung direkt in den Gestellen des Tierhaltungsraumes in der sogenannten Service-Stellung (2.4.2.4) gelagert.

2.4.2.3 Futter und Wasser

Als Trinkwasser wird sogenanntes „Weichwasser“ verwendet. Durch den Austausch der Ionen im Weichwasser, welche die Wasserhärte ausmachen (Carbonat, Sulfat), sollen Funktionsstörungen der Wasserspender vermieden werden. Die Trinkwasserbehälter werden nach Angaben der Firma Tecniplast befüllt und autoklaviert. Das Futter wird von der Firma Ssniff (Soest, D) bezogen und ist durch Bestrahlung sterilisiert. Futter und Trinkwasser sind für die Mäuse *ad libitum*.

2.4.2.4 Lagerung sauberer Käfige

Die Käfige werden direkt im IVC-Gestell im Tierraum gelagert. Dazu werden sie etwa 2 cm nach vorne gezogen (Service-Stellung). In dieser Position sind sie von der Lüftungseinheit abgetrennt, was Energie einspart.

2.4.2.5 Räume

Die Räume sind vollklimatisiert und werden konstant auf 22 °C und ca. 55 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Beleuchtung folgt einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus.

2.4.2.6 Wartungen

Die Filter der Klimaanlage werden regelmäßig überprüft und bei Bedarf ausgewechselt. Ebenso wird die gesamte IVC-Anlage in einem von der Betriebsdauer bestimmten Turnus von Technikern der Herstellerfirma Tecniplast kontrolliert und dabei die Filter der IVC-Käfige bei Bedarf ausgetauscht.

2.4.2.7 Hygienemanagement

Alle Räume, die in der Tierhaltung oder zu Tierversuchszwecken Verwendung finden, werden regelmäßig gereinigt und auf äußere Kontaminationsquellen kontrolliert. Die aus der SPF-Haltung bezogenen Mäuse sind speziell pathogenfrei bezüglich der Erreger, die in dem Artikel „Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units“ von Werner Nicklas (Nicklas *et al.*, 2002) aufgelistet sind. Zusätzlich sind sie frei von Noroviren. Da die Mäuse in IVC-Käfigen gehalten werden, sind sie nur erwartbaren Umweltkeimen ausgesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen werden die Tiere nur für einen

möglichst kurzen Zeitraum und nur für den Zweck des Versuches in den Räumen der Abteilung Mikrobiologie untergebracht (maximal 28 Tage). Nach dem Tod der Tiere erfolgt eine gründliche Reinigung und Desinfektion der Haltung.

2.4.3 Experimentelle Diäten

In der Eingewöhnungsphase wird den Tieren ein Standardfutter (V1124-733) der Firma Ssniff verabreicht. Nach einer Woche erfolgt ein Wechsel zu den experimentellen Diäten. Die erste experimentelle Diät ist als Western-Diät (Bestellnummer: TD88137) deklariert und wird von der Firma Ssniff bezogen. Es handelt sich hierbei um eine an die westliche Ernährung angelehnte Diät, die hohe Mengen an einfachem Zucker, sowie Proteine und Fette tierischen Ursprungs (Casein, Butter, etc.) enthält. Die zweite experimentelle Diät ist speziell an eine vegetarische Ernährungsweise angelehnt. Diese Diät beinhaltet Proteine und Fette aus pflanzlichen Produkten (Soja), sowie als Kohlenhydratquelle Polysaccharide statt einfache Zucker. Ebenso ist sie reich an Ballaststoffen. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Diäten ist in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Zusammensetzung der experimentellen Diäten

		TD88137 - Western-Diät	S5745-E750 - pflanzliche Diät
Casein	%	19,5	-
Cholesterol	%	0,21	-
Sojaproteinisolat	%	-	5
Sojaproteinkonzentrat	%	-	20
Sucrose	%	33,44	5
Maisstärke	%	-	41,79
Cellulose	%	5	7
Lignocellulose	%	-	3
FOS /Chicorée Inulin	%	-	2
Apfeltrester	%	-	4
DL-Methionine	%	0,3	0,2
Mineral- und Spurenelemente Mix	%	4,3	3,5
Vitamin - Mix	%	1	1
Calcium	%	0,76	-
Calcium Carbonat	%	-	0,3
Cholin Cl	%	0,2	0,2
Ascorbinsäure	%	0,1	-
Butylhydroxytoluol	%	0,01	0,01
Butterfett	%	21	-
Sojabohnenöl	%	-	7
Annähernde Nährstoffzusammensetzung			
Protein	%	17,5	17,5
Fett	%	21,2	7,3
Ballaststoffe	%	5	12,7
Mineralelemente	%	4,5	4,9

Stärke	%	14,6	40,8
Zucker	%	33,2	7,2
Calcium	%	0,76	0,73
Phosphor	%	0,46	0,51
Natrium	%	0,37	0,25
Magnesium	%	0,1	-
Kalium	%	0,54	-
<hr/>			
Fettsäuren			
<hr/>			
C 4:0	%	0,8	-
C 6:0	%	0,53	-
C 8:0	%	0,29	-
C 10:0	%	0,63	-
C 12:0	%	0,72	-
C 14:0	%	2,21	-
C 16:0	%	5,74	0,84
C 17:0	%	0,13	0,01
C 18:0	%	2,04	0,25
C 20:0	%	0,04	0,03
C 16:1	%	0,38	0,01
C 18:1	%	4,63	1,8
C 18:2	%	0,38	3,8
C 18:3	%	0,11	0,42
C 20:1	%	0,02	-
<hr/>			
Metabolisierfähige Energie	MJ/kg	19,2	14,6
<hr/>			
Protein	kJ%	15	20
Fett	kJ%	42	19
Kohlenhydrate	kJ%	43	61

2.4.4 Spezifitätstest von Salmonellen-Antikörpern

2.4.4.1 Antikörper-Spezifitätstest mit Bakterienkulturen

Die ÜNKen von jeweils ST4/74 Wildtyp und *E. coli* DH5 α /pBR322 werden ihrer OD₆₀₀ nach angepasst und im Verhältnis 1:1 vermischt. Anschließend erfolgt eine immunomagnetische Aufreinigung (2.4.5.3) und eine Bestimmung der Zellzahl (Koloniebildende Einheiten; KbE) vor und nach der Aufreinigung. Dazu werden die Proben auf Nalidixin-haltigen (Wachstum von ST4/74 Wildtyp) und Tetrazyklin-haltigen Platten (Wachstum von *E. coli* durch pBR322 Plasmid) ausplattiert. Im weiteren Verlauf werden die Stämme zusätzlich auch 1:100 und 1:1000 zu Gunsten des *E. coli*-Stammes vermischt. Ebenso werden verschiedene Verdünnungsstufen der Antikörper ViroStat bzw. BacTrace getestet (unverdünnt, 1:10, 1:100).

2.4.4.2 Antikörper-Spezifitätstest mit Darminhalt als Medium

Die Mäuse, von denen der Darminhalt isoliert wurde, wurden vom Kleintierforschungszentrum bezogen (Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken). Dabei wurde der Darminhalt in verschiedene 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Darminhalt wird mit 10^7 - 10^8 *S. Typhimurium*-Bakterien beimpft. Die Darminhaltsprobe wird mittels *Zirkonia/Silica-Beads* im *Ribolyser* zerkleinert und anschließend mittels der Filter MACS® Smart Strainers (Miltenyi Biotech GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) filtriert. Die Probe wird vor und nach der Auftrennung auf *Salmonella*-spezifischen Platten (*Salmonella-Shigella*-Agar von der Firma Carl Roth) ausplattiert und jeweils die KbE bestimmt. Weiter wird der Darminhalt mit einem Gemisch aus *S. Typhimurium* und *E. coli* DH5 α /pBR322 inokuliert und die Bindefähigkeit des Antikörpers überprüft.

2.4.5 Experimenteller Aufbau des Versuches - *in vivo* Experimente

2.4.5.1 Töten der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgt durch einen Genickbruch. Für die zervikale Dislokation wird ein gerader, fester Gegenstand (Schere) hinter den Ohren der Maus an der Schädelbasis positioniert, während die andere Hand den Schwanz an der Schwanzbasis festhält. Mit einer schnellen, ruckartigen Bewegung drückt man die Schere fest nach unten und zieht gleichzeitig den Schwanz weg vom Körper. Durch diesen Vorgang werden der Schädel und die Wirbelsäule gegeneinander verschoben.

2.4.5.2 Isolierung des Darminhalts aus der Maus

Nachdem die Maus durch einen Genickbruch getötet wurde, wird die Bauchdecke mit einer spitzen Schere geöffnet und der Darm vom After her isoliert. Der Dünndarm wird in drei Teile unterteilt: das Duodenum, das Jejunum und das Ileum. Dem Ileum folgt das Caecum. *S. Typhimurium* vermehrt sich hauptsächlich im Caecum und hinteren Ileum. Daher werden diese Bereiche vom Rest abgetrennt und deren Inhalt in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Gefäß ist zuvor mit 1 ml *RNAlater* und 1 mm *Zirkonia/Silica-Beads* (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) gefüllt worden. Bis zur weiteren Verwendung werden die Proben in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.5.3 Isolierung von *S. Typhimurium* aus dem Darminhalt

Die Isolierung von *S. Typhimurium* erfolgt mittels immunomagnetischer Auftrennung (*immunomagnetic separation*; IMS). Bei dieser Methode wird *S. Typhimurium* an biotinylierte Antikörper gebunden und so mit Hilfe von an magnetische Partikel gebundenem Streptavidin aus dem Darminhalt isoliert. Vor der IMS ist es notwendig, die Probe von groben Partikeln zu befreien. Dazu wird zur aufgetauten Darminhalt-Probe (2.4.5.2) 100 µl TritonX-100 hinzugegeben. Anschließend wird der Darminhalt mit dem *Ribolyser* (FastPrep®-24, MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) zerkleinert (dreimal 45 s bei 6.500 UpM). Um grobe Partikel zu entfernen folgt ein Filtrationsschritt, bei dem der Darminhalt durch 3 Filter (MACS® Smart Strainers) der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) läuft. Die Filter haben eine Porengröße von 100 µm, 70 µm und 30 µm. Damit der Darminhalt schneller durchläuft, wird dieser mit 5 ml einer sterilen PBS/BSA-Lösung, versetzt mit 10 % *RNAlater*, vermischt. Anschließend wird das Ganze 5 min bei 6.500 g pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml PBS/BSA mit 10 % *RNAlater* resuspendiert. Für die IMS werden nun 10 µl *Salmonella*-spezifische Antikörper der Firma ViroStat Inc. (Portland, ME, USA) bzw. der Firma BacTrace (KPL, Inc., Maryland, USA) in einer 1:10 Verdünnung zur Probe gegeben und 10 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 9.600 g wird das Pellet mit gekühltem *Separation* Puffer, versetzt mit 10 % *RNAlater*, gewaschen. Danach wird das Pellet in 100 µl *Separation* Puffer (+ 10 % *RNAlater*) aufgenommen und mit 10 µl Streptavidin-gekoppelten magnetischen Partikeln 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit *Separation* Puffer (+ 10 % *RNAlater*) kann das Pellet in 500 µl *Separation* Puffer (+ 10 % *RNAlater*) resuspendiert werden. Die Aufreinigung von *S. Typhimurium* erfolgt in einem *MidiMACS™ Separator* (Miltenyi Biotec GmbH) über eine *LS Column*-Säule (Miltenyi Biotec GmbH), welche mit *Separation* Puffer (+ 10 % *RNAlater*) äquilibriert worden ist. Nachdem die Probe auf die Säule gegeben wurde, erfolgen 4 Waschschriffe mit *Separation* Puffer (+ 10 % *RNAlater*). Danach wird die *LS* Säule vom Magneten getrennt. Nun wird 1 ml *RNAlater* auf die Säule gegeben und *S. Typhimurium* kann mit Hilfe des vorhandenen Spritzenstößels in ein frisches Eppendorf-Gefäß gedrückt werden. *S. Typhimurium* befindet sich nun im *RNAlater* und können für die RNA-Isolation (2.2.2.3) weiter verwendet werden.

PBS/BSA + 10 % <i>RNAlater</i>	250 ml	1-fach PBS, pH 7,2
	0,5 %	BSA (Biotin-frei)
		Sterilfiltrieren
	10 %	<i>RNAlater</i>

Separation Puffer + 10 % RNAlater	250 ml	1-fach PBS, pH 7,2
	0,5 %	BSA (Biotin-frei)
	2 mM	EDTA
		auf pH 7,4 einstellen
		Sterilfiltrieren
	10 %	RNAlater

2.4.5.4 Bestimmung der Anzahl an *S. Typhimurium* im Kot

Vor dem Töten der Tiere werden jedem Tier 1-2 Kotpellets entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss überführt. Das Gewicht der Kotpellets wird bestimmt und jeweils die zehnfache Menge an sterilem PBS dazugegeben (10 µl PBS bei 1 mg). Mittels 1 mm *Zirkonia/Silica-Beads* werden die Kotproben im *Ribolyser* zerkleinert (3x 45 s bei 6.500 UpM). Danach wird mit sterilem PBS eine Verdünnungsreihe erstellt und jede einzelne Verdünnungsreihe wird im Dreifachansatz auf *Salmonella*-spezifischen Agarplatten (*Salmonella-Shigella*-Agar von der Firma Carl Roth) ausplattiert und die KbE nach Inkubation bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung der erfolgreichen Etablierung der Methode „Isolation von Salmonellen-RNA aus dem Mäusedarm“

Studien zu Transkriptomanalysen eines spezifischen Bakteriums in einer komplexen Mikrobiota stellen bis heute eine Herausforderung dar. Grund dafür ist, dass es durch die Isolation der Gesamt-RNA aller im Darm enthaltenen Bakterien in einem Tiermodell bei der Sequenzierung zu Kreuzhybridisierungen kommen kann, die eine exakte Zuordnung des jeweiligen Transkripts zum zugehörigen Bakterium erschweren bzw. unmöglich machen kann. Ebenso ist die Bakterienkonzentration häufig zu gering, um die erforderliche Menge an RNA zu erhalten, die für eine statistisch aussagekräftige Auswertung notwendig ist. Um die notwendige Mindestmenge an einer spezifischen Bakterien-RNA zu isolieren zu bekommen, wurden solche Versuche mit gnotobiotischen Mäusen durchgeführt (Toledo-Arana *et al.*, 2009). In dieser Arbeit sollte aus Salmonellen-infizierten SPF-Mäusen die Salmonellen-spezifische RNA zu Transkriptomanalysen isoliert werden. Dazu wurde folgende neue Methode entwickelt und optimiert (Abb. 3.1). Nach Auslösen einer künstlichen *S. Typhimurium*-Infektion erfolgte die Tötung der Tiere durch eine zervikale Dislokation. Da *S. Typhimurium* sich vorwiegend im Caecum und hinteren Ileum ansiedelt, wurde die Bauchdecke der Maus mit einer spitzen Schere geöffnet, der Darm präpariert und der Inhalt der beiden Darmabschnitte in einer RNA*later*-Lösung bei -80 °C gelagert. Im weiteren Vorgehen erwies sich die grobe und suspensionsartige Zusammensetzung der Probe als problematisch, da diese ohne weitere Aufbereitung zur Verstopfung der IMS-Säule führte. Um einen kontinuierlichen Fluss durch die IMS-Säule zu gewährleisten, wurden verschiedene Methoden zur Entfernung der groben Partikel getestet. Hierbei erwies sich die Zentrifugation als nicht erfolgreich, da es bei dieser Prozedur zu einem großen Verlust an Salmonellen kam. Alternativ zur Zentrifugation sollten die groben Partikel mit dem *Ribolyser* zerkleinert werden. Durch die Verwendung von 0,1 mm *Zirkonia/Silica-Beads* wurde eine für die Bakterien schonende Bedingung gewählt, die eine Lyse verhinderte. Die Zerkleinerung war erfolgreich, jedoch nicht effektiv genug, da die Probe immer noch für die IMS-Säule zu heterogen war. Daher wurde die ribolysierte Probe durch den Gebrauch von verschiedenen Filtern weiter präpariert. Die effektivste Herangehensweise ergab sich durch die Nutzung von drei Filtern mit abnehmender Porengröße, so dass sich am Ende der Aufreinigung nur Partikel $\leq 30 \mu\text{m}$ in der Probe befanden. Die Isolierung von *S. Typhimurium* aus der homogenisierten Probe erfolgte mittels immunomagnetischer Auftrennung (IMS). Bei dieser Methode wird *S. Typhimurium* an einen biotinylierten Antikörper gebunden und mit Hilfe von an magnetische Partikel gebundenem Streptavidin aus dem Darminhalt isoliert. Die Wahl des Antikörpers und Optimierung der IMS erfolgte in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2.

Vom Darmbakterium hin zum Salmonellen-Transkriptom

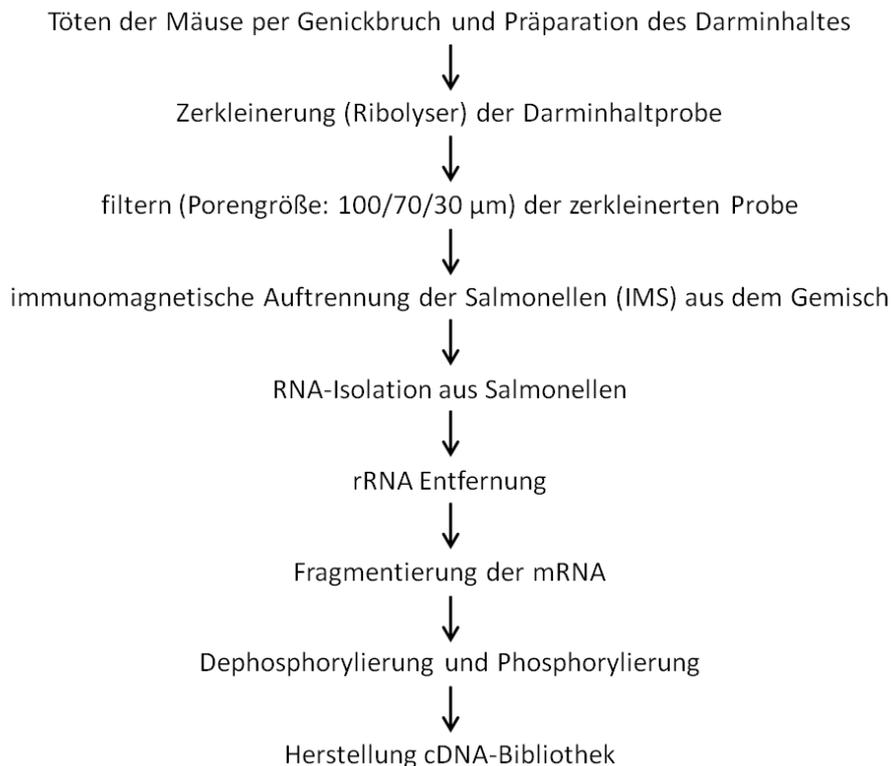


Abb. 3.1: Vom Darmbakterium hin zum Salmonellen-Transkriptom. Das Töten der Maus erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Der Inhalt des Caecums und hinteren Ileums wurde isoliert und mit *RNAlater* versetzt. Die heterogene Suspension wurde mit 0,1 mm *Zirkonia/Silica-Beads* im *Ribolyser* zerkleinert und anschließend mittels drei Filter mit den Porengrößen 100 µm, 70 µm und 30 µm von groben Partikeln befreit. Die Aufreinigung von *S. Typhimurium* aus diesem Gemisch erfolgte mittels immunomagnetischer Auftrennung (IMS) unter Verwendung eines Salmonellen-spezifischen Antikörpers. Daraufhin konnte die RNA aus diesen Salmonellen isoliert werden. Da für eine Transkriptom-Analyse die rRNA nicht von Interesse ist, wurde diese mittels Sonden entfernt. Im Anschluss wurde die RNA auf eine Größe von etwa 150 bp zerkleinert und nach einer Dephosphorylierung erneut phosphoryliert. Diese Schritte sind für die Herstellung der cDNA und für eine effiziente Adapterligierung bei Transkriptomsequenzierungen notwendig. Nach der Herstellung der cDNA-Bibliothek mit dem TrueSeq Small RNA Sample Preparation Kit konnte diese nach einer Qualitätsüberprüfung sequenziert werden.

3.1.1 Validierung unterschiedlicher Salmonellen-Antikörper bezüglich ihrer Spezifität für *S. Typhimurium* ST4/74

Die Isolierung der Salmonellen aus der Mikrobiota in der Maus erfolgte mittels IMS, bei der durch die Bindung spezifischer Antikörper an die Salmonellen diese aus dem restlichen Bakterienpool herausgetrennt wurden. Da Antikörper häufig unterschiedliche Affinitäten bzw. Spezifitäten gegenüber ihrer Zielstrukturen aufweisen, wurden zwei verschiedene Salmonellen-Antikörper von unterschiedlichen Herstellern auf ihre Effektivität hin getestet, Salmonellen aus einem Bakteriengemisch aufzureinigen.

Für diesen Versuch wurde der Wildtyp-Stamm *S. Typhimurium* ST4/74 mit *E. coli* DH5 α /pBR322 in verschiedenen Verhältnissen gemischt (Mix) und nachfolgend die Salmonellen mittels IMS wieder isoliert. Dabei wurden jeweils vor und nach der IMS die koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter bestimmt. Vergleicht man die Mengenverhältnisse ST4/74 zu DH5 α unter Verwendung des Antikörpers der Firma ViroStat (Tab. 3.1, AK-VS) so zeigt sich, dass die IMS-Aufreinigungen zu einer leichten Verschiebung zu Gunsten der *E. coli*-Bakterien führten (keine Signifikanz: p -Wert > 0,1) und keine Anreicherung der Salmonellen erfolgte. Die erste Auftrennung (IMS-1) ergab eine Reduktion der KbE beider Stämme auf ca. ein Zehntel der Ausgangskeimzahl, die sich bei der zweiten Auftrennung (IMS-2) zusätzlich in etwa halbierte.

Tab. 3.1: Bakterienanzahl vor und nach der immunomagnetischen Auftrennung mit verschiedenen Antikörpern. Der Mix entsprach hierbei dem Gemisch aus *E. coli* DH5 α /pBR322 und *S. Typhimurium* ST4/74 vor einer Aufreinigung. Aufgetragen sind jeweils die koloniebildenden Einheiten pro Milliliter der Stämme *E. coli* DH5 α /pBR322 (DH5 α [KbE]) und *S. Typhimurium* ST4/74 (ST4/74 [KbE]). Die immunomagnetischen Auftrennungen erfolgten zeitlich hintereinander (IMS-1 und IMS-2) unter Verwendung des Antikörpers der Firma ViroStat (AK-VS) bzw. des Antikörpers der Firma BacTrace (AK-BT-1 und AK-BT-2). Die Aufreinigung mit Hilfe des BacTrace Antikörpers wurde mit unterschiedlichen Mischverhältnissen der Bakterienstämmen (Verhältnis ST4/74 : DH5 α) getestet: \approx 4,1 (AK-BT-1), 1:100 (AK-BT-2) und 1:10000 (AK-BT-3).

Versuch	Mix			IMS-1			IMS-2		
	DH5 α [KbE]	ST4/74 [KbE]	Verhältnis ST4/74 : DH5 α	DH5 α [KbE]	ST4/74 [KbE]	Verhältnis ST4/74 : DH5 α	DH5 α [KbE]	ST4/74 [KbE]	Verhältnis ST4/74 : DH5 α
AK-VS	$3,09 \cdot 10^8$	$1,45 \cdot 10^9$	4,69	$6,58 \cdot 10^7$	$2,13 \cdot 10^8$	3,24	$3,23 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^8$	3,28
AK-BT-1	$1,15 \cdot 10^8$	$4,82 \cdot 10^8$	4,19	$4,88 \cdot 10^5$	$1,36 \cdot 10^8$	278,69	$7,85 \cdot 10^4$	$4,77 \cdot 10^7$	607,64
AK-BT-2B	$5,73 \cdot 10^7$	$5,91 \cdot 10^5$	0,01	$1,22 \cdot 10^6$	$2,46 \cdot 10^4$	0,02	$5,14 \cdot 10^4$	$1,78 \cdot 10^4$	0,35
AK-BT-3B	$2,6 \cdot 10^{10}$	$3,51 \cdot 10^6$	0,0001	$5,41 \cdot 10^4$	$6,07 \cdot 10^5$	11,12			

Der Antikörper der Firma BacTrace (AK-BT-1) ermöglichte bereits nach der ersten IMS (IMS-1) eine Anreicherung des Stammes ST4/74, die durch eine deutliche Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten des ST4/74 Wildtyp-Stammes erkennbar ist (Tab. 3.1). Die Menge an koloniebildenden *E. coli* Zellen nach der ersten IMS konnte signifikant um 99,5 % (p -Wert < 0,005) reduziert werden. Eine zweite Auftrennung (IMS-2) verstärkte diesen Effekt (600-fache Menge an ST4/74) und führte zu einer weiteren Reduktion der *E. coli*-Zellen auf ca. 99,93 %. Allerdings war der Verlust von ST4/74-Zellen (ca. 65 %) höher als die Anreicherung, die sich von 280-fach auf etwa 600-fach nur verdoppelte. Bei einem Mischverhältnis von 1:100 (AK-BT-2) konnte ebenfalls eine etwa 35-fache Anreicherung festgestellt werden. Weiter konnte bei einer 10^4 -fachen Menge an *E. coli* DH5 α /pBR322 im Vergleich zu ST4/74 in der Ausgangsmischung eine deutliche Anreicherung der Salmonellen erreicht werden (AK-BT-3). Aufgrund der besseren Bindeeffizienz des Antikörpers der Firma BacTrace wurde dieser bei den weiteren Vorversuchen verwendet.

3.1.2 Bestimmung der Bindungseffizienz des BacTrace-Antikörpers an *S. Typhimurium* ST4/74 aus dem Darminhalt von Mäusen

Im nächsten Schritt wurde analysiert, mit welcher Effizienz der Antikörper das Bakterium *S. Typhimurium* ST4/4 aus dem Inhalt des Mäusedarms gewinnen konnte. Dazu wurde der Darminhalt von toten Mäusen präpariert, gewogen und mit einer unterschiedlich hohen Zahl an *S. Typhimurium* ST4/4 beimpft. Der maximale Inokulums-Wert orientierte sich dabei an der Bakterienzahl, die sich 20 h nach einer Salmonellen-Infektion typischerweise im Darm befinden (Stecher *et al.*, 2005). Zur Vermeidung einer verstopften IMS-Säule durch grobe Partikel in einer nicht aufbereiteten Darminhaltsprobe, wurde diese zuvor mittels *Zirkonia/Silica-Beads* im *Ribolyser* zerkleinert und anschließend filtriert. Die Menge der aus dem Darminhalt gewonnenen Salmonellen konnte so auf etwa 20-40 % der Ausgangszahl optimiert werden (siehe Tab. 3.2). Zu erkennen ist, dass sich mit steigender Salmonellenausgangsmenge im Darminhalt auch die Ausbeute der Salmonellen nach der IMS erhöhte. Eine höhere Ausbeute als 40 % konnte nicht erreicht werden.

Tab. 3.2: Absolute und relative Anzahl der gewonnenen Salmonellen aus dem Darminhalt der Maus. Der Darminhalt der Maus wurde mit unterschiedlichen Mengen *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp (#1.-3.) beimpft und durch Ausplattieren und Koloniezählung die Ausgangsmenge an lebenden Salmonellen bestimmt (KbE/ml im Darminhalt). Nach Zerkleinerung, Filtration und Abzentrifugation erfolgte im Anschluss die IMS, wobei auch hier die Lebendzellzahl bestimmt wurde (KbE/ml nach IMS). Daraus errechnete sich die Prozentzahl der Salmonellen, die ausgehend von der initialen Ausgangsmenge mittels IMS aufgereinigt werden konnten (Anzahl isolierter Salmonellen [%]).

#	KbE/ml im Darminhalt	KbE/ml nach IMS	Anzahl isolierter Salmonellen [%]
1.	$1,57 \cdot 10^6$	$3,23 \cdot 10^5$	20,57
2.	$5,36 \cdot 10^7$	$1,75 \cdot 10^7$	32,65
3.	$9,14 \cdot 10^8$	$3,78 \cdot 10^8$	41,36

Des Weiteren wurde der Darminhalt der Maus mit einem Gemisch aus *E. coli* DH5 α /pBR322 und *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp beimpft und erneut die Ausbeute an Salmonellen bestimmt. Die Ausgangsmenge (Mix im Caecum) an *E. coli*-Bakterien im beimpften Gemisch betrug 60 %, wobei sich deren Anteil nach der ersten IMS-Aufreinigung auf nur noch ca. 10 % der Gesamtmenge reduzierte (Abb. 3.2). Durch einen zweiten IMS-Lauf konnten deren Anteil auf 3 % der Gesamtzellzahl weiter gesenkt werden.

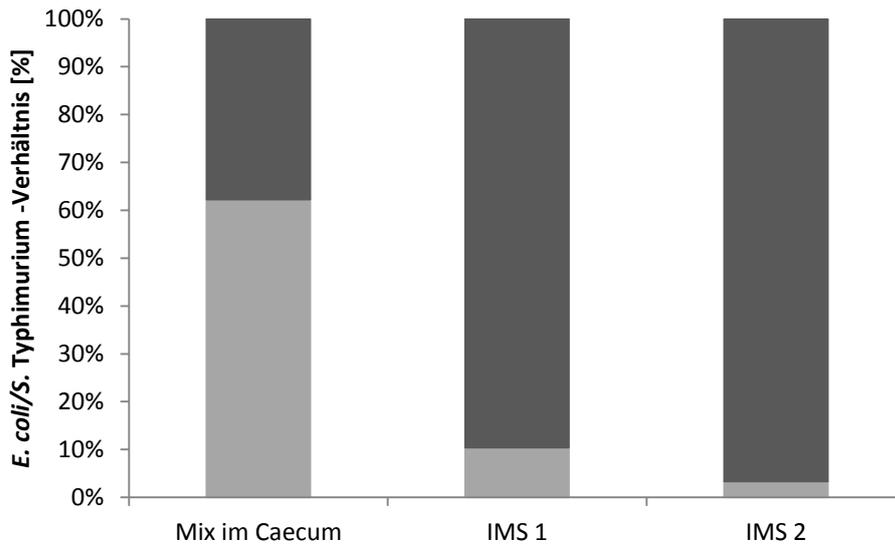


Abb. 3.2: Aufreinigung von ST4/74 aus einem Bakteriengemisch im Darminhalt einer Maus. Der Darminhalt einer Maus wurde mit einem Gemisch aus *E. coli* DH5 α /pBR322 (60 %; hellgraue Balken) und *S. Typhimurium* ST4/74 (40 %; dunkelgraue Balken) beimpft. Die koloniebildenden Einheiten pro ml im Darminhalt (Mix in Caecum) wurden jeweils nach dem ersten IMS-Lauf (IMS 1) und dem zweiten IMS-Lauf (IMS 2) bestimmt. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der beiden Stämme in Bezug auf die Gesamtkeimzahl (in %).

3.1.3 Wachstumseigenschaften von *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ in spezifischen Diäten

Die in der Studie verwendeten Diäten unterscheiden sich stark in ihren Inhaltsstoffen und deren Zusammensetzung, so dass deren möglicher Einfluss auf das allgemeine Verhalten von *S. Typhimurium* $\Delta invA$ getestet werden sollte. Dazu wurden die Futterpellets in sterilem Wasser gelöst, anschließend 1:100 mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$ angeimpft und die koloniebildenden Einheiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Wie in Abb. 3.3 zu erkennen ist, zeigte der Stamm ST4/74 $\Delta invA$ keinen signifikanten Diät-abhängigen Wachstumsunterschied. Nach einer 24 stündigen Inkubation erreichte ST4/74 $\Delta invA$ bei der pflanzlichen Diät eine Konzentration von $2 \cdot 10^9$ KbE/ml (von ursprünglich $1,02 \cdot 10^7$) und bei der Western-Diät eine Zellzahl von $8,37 \cdot 10^8$ KbE/ml (von ursprünglich $1,79 \cdot 10^7$).

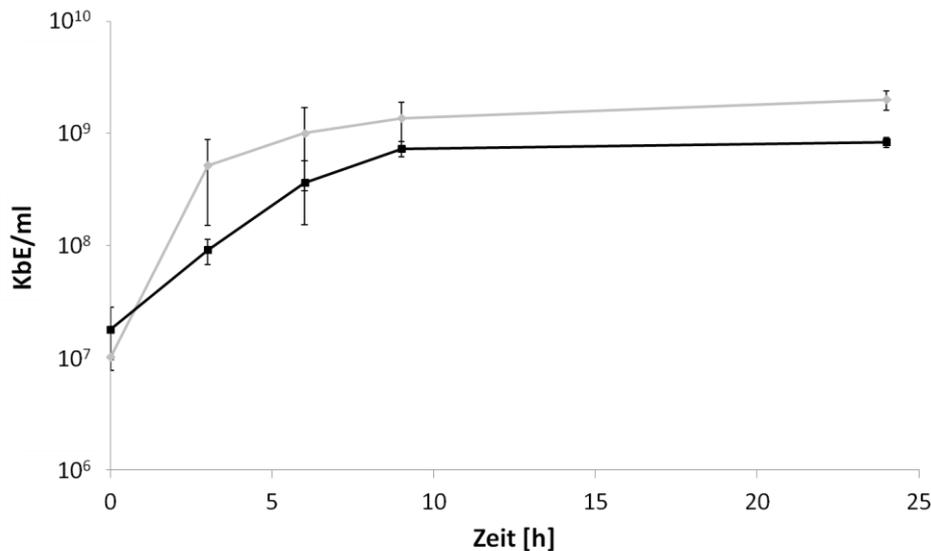


Abb. 3.3: Wachstumsverhalten von *S. Typhimurium* $\Delta invA$ in Abhängigkeit unterschiedlicher Diäten. Aufgetragen sind die koloniebildenden Einheiten (KbE/ml) von *S. Typhimurium* $\Delta invA$ in Abhängigkeit von der Zeit (in Stunden) in Medium mit gelösten Futterpellets der pflanzlichen Diät (graue Linie mit Rauten) oder bei der Western-Diät (schwarze Linie mit Vierecken). Die Messung erfolgte in drei biologischen Replikaten, wobei jede Probe im Dreifachansatz ausplattiert wurde. Die Standardabweichungen sind als schwarze Linien an den Punkten aufgetragen.

3.2 Experimentelles Design der *in vivo* Mausversuche

Im *in vivo* Mausversuch sollte der Einfluss unterschiedlicher Ernährungsweisen der Maus (Diäten) auf das Salmonellen-Transkriptom und die bakterielle Vielfalt im Mäusedarm untersucht werden. Für diese Fragestellung wurde folgender Versuchsaufbau entwickelt (Abb. 3.4): Über einen Zeitraum von insgesamt 15 Tagen erhielten die Mäuse zwei unterschiedliche Diäten, wobei diese Zeitspanne basierend auf externe Untersuchungen gewählt wurde (Nickerson, Homer et al. 2014). Die als Western-Diät bezeichnete Diät 1 beinhaltete Proteine und Fette tierischen Ursprungs, wobei die Kohlenhydrate größtenteils aus Saccharose gewonnen wurden. Die Proteine und Fette in der Diät 2, die als pflanzliche Diät bezeichnet wurden, hingegen waren pflanzlichen Ursprungs, wobei Polysaccharide als Hauptkohlenstoffquelle dienten (exakte Zusammensetzung der Diäten siehe Tab. 2.5). Mit dem Beginn der Fütterung der jeweiligen Diäten wurde täglich das Gewicht der Mäuse bestimmt, sowie deren Gesundheitszustand kontrolliert. Die Mäuse bekamen bis zur Beendigung des Versuches die Spezialdiäten.

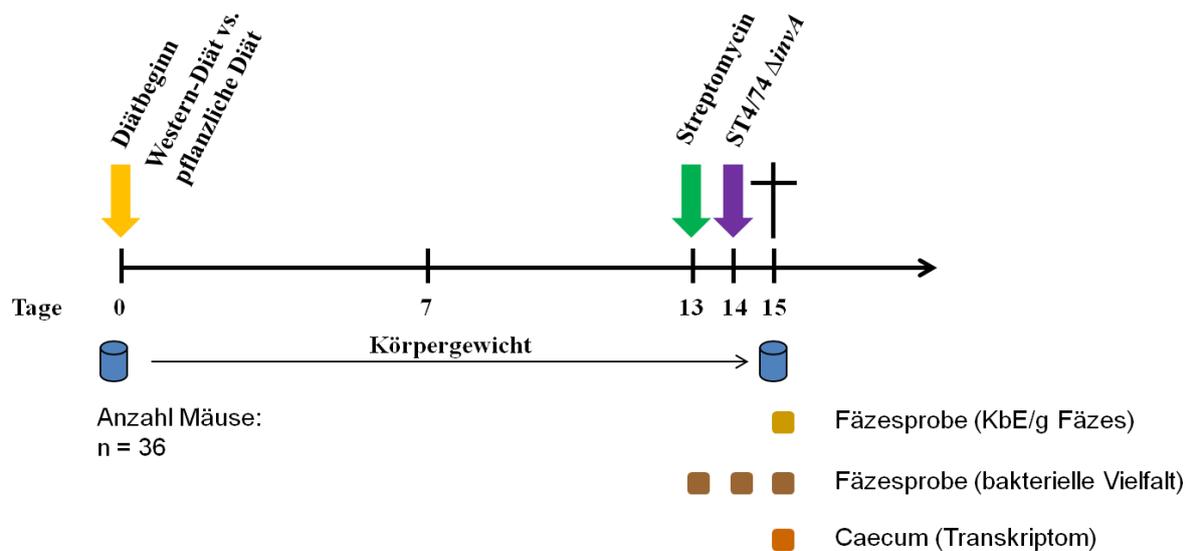


Abb. 3.4: Experimentelles Design des *in vivo* Mausversuches. Aufgezeichnet ist der zeitliche Ablauf des Mausversuches. Insgesamt wurden 36 Mäuse für den Versuch verwendet. Ab dem Beginn der Fütterung der jeweiligen Diät (gelber Pfeil) wurde täglich das Körpergewicht der Mäuse kontrolliert (blaue Zylinder). Nach 13 Tagen wurde den Mäusen 20 mg Streptomycin mittels einer Schlundsonde verabreicht (grüner Pfeil). Einen Tag nach der Streptomycinbehandlung, an Tag 14, wurden die Mäuse mit *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ (Menge: $5 \cdot 10^7$ KbE) infiziert (lila Pfeil). 24 h nach der Infektion wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet und das Caecum für die Transkriptomanalyse isoliert (orangefarbenes Viereck). Zusätzlich wurden zu drei Zeitpunkten (vor der Streptomycinbehandlung, vor der Infektion mit Salmonellen und vor der Tötung) Kotproben der Mäuse entnommen, um die bakterielle Zusammensetzung im Darm zu bestimmen (dunkelbraune Vierecke). Ebenso wurde vor der Tötung der Mäuse eine weitere Kotprobe genommen, um die Anzahl der Salmonellen in dem Fäzes zu bestimmen.

Die Behandlung der Mäuse mit 20 mg Streptomycin mittels Schlundsonde 24 h vor der Salmonelleninfektion ruft das Krankheitsbild der Gastroenteritis hervor und verzögert eine systemische Infektion. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Mäuse bei einer Behandlung mit Streptomycin eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Salmonellen aufweisen (Bohnhoff *et al.*, 1964). Dieses Wissen wurde zu einem Salmonellen-Gastroenteritis-Modell in Mäusen weiterentwickelt (Barthel *et al.*, 2003), welches nun weite Verwendung findet (Stecher *et al.*, 2005, Endt *et al.*, 2010, Stecher *et al.*, 2010, Nickerson *et al.*, 2014). 24 h nach der Streptomycinzugabe erfolgte die Inokulation mit einer Über-Nacht-Kultur von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST4/74 $\Delta invA$ (Abb. 3.4). Für jede Diätgruppe gab es eine Kontrollgruppe, bei der PBS (*Phosphat-buffered Saline*) anstatt der Bakterien verabreicht wurde.

Da das Transkriptom der Salmonellen in Abhängigkeit von der Diät und nicht von der Immunantwort analysiert werden sollte, wurde die $\Delta invA$ -Mutante verwendet. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage in Epithelzellen einzudringen (Galan and Curtiss, 1991, Galan *et al.*, 1992, Everest *et al.*, 1999, Forbester *et al.*, 2015), wodurch eine Immunantwort in der Maus verzögert wird. Für die Bestimmung der bakteriellen Vielfalt im Darm wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (vor der Streptomycinbehandlung, vor der Infektion mit Salmonellen, vor der Tötung) Kotproben entnommen. Da bereits 24 h nach der Salmonelleninfektion erste Entzündungsreaktionen im Darm

der Maus auftreten, wurden die Mäuse an Tag 15 (24 h nach der Salmonelleninfektion) mittels Genickbruch getötet. Zuvor wurde noch eine weitere Kotprobe entnommen, um die Anzahl der Salmonellen im Kot zu bestimmen.

3.3 Einfluss von Diäten auf das Körpergewicht der Mäuse

Nach einer einwöchigen Akklimation der Mäuse an die neuen Umgebungsbedingungen, wurde ihnen für 2 Wochen eine spezielle Diät zugeführt. Die erste Gruppe aus insgesamt 18 Mäusen ($n = 18$) wurde eine typische Western-Diät zugeführt, die reich an einfachen Zuckern und tierischen Fetten war. Der zweiten Gruppe mit ebenfalls 18 Mäusen ($n = 18$) wurde eine pflanzliche Diät verabreicht, die viele Ballaststoffe und ausschließlich pflanzliche Fette enthielt. Im Verlauf der zwei Wochen wurde täglich das Gewicht der Mäuse gemessen. In beiden Diätgruppen wurden von den 18 Mäusen 12 mit *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ an Tag 14 infiziert (Versuchsgruppe), die restlichen 6 Mäuse dienten als Kontrolle.

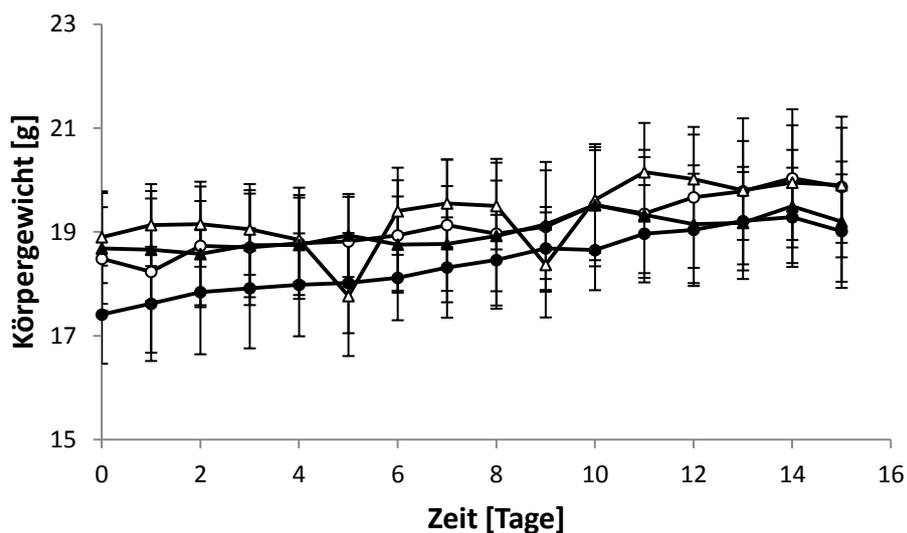


Abb. 3.5: Gewicht der Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit und der Diät. Nach einer einwöchigen Eingewöhnung erhielten die Mäuse entweder eine Western-Diät (Linie mit Kreisen) oder eine pflanzliche Diät (Linie mit Dreiecken). Jede Diätgruppe wurde unterteilt in eine Kontrollgruppe (Western-Diät: weiß gefüllte Kreise; pflanzliche Diät: weiß gefüllte Dreiecke; $n = 6$), die nicht mit Salmonellen infiziert wurden, und eine Versuchsgruppe (Western-Diät: schwarz gefüllte Kreise; pflanzliche Diät: schwarz gefüllte Dreiecke; $n = 12$), die an Tag 14 mit *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ infiziert wurden. Das Gewicht wurde ab Diätbeginn täglich bis zum Tod der Mäuse gemessen und ist in Gramm angegeben (Körpergewicht [g]).

Das Gewicht der Mäuse schwankte innerhalb des Beobachtungszeitraumes zwischen 16 und 20 g. Vom Trend her gab es eine leichte Gewichtszunahme in beiden Diätgruppen. Innerhalb der zwei Wochen konnte kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht der Mäuse zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.5). Aufgrund der kurzen Fütterungsphase war dies auch nicht zu erwarten.

3.4 Einfluss der unterschiedlichen Diäten auf die Kolonisierungsfähigkeit, die Mikrobiota und das Transkriptom von *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ in der Maus

3.4.1 Einfluss der unterschiedlichen Diäten auf die *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ -Konzentration im Mäusekot

Am Tag 13 erhielten die für eine Salmonelleninfektion vorgesehenen Mäuse mittels Schlundsonde eine einmalige Dosis an Streptomycin. Am Tag 14 wurden die Mäuse mit einer vorgegebenen Menge an *S. Typhimurium* $\Delta invA$ beimpft. Dazu wurde die Zellzahl einer ST4/74 $\Delta invA$ -Kultur auf etwa $1 \cdot 10^9$ KbE pro ml eingestellt und den Mäusen jeweils 50 μ l dieser Kultur verabreicht. Um die tatsächlich Inokulationszahl zu bestimmen, wurden zusätzlich die KbE/ml der einzelnen ST4/74 $\Delta invA$ -Kulturen ermittelt (Abb. 3.6), die letztlich zwischen $5 \cdot 10^7$ und $8 \cdot 10^7$ Zellen lag, was den in der Literatur empfohlenen Werten entspricht (Endt *et al.*, 2010, Hapfelmeier *et al.*, 2005, Stecher *et al.*, 2005).

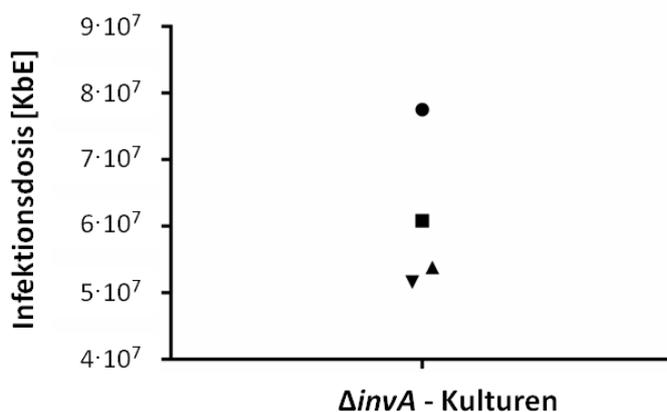


Abb. 3.6: Infektionsdosis von ST4/74 $\Delta invA$ in der Maus. Aufgetragen ist die Menge an lebenden Bakterienzellen von ST4/74 $\Delta invA$, mit denen die Mäuse infiziert wurden. Die vier Punkte entsprechen den jeweiligen Infektionsdosen, welche den Mäusen 1-6 (Western-Diät; Kreis), den Mäusen 7-12 (Western-Diät; Viereck), den Mäusen 13-18 (pflanzliche Diät; Dreieck mit Spitze nach oben) und den Mäusen 19-24 (pflanzliche Diät, Dreieck mit Spitze nach unten) verabreicht wurden. Angegeben ist die Infektionsdosis in koloniebildenden Einheiten (KbE).

Die Bestimmung des Salmonellenlevels im Darm jeder Maus erfolgte 24 h nach der Infektion, indem Kotproben auf Salmonellen-spezifischen Selektionsplatten in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert wurden. Wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist, waren in den Kontrollgruppen der Western- und pflanzlichen Diät keine Salmonellen im Kot vorhanden. Dies war zu erwarten, da hier keine Salmonelleninfektion erfolgte. Vergleicht man die Menge der Salmonellen zwischen den Versuchsgruppen, so kann kein signifikanter Unterschied (p -Wert $> 0,1$) in der Salmonellenlast in Abhängigkeit von der verabreichten Diät festgestellt werden. Die Salmonellenbelastung des Kots lag bei beiden Diäten zwischen 10^9 und 10^{11} KbE pro Gramm Kot. Damit konnte 24 h nach der Infektion kein signifikanter Unterschied in der Besiedelung von *S. Typhimurium* $\Delta invA$ bei unterschiedlichen Diäten detektiert werden.

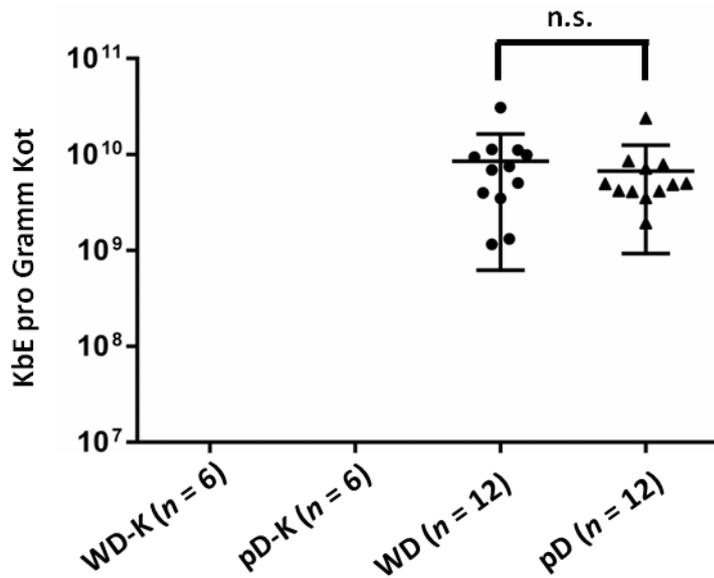


Abb. 3.7: Salmonellenbelastung *in vivo* 24 h nach der Infektion. 24 h nach der Infektion der Mäuse mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$, erfolgte eine Kotprobenentnahme zur Bestimmung der KbE pro Gramm Kot. Im Kot der Kontrollmäuse (Kontrolle Western-Diät: WD-K und Kontrolle pflanzliche Diät: pD-K), denen keine Salmonellen per Schlundsonde injiziert wurden, konnten erwartungsgemäß keine Salmonellen nachgewiesen werden. Jede Maus, die eine Western-Diät erhielt und mit Salmonellen infiziert wurde, ist als Kreis (WD) im Diagramm eingezeichnet. Mäuse, denen eine pflanzliche Diät gefüttert wurde, sind als Dreiecke dargestellt. Zwischen beiden Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied (n.s.). *n* entspricht der Anzahl an Mäusen pro jeweilige Gruppe.

Die Bakterienzusammensetzung im Mäusedarm wurde zunächst vor der Streptomycinbehandlung analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Diäten einen Einfluss auf die bakterielle Vielfalt im Mäusedarm ausüben. Bei der Analyse der OTUs (*operational taxonomic units*) wiesen die pflanzlich ernährten Mäuse eine höhere Vielfalt in der Bakteriengemeinschaft des Mäusedarms auf (Abb. 3.8).

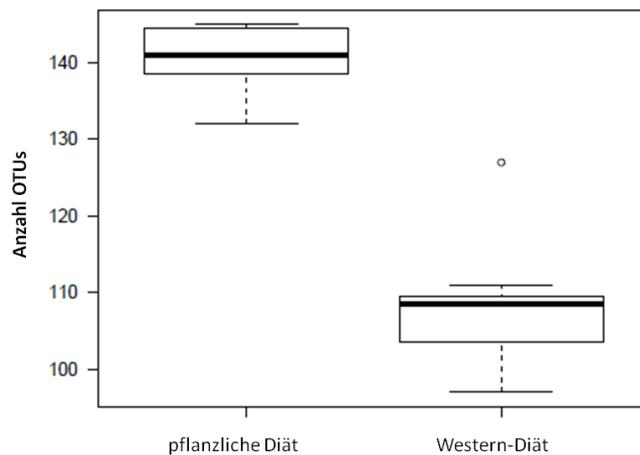


Abb. 3.8: Vielfältigkeit der bakteriellen Mikrobiota bei Mäusen in Abhängigkeit von der Mäusediät. Die Vielfältigkeit gibt an, wie viele OTUs unter einer bestimmten Bedingung präsent sind. Gezählt wurden OTUs, die nach Normalisierung eine *Read*-Anzahl $> 0,5$ aufwiesen. Die Vielfalt der bakteriellen Gemeinschaft wurde von Mäusen, die entweder eine pflanzliche oder eine Western-Diät erhielten, bestimmt. Zwischen den beiden Bedingungen konnte ein signifikanter Unterschied (p -Wert 0,00003) ermittelt werden.

Die unterschiedliche Diät-abhängige Vielfalt der Bakterienarten im Darm wurde durch die Berechnung der α -Diversität bestätigt, die als ein Maß für die Artendiversität eines Lebensraumes gilt. Für die Beschreibung der α -Diversität werden die mathematischen Größen Shannon- und Simpson-Index als häufigste Indizes verwendet. Bei Fütterung der pflanzlichen Diät ergab sich ein Shannon-Index von 3,44 mit der Standardabweichung (SD) von 0,1546 und ein Simpson-Index von 0,0584 (SD 0,0161). Der Shannon-Index betrug bei Fütterung der Mäuse mit einer Western-Diät 3,72 (SD 0,2536) und der Simpson-Index 0,0561 (SD 0,0234). Zwischen der pflanzlichen und der Western-Diät zeigte der Shannon-Index einen signifikanten Unterschied mit einem Signifikanzwert (p -Wert von 0,01531).

Bei genauerer Betrachtung der Bakterienzusammensetzung konnten sieben verschiedene Phyla detektiert werden: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *candidate Saccharibacteria*, *Deferribacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Tenericutes*. In Abb. 3.9 ist zu erkennen, dass bei beiden Diäten die Bakterienphyla *Bacteroidetes* (ca. 60-65 %) und *Firmicutes* (ca. 25-32 %) dominierten. Auffallend war, dass das Phylum *Tenericutes* nur bei Mäusen, die eine pflanzliche Diät erhielten, auftrat (2,32 %). Weitere signifikante Unterschiede gab es im Vorkommen der Bakterienphyla *Deferribacteres* (p -Wert 0,00224) und *Proteobacteria* (p -Wert 0,00003). Das Bakterienphylum *Deferribacteres* war nur in 5 von 12 Mäusen, denen eine pflanzliche Diät zugeführt wurde, vorhanden, wogegen dieses Phylum in allen 12 Mäusen der Western-Diät stärker präsent war. Das Phylum *Proteobacteria* zeigte ein höheres Vorkommen bei den mit Western-Diät gefütterten Mäusen.

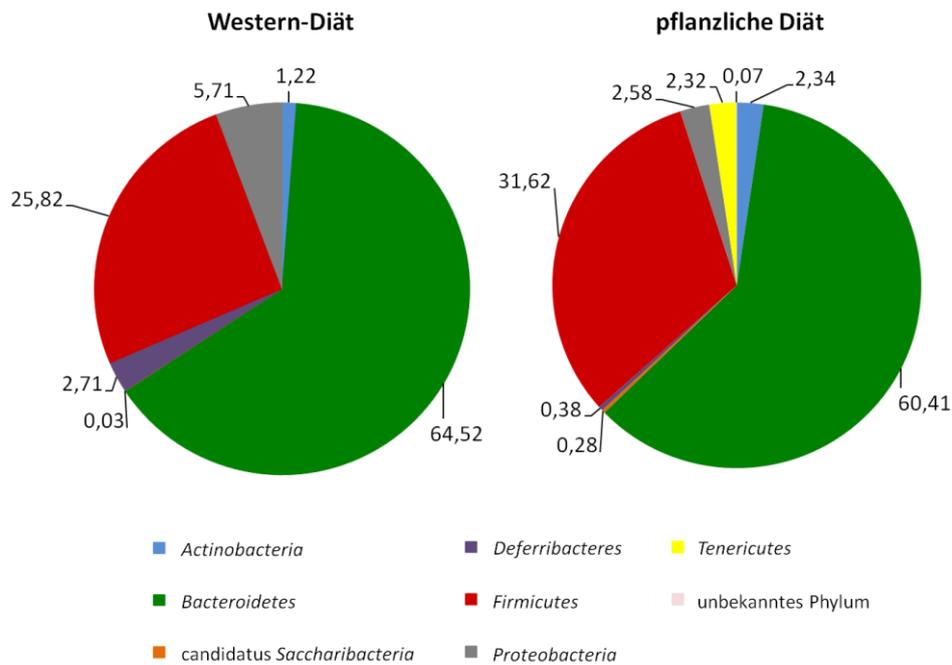


Abb. 3.9: Zusammensetzung der Bakterienphyla im Mäusedarm abhängig von der Diät. Dargestellt ist die prozentuale Zusammensetzung der Bakterienphyla der Mäusemikrobiota. Die Mäuse erhielten entweder eine Western-Diät oder eine pflanzliche Diät. Es konnten dabei folgende Bakterienphyla detektiert werden: *Actinobacteria* (blau), *Bacteroidetes* (grün), *candidatus Saccharibacteria* (orange), *Defferibacteres* (lila), *Firmicutes* (rot), *Proteobacteria* (grau) und *Tenericutes* (gelb). OTUs, die keinem benannten Phylum zugeordnet werden konnten, sind als unbekanntes Phylum eingezeichnet (hellrosa).

Eine hierarchische Rangstufe tiefer in der Taxonomie, den Bakterienklassen, differenzierten sich die Unterschiede (Abb. 3.10). So konnte die nur in pflanzlich ernährten Mäusen detektierte Klasse *Mollicutes* als Einzige dem Phylum *Tenericutes* zugeordnet werden. Auch bei der Klasse der *Defferibacteres*, die als einzige das gleichnamige Phylum vertrat, war zwischen den beiden Fütterungsarten ein signifikanter Unterschied (p -Wert 0,00224) erkennbar. Betrachtete man das Phylum *Proteobacteria*, so wiesen zwei Klassen einen signifikanten Unterschied auf, nämlich die *Betaproteobacteria* (p -Wert 0,01586) und die *Deltaproteobacteria* (p -Wert 0,00021; WD: 4,65 %, pD : 1,02 %). Auffallend war hierbei, dass die *Betaproteobacteria* bei Fütterung einer Western-Diät nur in 6 von 12 Mäusen vorkam (0,48 %), wohingegen die Klasse bei pflanzlich ernährten Mäusen in 11 von 12 präsent war (1,25 %). Bei der Analyse der verschiedenen Klassen des Phylums *Firmicutes* war erkennbar, dass die Klasse *Clostridia* unabhängig von der Diät dominierte (ca. 22-28 %) und es einen signifikanten Unterschied im Vorhandensein der Klasse *Bacilli* (p -Wert 0,03887) gab. Letztere war nur in 3 von 12 Mäusen der Western-Diät-Gruppe (0,34 %) präsent, trat aber verstärkt bei Fütterung der pflanzlichen Diät auf, bei der die Hälfte der Mäuse innerhalb dieser Gruppe die Klasse beherbergte (1,99 %).

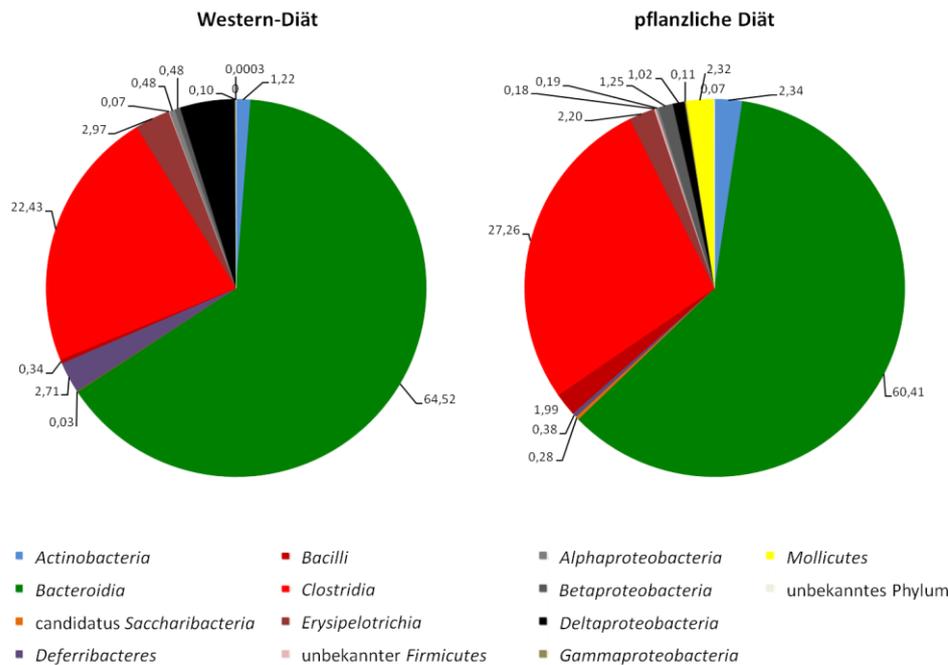


Abb. 3.10: Zusammensetzung der Bakterienklassen im Mäusedarm abhängig von der Diät. Dargestellt sind die Bakterienklassen (in Prozent), die in der Mikrobiota der Mäuse vorkommen. Die Mäuse erhielten entweder eine Western-Diät oder eine pflanzliche Diät. Die zugeordneten Farben wurden gemäß der Bakterienphylogenie gewählt: Klasse *Actinobacteria* gehört zum Stamm *Actinobacteria* (blau), Klasse *Bacteroidia* zum Phylum *Bacteroidetes* (grün), Klasse *candidate Saccharibacteria* zum Phylum *candidate Saccharibacteria* (orange), Klasse *Deferribacteres* zum Phylum *Deferribacteres* (lila), die Klassen *Bacilli*, *Clostridia* und *Erysipelotrichia* sind Teil des Phylums *Firmicutes* (Rottöne), die Klassen *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- und *Gammaproteobacteria* gehören zum Phylum *Proteobacteria* (Grautöne) und die Klasse *Mollicutes* (0 % bei Western-Diät) wird dem Phylum *Tenericutes* (gelb) zugeordnet.

Auf der Familienebene der Bakterien zeigte das Phylum *Bacteroidetes*, neben den bereits behandelten Phyla *Deferribacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Tenericutes*, nun ebenfalls einen Diät-abhängigen und signifikanten Unterschied auf. So ist in Tab. 3.3 erkennbar, dass die Familie *Rikenellaceae* (Klasse: *Bacteroidia*) bei Fütterung mit einer Western-Diät (p -Wert 0,0377) abundanter war, wogegen die Familie *Prevotellaceae* (Klasse: *Bacteroidia*) und eine unbekannte Bakterienfamilie der Ordnung *Bacteroidales* (Klasse: *Bacteroidia*) eine höhere Abundanz bei Fütterung mit einer pflanzlichen Diät zeigten. Als einzige Familien repräsentierten die beiden Bakterienfamilien *Deferribacteraceae* und *Anaeroplasmataceae* (Klasse *Mollicutes*) die Phyla *Deferribacteres* und *Tenericutes*. In dem Phylum *Firmicutes* zeigten neben der Familie *Lactobacillaceae* (Klasse *Bacilli*) auch die Familien *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae*, beide zugehörig zur Bakterienklasse der *Clostridia*, einen signifikanten Unterschied in ihrer Abundanz zwischen beiden Fütterungsarten. Stärker präsent bei Fütterung einer Western-Diät war hier die Bakterienfamilie *Ruminococcaceae* und eine unbekannte Familie der Ordnung *Clostridiales* (Klasse: *Clostridia*), wogegen die Familien *Lachnospiraceae* und *Lactobacillaceae* eine höhere Abundanz bei der pflanzlichen Diät zeigten. Die Bakterienfamilie *Desulfovibrionaceae* (Klasse *Deltaproteobacteria*) schien bevorzugt bei einer

Western-Diät vorzukommen. Bei der Klasse *Betaproteobacteria* trat die Familie *Sutterellaceae* häufiger bei Fütterung einer pflanzlichen Diät auf.

Tab. 3.3: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakterienfamilien. Aufgelistet sind die Bakterienfamilien, bei denen ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) in der Abundanz zwischen den beiden unterschiedlichen Mausdiäten festgestellt werden konnte. Zudem sind die Phylazugehörigkeit der jeweiligen Familie, der p -Wert und die gemittelte Abundanz der Bakterienfamilie aus allen Mäusen in Prozent (MW) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschieden wird dabei zwischen den Mäusen die eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät erhielten. In Klammer steht jeweils die Anzahl der Mäuse, in denen die spezielle Bakterienfamilie gefunden wurde.

Phylum	Familie	p -Wert	Western-Diät		pflanzliche Diät			
			MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]		
Bacteroidetes	<i>Prevotellaceae</i>	0,0102	1,03	(10)	0,53	1,72	(10)	0,86
	<i>Rikenellaceae</i>	0,0377	15,02	(12)	6,95	9,92	(12)	2,54
	unbek. <i>Bacteroidales</i>	0,0282	1,83	(12)	0,92	2,96	(12)	1,43
Deferribacteres	<i>Deferribacteraceae</i>	0,0022	2,71	(12)	1,32	0,38	(5)	0,33
Firmicutes	<i>Lachnospiraceae</i>	0,0179	12,44	(12)	5,54	22,08	(12)	10,37
	<i>Lactobacillaceae</i>	0,0389	0,34	(3)	0,36	1,99	(6)	3,64
	<i>Ruminococcaceae</i>	0,0047	8,79	(12)	3,37	4,51	(12)	2,58
	unbek. <i>Clostridiales</i>	0,0071	1,13	(9)	0,82	0,65	(9)	0,25
Proteobacteria	<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,0018	3,97	(12)	1,91	0,7	(7)	0,58
	<i>Sutterellaceae</i>	0,0159	0,48	(6)	0,37	1,25	(11)	0,65
Tenericutes	<i>Anaeroplasmataceae</i>			(0)		2,32	(10)	2,48

Die Analyse der Bakteriengattungen bestätigte die Ergebnisse der Untersuchung auf Familienebene. Sie fiel jedoch deutlich weniger präzise aus, da von den insgesamt 150 identifizierten OTUs bei der Sequenzierung nur 51 OTUs einer spezifischen Gattung zugeordnet werden konnten. Auf der Familienebene war noch eine Eingruppierung von 135 OTUs möglich. Für die Phyla *Deferribacteres* und *Tenericutes* konnten den jeweiligen Bakterienfamilien eine Gattung zugeordnet werden (*Mucispirillum* und *Anaeroplasma*). Unterschiede im Phylum *Bacteroidetes* zeigten sich bei den Gattungen *Alistipes* (Familie: *Rikenellaceae*), *Parabacteroides* (Familie *Porphyromonadaceae*), *Prevotella* (Familie: *Bacteroidales*), einer unbekanntem Gattung der Familie *Bacteroidales* und einer unbekanntem Gattung der Familie *Porphyromonadaceae* (Tab. 3.4). Erkennbar ist, dass zu den bereits in Tab. 3.3 genannten Bakterienfamilien des Phylums *Bacteroidetes* nun auch Gattungen der Familien *Porphyromonadaceae* und *Bacteroidales* signifikante Unterschiede in der Abundanz bei unterschiedlicher Ernährung der Maus aufwiesen. Bei Betrachtung des Phylums *Firmicutes* konnte festgestellt werden, dass die Diät einen Einfluss auf das Vorkommen der Gattungen *Clostridium XIVa*

(Familie *Lachnospiraceae*), *Lactobacillus* (Familie *Lactobacillaceae*) und *Allobaculum* (Familie *Erysipelotrichaceae*) ausübte. Bei den *Proteobacteria* zeigten die Gattungen *Parasutterella* (Familie: *Sutterellaceae*) und eine unbekannte Gattung der Familie *Desulfovibrionaceae* ebenfalls eine Diät-abhängige Präsenz.

Tab. 3.4: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakteriengattungen. Aufgelistet sind jeweils die Bakteriengattungen, bei denen ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) in der Abundanz zwischen den beiden unterschiedlichen Mäusdiäten festgestellt werden konnte. Zudem sind die Phylazugehörigkeit der jeweiligen Gattung, der p -Wert und die gemittelte Abundanz der Bakteriengattung aus allen Mäusen in Prozent (MW) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschieden wird dabei zwischen den Mäusen die eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät erhielten. In Klammer steht jeweils die Anzahl der Mäuse, in denen die spezielle Bakteriengattung gefunden wurde.

Phylum	Gattung	p -Wert	Western-Diät		pflanzliche Diät			
			MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]		
Bacteroidetes	<i>Alistipes</i>	0,0377	15,02	(12)	6,66	9,92	(12)	2,43
	<i>Parabacteroides</i>	0,0285	11,96	(12)	9,50	0,32	(2)	0,23
	<i>Prevotella</i>			(0)		1,18	(10)	0,63
	unbek. <i>Bacteroidales</i>	0,0282	1,83	(12)	0,88	2,96	(12)	1,37
	unbek. <i>Porphyromonadaceae</i>	0,0056	26,94	(12)	4,13	36,72	(12)	10,62
Deferribacteres	<i>Mucispirillum</i>	0,0022	2,71	(12)	1,26	0,38	(5)	0,31
Firmicutes	<i>Allobaculum</i>	0,0349	2,80	(12)	2,02	1,12	(10)	0,48
	<i>Clostridium XIIVa</i>			(0)		4,65	(10)	6,32
	<i>Lactobacillus</i>	0,0389	0,34	(3)	0,35	1,99	(6)	3,49
	unbek. <i>Clostridiales</i>	0,0071	1,13	(9)	0,78	0,65	(9)	0,24
Proteobacteria	<i>Parasutterella</i>	0,0159	0,48	(6)	0,35	1,25	(11)	0,62
	unbek. <i>Desulfovibrionaceae</i>	0,0018	3,97	(12)	1,83	0,70	(7)	0,55
Tenericutes	<i>Anaeroplasma</i>			(0)		2,32	(1)	2,38

3.4.2 Einfluss der Streptomycinbehandlung auf die intestinale bakterielle Mikrobiota

Bei der Analyse der OTUs (Abb. 3.11) vor und nach Streptomycinbehandlung war erkennbar, dass 24 h nach der Streptomycinzugabe die Anzahl der OTUs um etwa 50-80 OTUs gesunken war (vgl. Abb. 3.8), was auf eine durch Streptomycin verursachte verringerte Vielfalt hindeutet. Der Vergleich der Shannon-Indizes vor und nach der Antibiotikabehandlung bestätigte diese Vermutung (Western-Diät: p -Wert 0,0002; pflanzliche Diät: p -Wert 0,0017).

Verglich man die Anzahl der OTUs nach der Streptomycinbehandlung aus beiden Diätgruppen miteinander, so konnte kein signifikanter Unterschied mehr in der Bakterienvielfalt detektiert werden (Abb. 3.11). Auch beim Shannon-Index konnte zwischen der pflanzlichen und Western-Diät kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (pflanzliche Diät: $1,73 \pm 0,9376$; Western-Diät: $1,62 \pm 0,4152$).

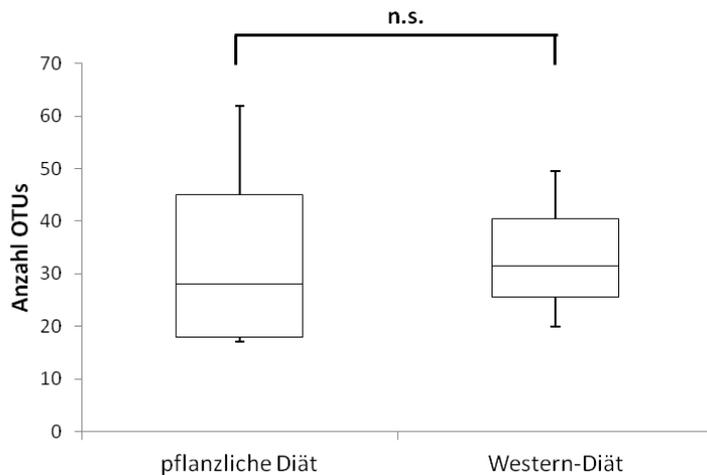


Abb. 3.11: Vielfältigkeit der Mikrobiota bei Mäusen 24 h nach der Streptomycinbehandlung. Aufgetragen ist die Vielfalt (Anzahl der OTUs, die nach Normalisierung eine *Read*-Anzahl > 0,5 aufwiesen) der Bakterien im Mäusedarm 24 h nach Behandlung mit Streptomycin. Die Vielfältigkeit der bakteriellen Gemeinschaft wurde von zwei Gruppen bestimmt: 1) Mäuse, die eine pflanzliche Diät erhielten (pflanzliche Diät) und 2) Mäuse, denen eine Western-Diät gefüttert wurde (Western-Diät). Zwischen den beiden Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Insgesamt konnten nach der Streptomycinbehandlung nur 21 von 24 Proben sequenziert werden, da die DNA-Isolation aus den Kotproben der Mäuse 17, 18 und 24 nicht erfolgreich war. Anzumerken ist, dass die Qualität der Sequenzierung bei einigen Proben nicht ganz den Erwartungen entsprach. So lag nach Sequenzierung die *Read*-Anzahl bei 14 Proben unter dem üblichen Schwellenwert von 10.000 Sequenzstücken. Von diesen Proben erreichten 6 Stück keine *Read*-Anzahl von 3000 (Tab. 3.5). Da die Proben mit der niedrigen Anzahl an *Reads* jedoch eine ähnliche Bakterienzusammensetzung im Vergleich zu den restlichen Proben zeigten, wurden alle Proben in der Auswertung berücksichtigt.

Tab. 3.5: Anzahl der sequenzierten *Reads* bei den streptomycinbehandelten Proben. Aufgelistet sind die Mäuse, aus denen die jeweilige Probe genommen wurde, welche Diät diesen Mäusen gefüttert wurde und die Anzahl der sequenzierten *Reads* der jeweiligen Probe.

Western-Diät		Pflanzliche Diät	
Mausnr.	Anzahl <i>Reads</i>	Mausnr.	Anzahl <i>Reads</i>
1	17.344	13	3.174
2	5.593	14	12.144
3	8.746	15	2.473
4	16.544	16	2.522
5	2.416	19	59.181
6	1.466	20	44.184
7	8.672	21	9.538
8	2.175	22	34.221
9	1.672	23	18.076
10	4.601		
11	8.350		
12	6.405		

Die Streptomycinbehandlung führte zu einer starken Veränderung in der Zusammensetzung auf Phylaebene. So ist bei Fütterung einer Western-Diät erkennbar, dass die beiden Phyla *Actinobacteria* (p -Wert 0,001) und *Defferibacteres* (p -Wert 0,0006) weniger sensitiv auf das Antibiotikum reagieren als das Phylum *Bacteroidetes* (p -Wert 0,0002). Auch die Phyla *Firmicutes* (p -Wert 0,0066) und *Proteobacteria* (p -Wert 0,0536) reagierten sensitiv auf die Streptomycinbehandlung (Abb. 3.12).

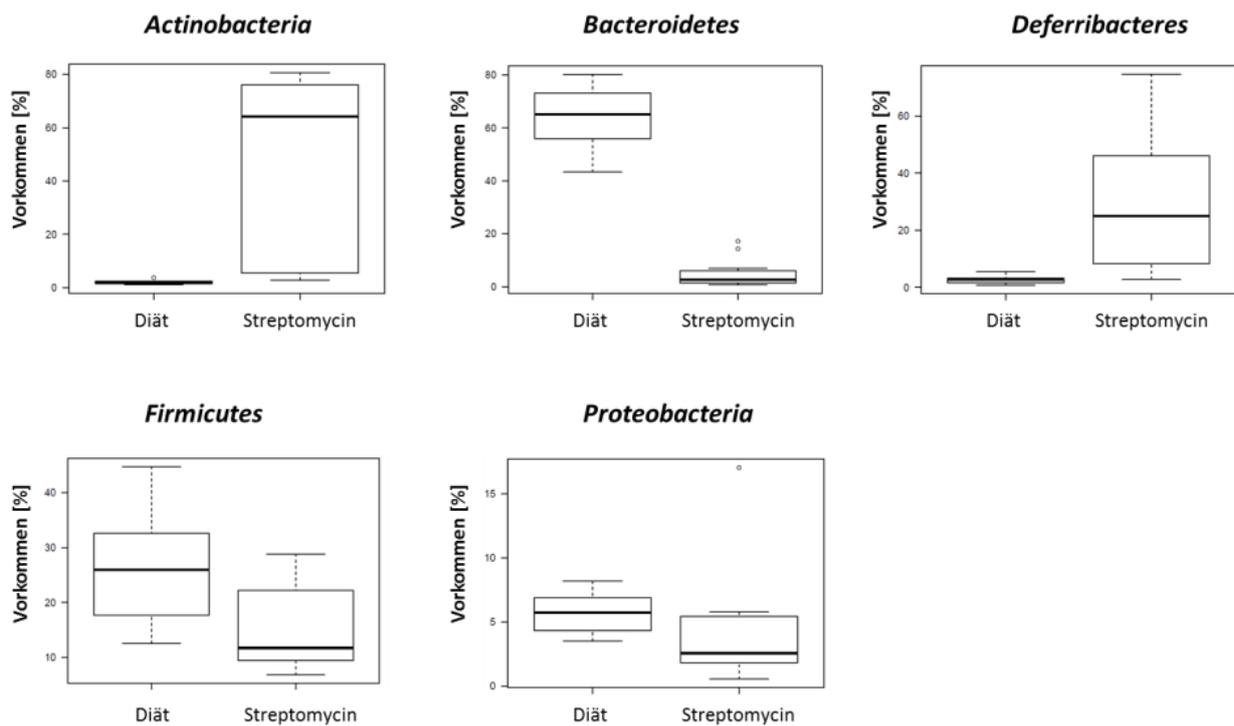


Abb. 3.12: Unterschiede im Vorkommen einzelner Phyla vor und nach Streptomycinbehandlung (Western-Diät). Aufgetragen sind Phyla, die einen signifikanten Unterschied in ihrem Vorkommen (in Prozent) in der Mikrobiota beim Vergleich der Zeitpunkte vor (Diät) und nach der (Streptomycin) Streptomycinbehandlung aufwiesen. Es wurden dabei nur die Mäuse berücksichtigt, die eine Western-Diät erhielten. Unterschiede waren dabei in den Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Defferibacteres*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* zu erkennen.

Auch bei Fütterung einer pflanzlichen Diät führte Streptomycin zu Auswirkungen in der bakteriellen Zusammensetzung. So reagierten die Phyla *Bacteroidetes* (p -Wert 0,0046) und *Firmicutes* (p -Wert 0,0634) ebenso sehr sensitiv auf die Antibiotika-Behandlung (Abb. 3.13). Demgegenüber konnte sich das Phylum *Actinobacteria* nur mäusepezifisch proliferieren (Maus Nr. 14, 16, 21, 22 und 23).

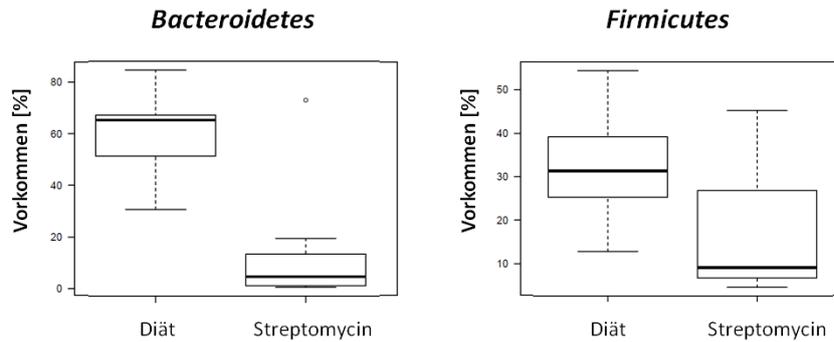


Abb. 3.13: Unterschiede im Vorkommen einzelner Phyla vor und nach Streptomycinbehandlung (pflanzliche Diät). Aufgetragen sind Phyla, die einen signifikanten Unterschied in ihrem Vorkommen (in Prozent) in der Mikrobiota beim Vergleich der Zeitpunkte vor (Diät) und nach der (Streptomycin) Streptomycinbehandlung aufwiesen. Es wurden dabei nur die Mäuse berücksichtigt, die eine pflanzliche Diät erhielten. Unterschiede waren dabei in den Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* zu erkennen.

In der streptomycinbehandelten Mäuse-Mikrobiota konnten insgesamt neun verschiedene Phyla detektiert werden, nämlich *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *candidate Saccharibacteria*, *Deferribacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Tenericutes* (Abb. 3.14). Dabei wurde die Mäuse-Mikrobiota in beiden Diätgruppen größtenteils von dem Bakterienphylum *Actinobacteria* (Western-Diät: ca. 74 % ± 4,74; pflanzliche Diät: ca. 59 % ± 37,14) dominiert. Die hohe Standardabweichung in der Gruppe der pflanzlichen Diät ergab sich durch eine starke Varianz in der Ansiedlungsfähigkeit der *Actinobacteria* in den einzelnen Mäusen. Vergleicht man die bakterielle Zusammensetzung der streptomycinbehandelten Mäuse-Mikrobiota im Hinblick auf die beiden Ernährungsweisen, so trat das Phylum *Deferribacteres* verstärkt in der Western-Diät-Gruppe auf (p -Wert 0,0722). Die beiden Phyla *Tenericutes* und *candidate Saccharibacteria* konnten dagegen nur in pflanzlich ernährten Mäusen detektiert werden (Abb. 3.14).

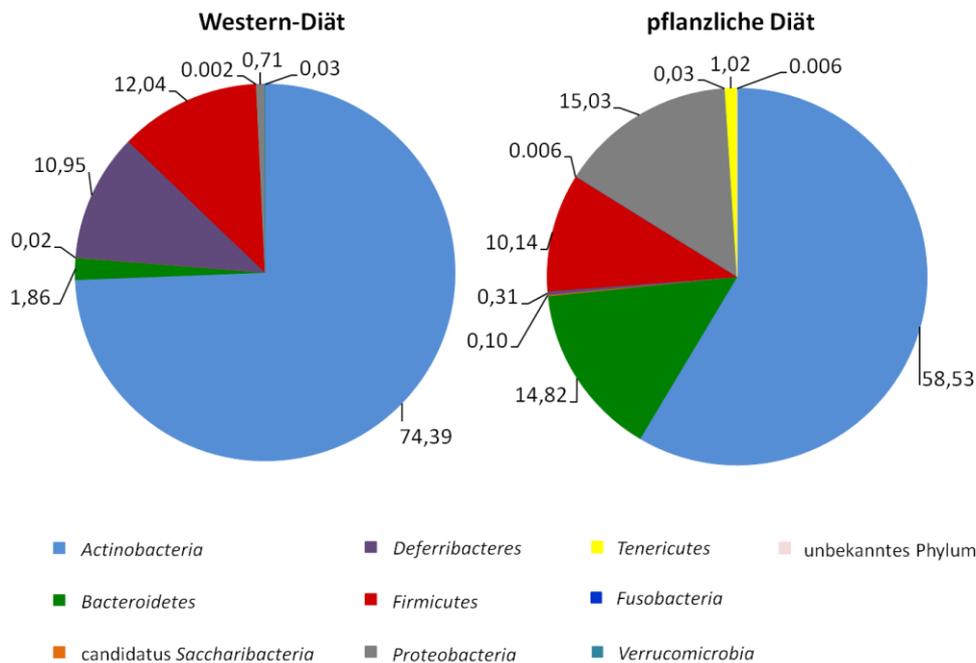


Abb. 3.14: Streptomycinabhängige Zusammensetzung der Bakterienphyla im Mäusedarm. Aufgetragen ist die Zusammensetzung der Bakterienphyla (in Prozent) der Mäusemikrobiota nach einer Streptomycinbehandlung. Die Mäuse erhielten alternativ eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät. Es wurden hierbei die Mittelwerte der Proben berechnet, bei denen die Anzahl der sequenzierten *Reads* größer als 7.000 war (s. Tab. 3.5). Es konnten dabei folgende Bakterienphyla detektiert werden: *Actinobacteria* (hellblau), *Bacteroidetes* (grün), *candidatus Saccharibacteria* (orange), *Deferribacteres* (lila), *Firmicutes* (rot), *Proteobacteria* (grau), *Tenericutes* (gelb), *Fusobacteria* (dunkelblau) und *Verrucomicrobia* (türkis). Diejenigen OTUs, die keinem benannten Phylum zugeordnet werden konnten, sind als unbekanntes Phylum eingezeichnet (hellrosa).

Bei Betrachtung der Bakterienklassen konnten signifikante und Diät-abhängige Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota weiter präzisiert werden (Abb. 3.15). Wie bereits in der Diät-abhängigen Bakterienzusammensetzung war auch hier die Klasse *Mollicutes* (Phylum *Tenericutes*) nur in Mäusen mit einer pflanzlichen Diät nachweisbar. Bei der Klasse der *Deferribacteres*, die als einzige das gleichnamige Phylum vertrat, war zwischen den beiden Fütterungsarten ein signifikanter Unterschied (p -Wert 0,0722) in der Abundanz (WD: 10,95 % \pm 6,84; pD: 0,31 % \pm 0,31) erkennbar. Zusätzlich konnte in mit Western-Diät gefütterten Mäusen die Klasse *Betaproteobacteria* nicht mehr detektiert werden.

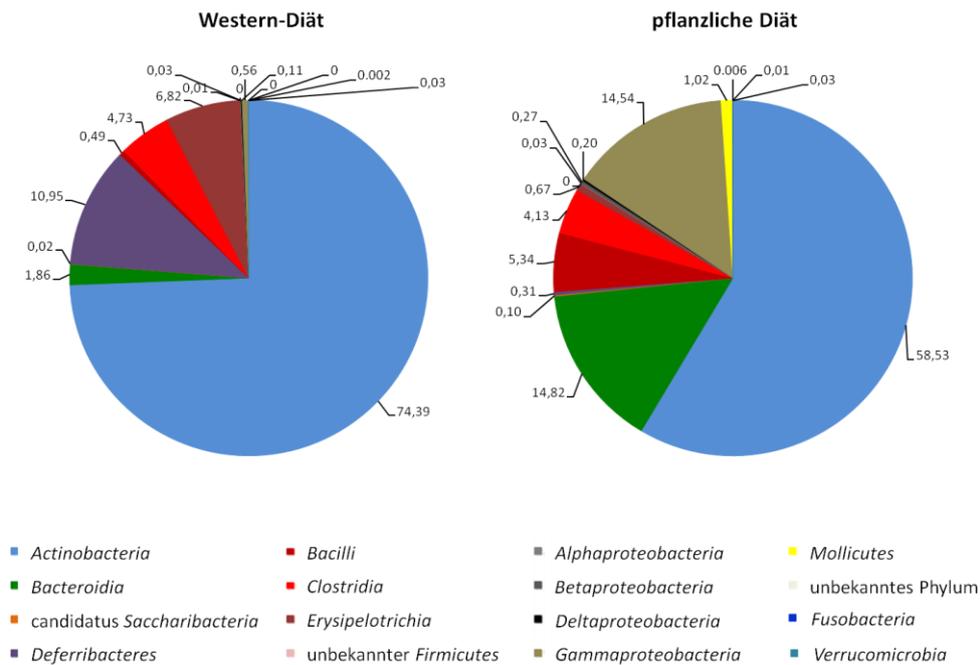


Abb. 3.15: Streptomycinabhängige Zusammensetzung der Bakterienklassen im Mäusedarm. Dargestellt sind die Bakterienklassen (in Prozent), die in der Mäusemikrobiota nach einer Streptomycinbehandlung nachgewiesen wurden. Dabei wurden die Mäuse alternativ mit einer Western- bzw. einer pflanzlichen Diät gefüttert. Es wurden hierbei die Mittelwerte von den Proben berechnet, bei denen die Anzahl der sequenzierten *Reads* größer als 7.000 war. Die zugeordneten Farben wurden gemäß der Bakterienphylazugehörigkeit gewählt: Klasse *Actinobacteria* gehört zum Stamm *Actinobacteria* (blau), Klasse *Bacteroidia* zum Phylum *Bacteroidetes* (grün), Klasse *candidate Saccharibacteria* zum Phylum *candidate Saccharibacteria* (orange), Klasse *Deferribacteres* zum Phylum *Deferribacteres* (lila), die Klassen *Bacilli*, *Clostridia* und *Erysipelotrichia* sind Teil des Phylums *Firmicutes* (Rottöne), die Klassen *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- und *Gammaproteobacteria* gehören zum Phylum *Proteobacteria* (Grautöne) und die Klasse *Mollicutes* (0 % bei Western-Diät) wird dem Phylum *Tenericutes* (gelb) zugeordnet. Ebenso eingezeichnet sind die Klassen *Fusobacteria* (dunkelblau) und *Verrucomicrobia* (türkis). OTUs, die keiner Klasse bzw. Phylum zugeordnet werden konnten, sind als unbekanntes Phylum eingezeichnet (hellrosa).

Auf Familienebene zeigten nur fünf Bakterienfamilien 24 h nach der Streptomycinbehandlung signifikante Unterschiede in ihrem Vorkommen in Abhängigkeit von der Diät (Tab. 3.6). Darunter fielen die Familien *Bacteroidaceae* (Phylum *Bacteroidetes*), *Deferribacteraceae* (Phylum *Deferribacteres*), *candidate Saccharibacteria*, *Sutterellaceae* (Phylum *Proteobacteria*) und *Anaeroplasmataceae* (Phylum *Tenericutes*). Die drei letzteren konnten dabei nicht mehr in mit Western-Diät gefütterten Mäusen nachgewiesen werden. Die Familie *Deferribacteraceae* zeigte ein höheres Vorkommen bei Mäusen mit einer Western-Diät als Nahrung, was bereits auf Phylumebene ersichtlich war. Auffallend ist ebenso, dass die einzelnen Familien oft nur in 3-5 Mäusen (vor allem bei Fütterung der pflanzlichen Diät) detektiert werden konnten (Tab. 3.6). Dieses Fehlen der Familien in einzelnen Mäusen könnte allerdings auch auf die zu geringe Anzahl der sequenzierten *Reads* zurückzuführen sein.

Tab. 3.6: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakterienfamilien nach Streptomycinbehandlung. Aufgelistet sind jeweils die Bakterienfamilien, bei denen ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) in der Abundanz bei unterschiedlichen Diäten der Mäuse 24 h nach der Streptomycinbehandlung festgestellt werden konnte. Zudem sind die Phylazugehörigkeit der jeweiligen Familie, der p -Wert und die gemittelte Abundanz der Bakterienfamilie aus allen Mäusen in Prozent (MW) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Für die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden nur Proben, bei denen die Anzahl der sequenzierten *Reads* größer als 7.000 war, miteinbezogen (Tab. 3.5). In der Tabelle wird zwischen den Mäusen, die eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät erhielten, unterschieden. In Klammer steht jeweils die Anzahl der Mäuse, in denen die spezielle Bakterienfamilie gefunden wurde. Die Gesamtanzahl der Mäuse, in denen die Anwesenheit einer Familie überprüft wurde, betrug in der Western-Diät-Gruppe 12 Mäuse und in der Gruppe der pflanzlichen Diät 9 Mäuse.

Phylum	Familie	p -Wert	Western-Diät		pflanzliche Diät			
			MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]		
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	0,0862	0,30	(4)	0,15	8,99	(5)	18,79
candidatus	<i>candidatus</i>			(0)		0,10	(3)	0,09
<i>Saccharibacteria</i>	<i>Saccharibacteria</i>							
<i>Deferribacteres</i>	<i>Deferribacteraceae</i>	0,0209	10,95	(12)	6,84	0,31	(3)	0,31
<i>Proteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>			(0)		0,27	(4)	0,39
<i>Tenericutes</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>			(0)		1,02	(3)	1,94

Die Betrachtung der Bakteriengattungen bestätigte, dass in den Familien *Anaeroplasmataceae*, *candidatus Saccharibacteria*, *Sutterellaceae* und *Deferribacteraceae* jeweils eine spezielle Gattung für den signifikanten und Diät-abhängigen Unterschied in deren Abundanz verantwortlich war, nämlich *Anaeroplasma* (Familie *Anaeroplasmataceae*), *candidatus Saccharibacteria*, *Parasutterella* (Familie *Sutterellaceae*) und *Mucispirillum* (Familie *Deferribacteraceae*). Zusätzlich traten zwei Gattungen (*Bacteroides* und *Odoribacter*) des Phylums *Bacteroidetes* signifikant häufiger und stärker in pflanzlich ernährten Mäusen auf (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakteriengattungen nach einer Streptomycinbehandlung. Aufgelistet sind jeweils die Bakteriengattungen, bei denen ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) in der Abundanz bei unterschiedlichen Diäten der Mäuse 24 h nach Streptomycinbehandlung festgestellt werden konnte. Zudem sind die Phylazugehörigkeit der jeweiligen Gattung, der p -Wert und die gemittelte Abundanz der Bakteriengattung aus allen Mäusen in Prozent (MW) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Für die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden nur Proben, bei denen die Anzahl der sequenzierten *Reads* größer als 7.000 war, miteinbezogen (Tab. 3.5). In der Tabelle wird zwischen den Mäusen, die eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät erhielten, unterschieden. In Klammer steht jeweils die Anzahl der Mäuse, in denen die spezielle Bakteriengattung gefunden wurde. Die Gesamtanzahl der Mäuse, in denen die Anwesenheit einer Gattung überprüft wurde, betrug in der Western-Diät-Gruppe 12 Mäuse und in der Gruppe der pflanzlichen Diät 9 Mäuse.

Phylum	Gattung	p -Wert	Western-Diät		pflanzliche Diät			
			MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]		
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	0,0275	0,30	(4)	0,15	8,99	(5)	18,79
	<i>Odoribacter</i>			(0)		0,23	(4)	0,27
candidatus	<i>candidatus</i>			(0)		0,10	(3)	0,09
<i>Saccharibacteria</i>	<i>Saccharibacteria</i>							
<i>Deferribacteres</i>	<i>Mucispirillum</i>	0,0209	10,95	(12)	6,84	0,31	(3)	0,31
<i>Proteobacteria</i>	<i>Parasutterella</i>			(0)		0,27	(4)	0,39
<i>Tenericutes</i>	<i>Anaeroplasma</i>			(0)		1,02	(3)	1,94

3.4.3 Einfluss von *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$ auf die intestinale bakterielle Mikrobiota

Nachdem die Mäuse durch eine Streptomycinbehandlung für eine Infektion mit Salmonellen sensibilisiert und mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$ infiziert wurden, konnte die Bakterienzusammensetzung im Mäusedarm 24 h nach der Infektion analysiert werden. Auch hier konnte, wie bereits nach der Streptomycinbehandlung, kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der OTUs zwischen beiden Diäten detektiert werden. Allerdings verringerte sich die Anzahl der OTUs noch einmal signifikant im Vergleich zum Zeitpunkt nach der Streptomycinbehandlung (WD: p -Wert 0,0002; pD: p -Wert 0,018). Der Median der OTUs, bei Mäusen mit einer Western-Diät, sank von etwa 41,5 vor der Salmonelleninfektion auf 31,5 nach der Infektion und bei pflanzlicher Diät von 36 vor der Infektion auf 28 danach (Abb. 3.11 und Abb. 3.16). Die Mikrobiota von Mäusen der Western-Diät-Gruppe wies eine signifikant verringerte α -Diversität auf (Shannon-Index: p -Wert 0,0156; Simpson-Index: p -Wert 0,0268). Die Anzahl der sequenzierten *Reads* lag bei diesen Proben bei über 10.000 (WD: 10 Mäuse; pD: 11 Mäuse).

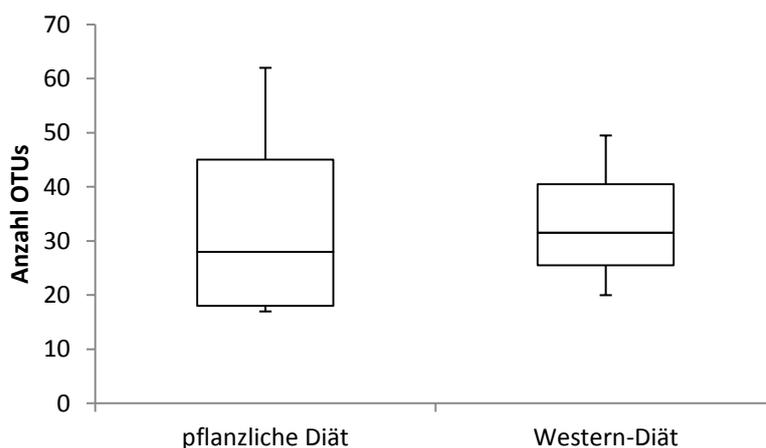


Abb. 3.16: Vielfältigkeit der intestinalen bakteriellen Mikrobiota bei Mäusen 24 h nach einer Salmonelleninfektion. Aufgetragen ist die Vielfalt (Anzahl der OTUs, die nach Normalisierung eine *Read*-Anzahl > 0,5 aufwiesen) der Bakterien im Mäusedarm 24 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$. Die Vielfältigkeit der bakteriellen Gemeinschaft wurde für beide Gruppen bestimmt: 1) Mäuse, die eine pflanzliche Diät erhielten insgesamt 11 Mäuse) und 2) Mäuse, denen eine Western-Diät gefüttert wurde (insgesamt 10 Mäuse). Zwischen beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Wie in Abb. 3.17 zu erkennen ist, erfolgte in beiden Diät-Gruppen eine Kolonisierung von Bakterien, die dem Phylum *Proteobacteria* zugeordnet wurden, welches nach der Infektion signifikant stärker präsent war als vor der Infektion (WD: p -Wert 0,0006; pD: p -Wert 0,0866). Die Besiedelungseffizienz variierte dabei relativ stark zwischen den Mäusen und schwankte bei der mit der Western-Diät-gefütterten Gruppe zwischen 31 % und 99 %, bzw. bei der pflanzlich ernährten Gruppe zwischen 1,59 % und 97 %. Aufgrund dieser individuellen Schankwungen sind auch die stark unterschiedlichen Mittelwerte der *Proteobacteria* in der pflanzlichen bzw. Western-Diät-Gruppe nicht signifikant. Das

Phylum *Bacteroidetes* wies einen signifikanten und Diät-abhängigen Unterschied in seiner Abundanz auf (p -Wert 0,0192), wobei es verstärkt in der Mikrobiota von pflanzlich ernährten Mäusen auftrat. Dagegen zeigte das Phylum *Actinobacteria* eine signifikant stärkere Präsenz in der Western-Diät-Gruppe (p -Wert 0,0159).

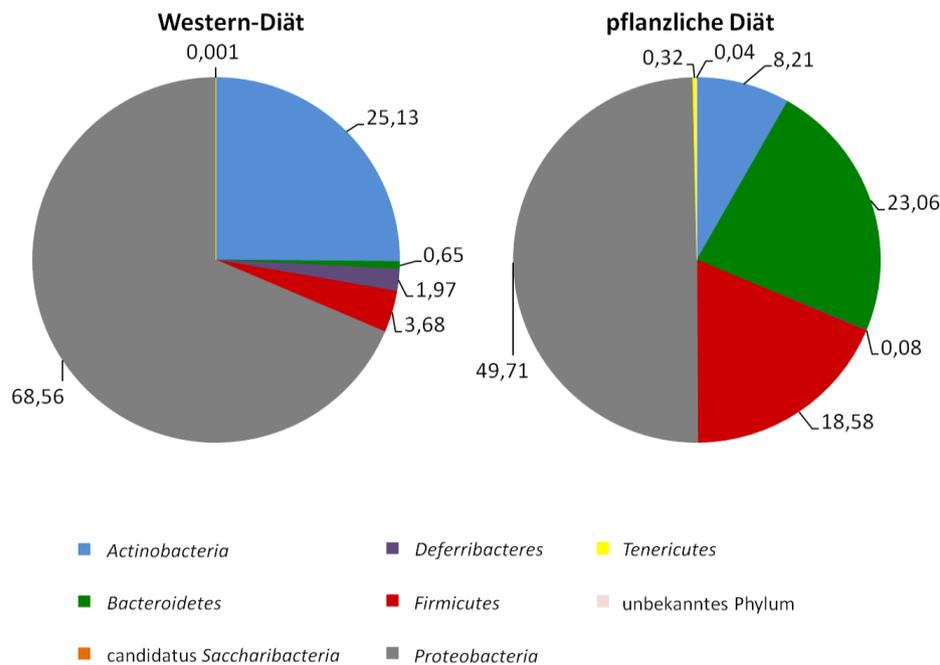


Abb. 3.17: Zusammensetzung der Bakterienphyla im Mäusedarm nach einer Salmonelleninfektion. Dargestellt ist die Zusammensetzung der Bakterienphyla (in Prozent) der Mäusemikrobiota 24 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$. Die Mäuse erhielten entweder eine Western-Diät oder eine pflanzliche Diät. Es konnten dabei folgende Bakterienphyla detektiert werden: *Actinobacteria* (hellblau), *Bacteroidetes* (grün), *candidate Saccharibacteria* (orange), *Deferribacteres* (lila), *Firmicutes* (rot), *Proteobacteria* (grau) und *Tenericutes* (gelb). Diejenigen OTUs, die keinem benannten Phylum zugeordnet werden konnten, sind als unbekanntes Phylum eingezeichnet (hellrosa).

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Klassen im Phylum *Proteobacteria* fiel auf, dass die Klasse der *Gammaproteobacteria* hier unabhängig von der zugeführten Diät dominierte (Abb. 3.18). Wie bereits vor der Zugabe von Streptomycin, waren neben den *Proteobacteria* die gleichen Vertreter der einzelnen Klassen vorhanden: *Actinobacteria* (Phylum *Actinobacteria*), *Bacteroidia* (Phylum *Bacteroidetes*), *Deferribacteres* (Phylum *Deferribacteres*), *Mollicutes* (Phylum *Tenericutes*) und aus dem Phylum *Firmicutes* die Klassen *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, sowie eine unbekannte Klasse.

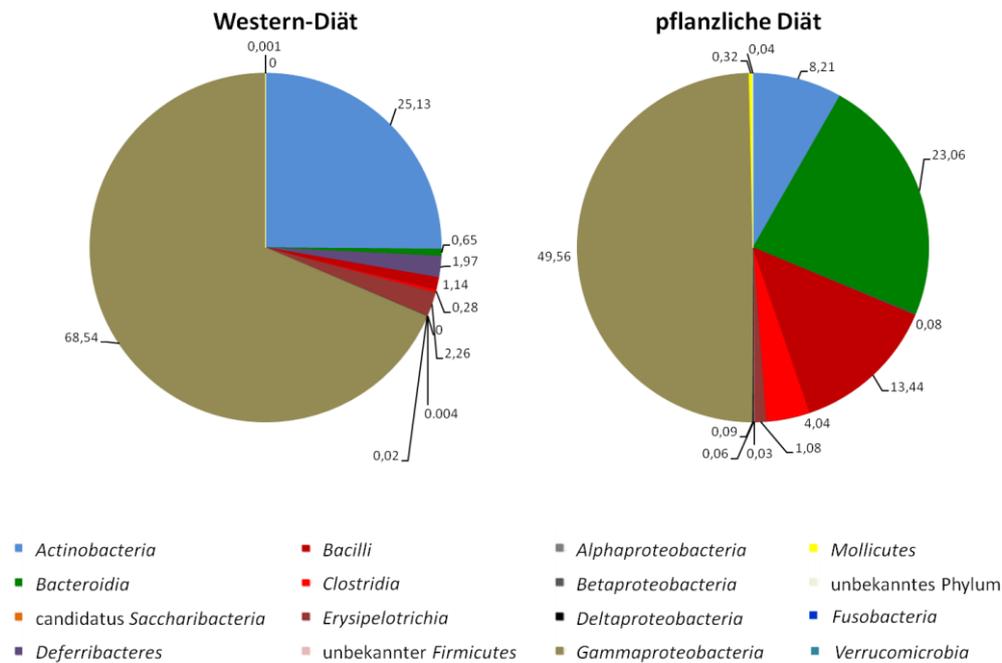


Abb. 3.18: Zusammensetzung der Bakterienklassen im Mäusedarm nach einer Salmonelleninfektion. Dargestellt sind die Bakterienklassen (in Prozent) in der Mäusemikrobiota 24 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$. Die Mäuse erhielten entweder eine Western-Diät oder eine pflanzliche Diät. Die zugeordneten Farben wurden gemäß der Bakterienphylogazugehörigkeit gewählt: Klasse *Actinobacteria* gehört zum Stamm *Actinobacteria* (blau), Klasse *Bacteroidia* zum Phylum *Bacteroidetes* (grün), Klasse *candidate Saccharibacteria* zum Phylum *candidate Saccharibacteria* (orange), Klasse *Deferribacteres* zum Phylum *Deferribacteres* (lila), die Klassen *Bacilli*, *Clostridia* und *Erysipelotrichia* sind Teil des Phylums *Firmicutes* (Rottöne), die Klassen *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- und *Gammaproteobacteria* gehören zum Phylum *Proteobacteria* (Grautöne) und die Klasse *Mollicutes* (0 % bei Western-Diät) wird dem Phylum *Tenericutes* (gelb) zugeordnet. Diejenigen OTUs, die keiner Klasse bzw. keinem Phylum zugeordnet werden konnten, sind als unbekanntes Phylum eingezeichnet (hellrosa).

Die Diät-abhängigen Unterschiede in der bakteriellen Vielfalt von der Salmonellen-infizierten Mikrobiota sind auf Familien- und Gattungsebene deutlich geringer im Vergleich zu denen vor der Streptomycinbehandlung. Insgesamt reagierten nur drei Bakterienfamilien unterschiedlich auf die Fütterungsform der Mäuse (Tab. 3.8). Dazu zählten die Familie *Porphyromonadaceae* des Phylums *Bacteroidetes* und die Familie *Enterococcaceae* des Phylums *Firmicutes*, die beide signifikant stärker präsent waren in der Mikrobiota von pflanzlich ernährten Mäusen. Letztere konnte zudem nicht in der Western-Diät-Gruppe nachgewiesen werden. Bei der dritten Bakterienfamilie handelte es sich um die *Coriobacteriaceae*, die dem Phylum *Actinobacteria* zugeordnet werden und hauptsächlich in Mäusen, die eine pflanzliche Diät erhielten, nachgewiesen werden konnten.

Tab. 3.8: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakterienfamilien nach einer Salmonelleninfektion. Aufgelistet sind jeweils die Bakterienfamilien, bei denen ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) in der Abundanz bei unterschiedlichen Diäten der Mäuse 24 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium* $\Delta invA$ festgestellt werden konnte. Zudem sind die Phylazugehörigkeit der jeweiligen Familie, der p -Wert und die gemittelte Abundanz der Bakterienfamilie aus allen Mäusen in Prozent (MW) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschieden wird dabei zwischen den Mäusen die eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät erhielten. In Klammer steht jeweils die Anzahl der Mäuse, in denen die spezielle Bakterienfamilie gefunden wurde. Die Gesamtanzahl der Mäuse, in denen die Anwesenheit einer Familie überprüft wurde, betrug in der Gruppe der Western-Diät 12 und in der Gruppe der pflanzlichen Diät 11 Mäuse.

Phylum	Familie	p -Wert	Western-Diät		pflanzliche Diät	
			MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]
Actinobacteria	<i>Coriobacteriaceae</i>	0,0263	25,13 (11)	17,30	8,21 (9)	5,88
Bacteroidetes	<i>Porphyromonadaceae</i>	0,0566	0,511 (3)	0,816	19,03 (8)	20,77
Firmicutes	<i>Enterococcaceae</i>		(0)		12,89 (7)	16,74

Die Gattung *Olsenella*, die zur Familie der *Coriobacteriaceae* gehört, zeigte ein signifikant höheres Vorkommen bei Fütterung einer Western-Diät (Tab. 3.9). Zusätzlich konnte die Gattung *Allobaculum*, die Teil des Phylums *Firmicutes* ist, nur in dieser Diätgruppe nachgewiesen werden. Dagegen konnten zwei andere Gattungen, *Barnesiella* (Phylum *Bacteroidetes*) und *Enterococcus* (Phylum *Firmicutes*), nur in Mäusen detektiert werden, die eine pflanzliche Diät erhielten.

Tab. 3.9: Einfluss der Diäten auf unterschiedliche Bakteriengattungen nach einer Salmonelleninfektion. Aufgelistet sind jeweils die Bakteriengattungen, bei denen ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) in der Abundanz bei unterschiedlichen Diäten der Mäuse 24 h nach Infektion mit Salmonellen festgestellt werden konnte. Zudem sind die Phylazugehörigkeit der jeweiligen Familie, der p -Wert und die gemittelte Abundanz der Bakterienfamilie aus allen Mäusen in Prozent (MW) mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschieden wird dabei zwischen den Mäusen die eine Western- bzw. eine pflanzliche Diät erhielten. In Klammer steht jeweils die Anzahl der Mäuse, in denen die spezielle Bakteriengattung gefunden wurde. Die Gesamtanzahl der Mäuse, in denen die Anwesenheit einer Gattung überprüft wurde, betrug in der Gruppe der Western-Diät 12 und in der Gruppe der pflanzlichen Diät 11 Mäuse.

Phylum	Gattung	p -Wert	Western-Diät		pflanzliche Diät	
			MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]
Actinobacteria	<i>Olsenella</i>	0,0263	25,13 (11)	17,30	8,21 (9)	5,88
Bacteroidetes	<i>Barnesiella</i>		(0)		8,32 (5)	12,30
Firmicutes	<i>Allobaculum</i>		2,25 (9)	1,70	(0)	
	<i>Enterococcus</i>		(0)		12,89 (7)	16,74

Zusammenfassend ist erkennbar, dass durch die Antibiotikabehandlung und Salmonelleninfektion die Diversität in der Mikrobiota jedes Mal signifikant abnahm. Ebenso vertrat zu allen drei Zeitpunkten jeweils nur eine einzige Gattung, nämlich *Olsenella*, *Mucispirillum* und *Anaeroplasma*, die drei Phyla *Actinobacteria*, *Deferribacteres* und *Tenericutes*. Nach der Streptomycinbehandlung konnte noch im Phylum *Actinobacteria* eine weitere Gattung, nämlich *Enterorhabdus*, detektiert werden, die allerdings nur in vergleichbar geringer Abundanz auftrat. Da das Phylum candidatus *Saccharibacteria*

noch nicht näher beschrieben wurde, erfolgte hier keine präzisere Unterteilung. Es konnte allerdings nur ein OTU identifiziert werden, welches von seiner Sequenz her diesem neuen Phylum zugeordnet wird. Dies spricht dafür, dass auch dieses Phylum nur durch eine Gattung repräsentiert wurde. Der Einfluss der Diäten auf die Bakterienzusammensetzung der Mikrobiota war vor jeglicher Behandlung am deutlichsten zu erkennen. So zeigte z.B. die Mikrobiota von pflanzlich ernährten Mäusen eine signifikant höhere Diversität als die Mikrobiota der Mäuse aus der Western-Diät-Gruppe. Die Streptomycinbehandlung führte zu einem starken Anstieg an *Actinobacteria* und zum Verlust vieler anderer Bakterienarten im Darm. Nach der Salmonellen-Infektion konnte ein starker Anstieg im Vorkommen der *Gammaproteobacteria* beobachtet werden und eine erneute Verringerung der Diversität.

3.4.4 Sequenzanalyse des aus dem Mäusedarm isolierten Salmonellen-Transkriptoms

3.4.4.1 Schrittweise Synthese der cDNA-Bibliotheken

Die für die Herstellung der cDNA benötigte RNA wurde aus Salmonellen isoliert, die zuvor mittels IMS aus dem Mäusedarm aufgereinigt wurden. Für die Konstruktion einer cDNA-Bibliothek wurden jeweils 4-10 µg RNA als Ausgangsmaterial benötigt. Die RNA-Isolation aus Mäusen der Western-Diät-Gruppe ergab eine Gesamtausbeute von über 30 µg, wobei sich die RNA-Mengen zwischen 0,77 µg und 5,6 µg bewegten (Tab. 3.10). Aus den Mäusen Nummer 7 und 25, die in Tab. 3.10 grün markiert sind, konnte aufgrund der hohen RNA-Menge jeweils eine eigene cDNA-Bibliothek erstellt werden. Die RNA-Isolation aus Mäusen, die eine pflanzlichen Diät erhielten, lieferte insgesamt deutlich geringere Mengen (Tab. 3.10). Eine genauere Prüfung ergab, dass bei den Proben Nr. 13-19 keine Bindung der Salmonellen an den BacTrace-Antikörper erfolgt war. Daher wurden für die Maus-Proben Nr. 20-24 der Salmonellen-Antikörper der Firma ViroStat verwendet und vor der IMS jeweils 0,1 % TritonX zur Probe hinzugegeben. Trotz einer verbesserten Salmonellen-Ausbeute konnte nur eine RNA-Gesamtmenge von 9 µg erreicht werden. Allgemein wurden Proben, bei denen die Konzentration unter 6 ng/µl lag, verworfen. Zusätzlich wurde als ein weiterer Parameter das Verhältnis E_{260}/E_{280} berücksichtigt, da dieses erste Hinweise auf die Qualität der RNA liefert. Hierbei wurden nur solche Proben weiter verwendet, bei denen das Verhältnis über 1,7 lag.

Tab. 3.10: RNA-Menge der einzelnen Darminhaltsproben. Die gewonnenen RNA-Mengen aus den Darmproben der Mäuse Nr. 1-24 sind in Abhängigkeit von der jeweils verabreichten Diät (Western-Diät oder pflanzliche Diät) aufgelistet. Die RNA-Konzentration ist in ng/μl angegeben und lag in einem Gesamtvolumen von 55 μl vor, woraus sich die Gesamtmenge [ng] errechnete. Ebenso sind die Verhältnisse E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} der RNA-Proben in der Tabelle eingetragen. Grün unterlegt sind die Proben mit der höchsten RNA-Konzentration und grau diejenigen, deren Konzentration ≤ 6 ng/μl war. Aufgrund der geringen RNA-Ausbeute wurde aus dem Darminhalt der Mäuse Nr. 13 und 14 die RNA noch ein zweites Mal isoliert (13.2 und 14.2).

Maus-Nr.	RNA-Konzentration [ng/μl]	Verhältnis E_{260}/E_{280}	Verhältnis E_{260}/E_{230}	RNA-Gesamtmenge [ng]
Western-Diät				
1	83,1	2,11	1,74	4.570,5
2	24,2	2,04	1,13	1.331,0
3	39,1	2,10	1,12	2.150,5
25	102,1	2,10	1,98	5.615,5
5	19,6	2,04	0,35	1.078,0
6	14,0	2,07	0,56	770,0
7	93,3	2,08	1,79	5.131,5
8	70,8	2,16	1,61	3.894,0
9	55,1	2,06	1,61	3.030,5
10	69,5	2,15	1,65	3.822,5
11	23,4	2,02	0,26	1.287,0
12	29,2	2,10	0,95	1.606,0
				34.287,0
pflanzliche Diät				
13.1	2,3	1,30	0,56	126,5
13.2	8,6	2,03	0,19	473,0
14.1	9,5	1,74	0,54	522,5
14.2	11,1	2,05	0,39	610,5
15	19,6	2,05	1,79	1.078,0
16	6,5	2,12	0,11	357,5
17	15,5	1,88	0,42	852,5
18	2,9	1,72	0,16	159,5
19	2,3			126,5
20	15,5	1,87	1,42	852,5
21	20,0	2,19	0,66	1.100,0
22	11,8	1,80	0,84	649,0
23	21,3	2,13	1,21	1.171,5
24	23,6	2,09	1,83	1.298,0
				8.965,0

Um die erforderliche RNA-Ausgangsmenge von 4-10 μg zu erreichen, wurden die Proben vor der Anfertigung der cDNA-Bibliotheken wie folgt zusammengeführt:

cDNA-Bibliothek Nr.	RNA-Proben
1	Maus-Nr. 25
2	Maus-Nr. 7
3	Mäuse-Nr. 1-3, 5-6
4	Mäuse-Nr. 8-12
5	Mäuse-Nr. 13-20
6	Mäuse-Nr. 21-24

Nach Fertigstellung der cDNA-Bibliotheken, die 150 bis 200 bp große cDNA-Fragmente enthielten, wurden diese mittels des Bioanalyzers auf ihre Integrität hin überprüft. Die cDNA-Bibliotheken Nr. 1-4, die aus den Mäusen mit der Western-Diät isoliert wurden, zeigten klare und starke Banden auf Höhe der 150 und 200 bp-Markerbanden (Abb. 3.19). Die Proben, die aus Mäusen mit der pflanzlichen Diät isoliert wurden, wiesen etwas schwächere Banden auf. Bei der cDNA-Bibliothek Nr. 5 lag die Größe der cDNA-Fragmente bei etwa 170-250 bp. Das Elektropherogramm bestätigte die etwas niedrigere Qualität der cDNA-Bibliotheken Nr. 5 und 6, da hier die Peaks kleiner und breiter waren als bei den cDNA-Bibliotheken Nr. 1-4.

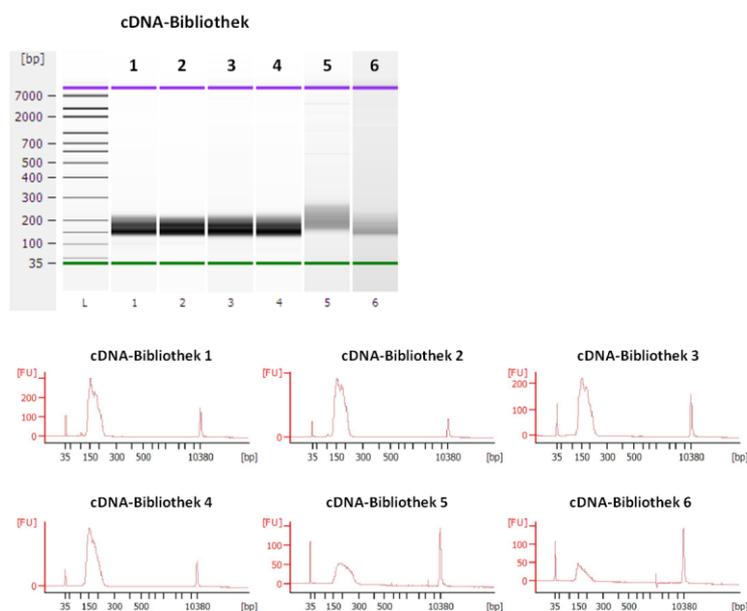


Abb. 3.19: Fragmentgrößenbestimmung der cDNA-Bibliotheken. Mittels des Bioanalyzers wurden die Fragmentgrößen der aufgenommenen cDNA-Bibliotheken und deren Qualität bestimmt. Im oberen Bild ist ein erstelltes Gelbild mit der Fragmentgröße der jeweiligen cDNA gezeigt, welches einen Marker (links) mit den benannten Fragmentgrößen beinhaltet. Die Proben 1-6 stehen für die cDNA-Bibliotheken Nr. 1-6. Im unteren Bildabschnitt sind Elektropherogramme der einzelnen cDNA-Bibliotheken dargestellt. Dabei sind als x-Achse die Fragmentgröße der DNA und als y-Achse deren Fluoreszenz Einheiten (*fluorescence units*; FU) aufgetragen.

3.4.4.2 Einfluss der Diäten auf das Transkriptom von *S. Typhimurium* ST4/74 $\Delta invA$

Die Sequenzierung der cDNA-Bibliothek mittels der Illumina HiSeq2500 ergab nach Filterung der rRNA eine Anzahl von ca. 1,2 Mio. *Reads* pro Diätgruppe. Mittels einer statistischen Auswertung konnten 66 Gene identifiziert werden, die in Bezug auf die jeweilige Mausdiät unterschiedlich exprimiert wurden ($FDR < 0,1$). Die Zuordnung zum jeweiligen physiologischen Prozess erfolgte über die COG Datenbank.

Von den 66 identifizierten Genen (Tab. 3.11) waren 38 Gene in den pflanzlich ernährten Mäusen hochreguliert und 28 Gene zeigten bei Fütterung einer Western-Diät eine höhere Expression. Auffallend ist, dass von den 38 Genen, die bei einer pflanzlichen Ernährung stärker exprimiert wurden, 21 Gene dem Transport und der Metabolisierung von Kohlenhydraten zugeordnet werden konnten. Hierzu zählen Gene, die bei der Verstoffwechslung von Arabinose, Rhamnose und Melibiose eine Rolle spielen, sowie für verschiedene Substrat-spezifische PTS kodieren, wie z.B. Fruktose-, Sorbitol- und Galaktitol/Tagatose-spezifische PTS. Die in der Western-Diät hochregulierten Gene spielen selten eine Rolle beim Transport und der Metabolisierung von Kohlenstoffen. Stattdessen wird hierbei z.B. die Expression des *marRAB* Operons induziert, welches mitverantwortlich ist für die Entwicklung von Multiresistenzen. Eine erhöhte Transkription zeigen ebenso Phagenschockgene (*pspA-D* und *pspG*), die eine Rolle beim Erhalt der Membranintegrität spielen und nach Infektion von Makrophagen stärker exprimiert werden. Ebenso sind zwei in der Fimbrienproduktion mitwirkenden Gene hochreguliert. Somit zeigten bei pflanzlich ernährten Mäusen die Salmonellen überwiegend eine verstärkte Expression von verschiedenen Stoffwechselgenen, wogegen sie in einer Western-Diät größtenteils Virulenzgene und für die Fortbewegung zuständigen Gene verstärkt transkribieren.

Tab. 3.11: Gene, die einen Diät-abhängigen Unterschied in ihrer Expressionsstärke aufwiesen. Die Gene sind dem jeweiligen physiologischen Prozess untergeordnet, dem sie zugehörig sind. Die Genbezeichnung entspricht der Bezeichnung von *S. Typhimurium* ST4/74. Angegeben ist die *Reads*-Anzahl dieser Gene bei Fütterung der Mäuse mit einer pflanzlichen (*Reads* pD) bzw. Western-Diät (*Reads* WD). Der Log_2FC gibt an, wie stark die Veränderung zwischen beiden Bedingungen war. Negative Werte weisen eine höhere Transkription des Gens in pflanzlich-gefütterten Mäusen und positive Werte sprechen für eine verstärkte Expression des Gens in Mäusen der Western-Diät-Gruppe. Der FDR-Wert (*false discovery rate*) gibt ein korrigiertes Signifikanzniveau an. Ebenso angegeben sind die (hypothetischen) Funktionen der Proteine, welche die jeweiligen Gene kodieren. Die Zuordnung des physiologischen Prozesses erfolgte über die COG-Datenbank.

physiologischer Prozess	Genbezeichnung	<i>Reads</i> pD	<i>Reads</i> WD	Log_2FC	FDR	Funktion
Biogenese von Zellwand / -membran und -hülle	STM474_RS02895	6	43	2,80	$8,86 \cdot 10^{-2}$	Protein mit einer Isomerasen-Domäne
	STM474_RS05555	45	4	-3,46	$1,81 \cdot 10^{-2}$	N-Acetylneuraminat-Epimerase
	STM474_RS23290	49	427	3,11	$2,67 \cdot 10^{-3}$	Glucosamin:Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase
	STM474_RS23295	140	809	2,52	$2,85 \cdot 10^{-2}$	Glucosamin:Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferase
Energieproduktion und -umwandlung	STM474_RS01290 (<i>dkgB</i>)	589	96	-2,63	$1,92 \cdot 10^{-2}$	2,5-Didehydrogluconat-Reduktase B
	STM474_RS02685	124	19	-2,71	$3,02 \cdot 10^{-2}$	mögliche Acyl-CoA-Synthetase
	STM474_RS07645	116	1056	3,17	$1,52 \cdot 10^{-3}$	Hydrogenase
	STM474_RS19035	23	128	2,46	$6,92 \cdot 10^{-2}$	Flavin-abhängiges α -Hydroxycarbonsäure-oxidierendes Enzym IldD
posttranslationale Modifikation, Proteinturnover und Chaperone	STM474_RS19605	353	1702	2,26	$6,96 \cdot 10^{-2}$	Hitzeschockprotein IbpB
Transkription	STM474_RS07555	51	425	3,04	$3,38 \cdot 10^{-3}$	transkriptioneller Regulator (Aktivator; <i>mar</i> -Gene)
	STM474_RS07560	30	202	2,73	$2,00 \cdot 10^{-2}$	transkriptioneller Regulator (Repressor; <i>mar</i> -Gene)
	STM474_RS13105	87	406	2,21	$9,96 \cdot 10^{-2}$	transkriptioneller Regulator CadC (<i>cadBA</i> -Operon)
	STM474_RS16770	286	1469	2,35	$5,23 \cdot 10^{-2}$	transkriptioneller Regulator (<i>tdcABCDEFG</i> -Operon)
Transkription, Signaltransduktionsmechanismus	STM474_RS08435	184	3098	4,06	$2,26 \cdot 10^{-5}$	Phagenschockprotein A (PspA)
Transport und Metabolisierung von Aminosäuren	STM474_RS17250	1191	104	-3,53	$2,85 \cdot 10^{-4}$	N-Acetylneuraminat-Lyase
	STM474_RS18510 (<i>tppB</i>)	99	553	2,47	$3,64 \cdot 10^{-2}$	MFS-Transporter
	STM474_RS20375	546	24	-4,51	$6,64 \cdot 10^{-6}$	Membranprotein
	STM474_RS20765	0	11	6,47	$6,70 \cdot 10^{-2}$	Aminosäuretransporter
	STM474_RS22905	250	6	-5,37	$9,39 \cdot 10^{-7}$	Ornithin-

					Carbamoyltransferase (Arginin-Stoffwechsel)	
	STM474_RS22910	224	16	-3,81	$2,85 \cdot 10^{-4}$	Carbamat-Kinase (Arginin-Stoffwechsel)
	STM474_RS22915	299	6	-5,62	$2,36 \cdot 10^{-7}$	Arginin-Deiminase (Arginin-Stoffwechsel)
Transport und Metabolisierung von Kohlenhydraten	STM474_RS00510	485	47	-3,38	$7,67 \cdot 10^{-4}$	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (Arabinose-Stoffwechsel)
	STM474_RS00515	1953	148	-3,73	$1,05 \cdot 10^{-4}$	L-Arabinose-Isomerase (Arabinose-Stoffwechsel)
	STM474_RS00520	2107	153	-3,80	$7,77 \cdot 10^{-5}$	Ribulokinase (Arabinose-Stoffwechsel)
	STM474_RS02630	90	15	-2,59	$6,28 \cdot 10^{-2}$	Glyoxylat-Carboligase
	STM474_RS02635	34	1	-4,94	$2,73 \cdot 10^{-3}$	Hydroxypyruvat-Isomerase
	STM474_RS11320	966	118	-3,05	$2,67 \cdot 10^{-3}$	Fruktose-spezifische EIIBC-Komponente (PTS)
	STM474_RS11325 (<i>fruK</i>)	407	59	-2,80	$1,03 \cdot 10^{-2}$	1-Phosphofruktokinase (Fruktose-Stoffwechsel)
	STM474_RS11330	1100	107	-3,37	$5,49 \cdot 10^{-4}$	phosphattransportierendes Protein HPr (Fruktose-Stoffwechsel)
	STM474_RS14665 (<i>srIA</i>)	97	12	-3,02	$1,52 \cdot 10^{-2}$	Sorbitol-spezifische EIIC-Komponente (PTS)
	STM474_RS14670 (<i>srIE</i>)	155	19	-3,03	$7,82 \cdot 10^{-3}$	Sorbitol -spezifische EIIB-Komponente (PTS)
	STM474_RS14675	131	8	-4,03	$3,17 \cdot 10^{-4}$	Sorbitol-spezifische EIIA-Komponente (PTS)
	STM474_RS14680	280	46	-2,62	$2,66 \cdot 10^{-2}$	Sorbitol-6-Dehydrogenase
	STM474_RS16805 (<i>gatY/kbaY</i>)	389	3	-6,97	$9,04 \cdot 10^{-10}$	Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase
	STM474_RS16810 (STM3254)	379	1	-8,41	$6,15 \cdot 10^{-11}$	1-Phosphofruktokinase
	STM474_RS16815 (STM3255)	257	13	-4,31	$3,89 \cdot 10^{-5}$	EIIC-Komponente (PTS)
	STM474_RS16820 (STM3256)	124	5	-4,61	$7,51 \cdot 10^{-5}$	EIIA-Komponente (PTS)
	STM474_RS16825 (<i>gatZ</i>)	144	26	-2,48	$6,20 \cdot 10^{-2}$	Tagatose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
	STM474_RS20795	184	29	-2,67	$2,66 \cdot 10^{-2}$	L-Rhamnose-Isomerase
	STM474_RS20800	146	27	-2,44	$6,70 \cdot 10^{-2}$	Rhamnulokinase
	STM474_RS22070	13588	1586	-3,11	$1,56 \cdot 10^{-3}$	α -Glucosidase/ α -Galaktosidase (Melibiose-Stoffwechsel)
	STM474_RS22075	2431	325	-2,92	$3,94 \cdot 10^{-3}$	Melibiose-transportierendes Protein
	STM474_RS23275	42	213	2,33	$8,16 \cdot 10^{-2}$	PTS-Zuckertransporter

	STM474_RS23285	45	360	2,98	$4,77 \cdot 10^{-3}$	Mannose-spezifische EIID-Komponente (PTS)
Transport und Metabolisierung von Nukleotiden	STM474_RS02655	122	24	-2,35	$9,96 \cdot 10^{-2}$	zyklische Amidohydrolase
	STM474_RS02690	70	3	-4,50	$4,52 \cdot 10^{-4}$	hypothetisches Protein
	STM474_RS05990	47	654	3,78	$1,23 \cdot 10^{-4}$	Außenmembranprotein
	STM474_RS07520	149	26	-2,53	$5,18 \cdot 10^{-2}$	hypothetisches Protein
	STM474_RS07550	10	62	2,60	$8,86 \cdot 10^{-2}$	multipl Antibiotikaresistenzprotein MarB
	STM474_RS07920	218	1741	2,98	$3,02 \cdot 10^{-3}$	NADP-abhängige Oxidoreduktase
	STM474_RS08420	18	207	3,50	$9,67 \cdot 10^{-4}$	Phagenschockprotein D (PspD)
	STM474_RS08425	64	1087	4,07	$2,74 \cdot 10^{-5}$	DNA-bindender transkriptioneller Aktivator PspC
	STM474_RS08430	40	777	4,26	$1,54 \cdot 10^{-5}$	Phagenschockprotein B (PspB)
Unbekannte Funktion / keine Zuordnung	STM474_RS08640	112	6	-4,21	$2,85 \cdot 10^{-4}$	hypothetisches Protein
	STM474_RS08645	140	13	-3,43	$2,16 \cdot 10^{-3}$	hypothetisches Protein
	STM474_RS09370	55	475	3,09	$2,67 \cdot 10^{-3}$	hypothetisches Protein
	STM474_RS16440	627	59	-3,42	$5,49 \cdot 10^{-4}$	NADPH:Chinon-Reduktase MdaB
	STM474_RS16445	514	105	-2,30	$6,79 \cdot 10^{-2}$	Chinol-Monooxygenase
	STM474_RS17360	21	139	2,71	$2,91 \cdot 10^{-2}$	Außenmembranprotein
	STM474_RS17365	53	317	2,56	$2,93 \cdot 10^{-2}$	Membranprotein
	STM474_RS18960	227	48	-2,25	$9,96 \cdot 10^{-2}$	hypothetisches Protein
	STM474_RS21645	0	31	7,95	$4,52 \cdot 10^{-4}$	Membranprotein
	STM474_RS21785	9	160	4,12	$1,75 \cdot 10^{-4}$	Phagenschockprotein (pspG)
	STM474_RS22900	140	24	-2,55	$5,02 \cdot 10^{-2}$	Dicarbonsäure-spezifischer ABC-Transporter
Zellbeweglichkeit, intrazellulärer Transport, Sekretion und vesikulärer Transport	STM474_RS02755 (<i>fimA</i>)	163	1100	2,74	$1,03 \cdot 10^{-2}$	fimbriales Protein A (Typ 1)
	STM474_RS02765 (<i>fimC</i>)	21	125	2,55	$5,31 \cdot 10^{-2}$	Chaperon-Protein FimC

3.5 Charakterisierung eines Galaktitol-spezifischen PTS

Gene eines Galaktitol-spezifischen PTS zeigten in *S. Typhimurium* ausschließlich in Kombination mit der pflanzlichen Diät eine erhöhte Expression (Tab. 3.11). Dieses PTS sollte daher sowohl bioinformatisch als auch molekularbiologisch analysiert werden, wobei hierfür zunächst der Aufbau des Genbereichs im Stamm ST4/74 genauer betrachtet wurde. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Anwesenheit und des Aufbaus dieses Genbereichs in 69 weiteren Serovar-Typen und Subspezies *in silico*.

3.5.1 Genomischer Aufbau des Galaktitol-spezifischen PTS in *S. Typhimurium* ST4/74 und anderen *Salmonella* Stämmen

In *S. Typhimurium* ST4/74 ist der für Galaktitol-Aufnahme und -Verstoffwechslung zuständige Genbereich 9,6 kb groß und kodiert für insgesamt 10 Gene. Mittels der Online-Plattform Bprom konnten drei putative Promotoren identifiziert werden, nämlich P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Insgesamt wurden noch 69 weitere Stämme auf die Anwesenheit dieses Genbereichs überprüft (siehe Abb. 3.20).

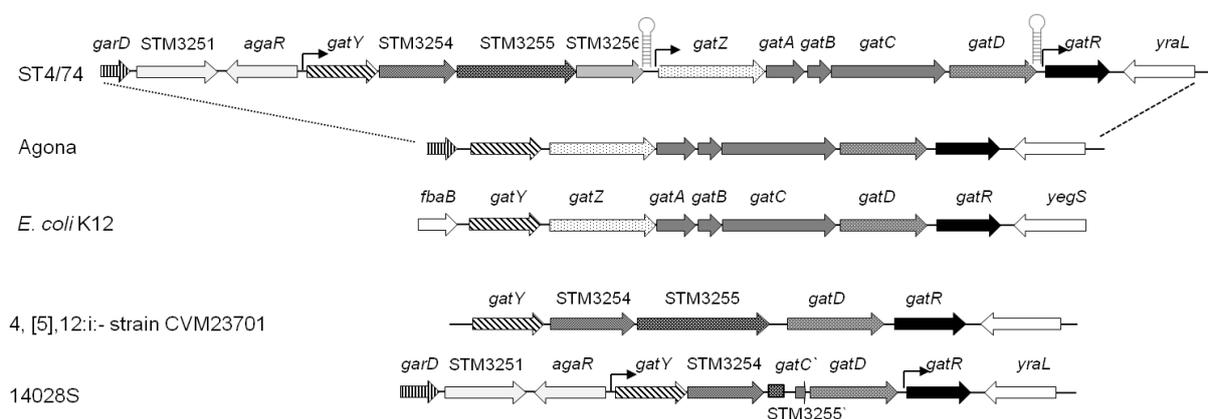


Abb. 3.20: Schematischer Aufbau des genomischen Bereichs *gatY-gatR*. In der obersten Zeile ist der genomische Aufbau des Bereichs aus *S. Typhimurium* ST4/74 dargestellt, der für die Aufnahme und Metabolisierung von Galaktitol zuständig ist (*gatY-gatR*), sowie dessen flankierende Gene *garD*, STM3251, *agaR* und *yraL*. Dieser Aufbau findet sich auch in den Stämmen, die alle zehn Gene des Bereichs besitzen. Eine weitere Variante des Genbereichs *gatY-gatR* zeigt unter anderem der Stamm *S. Agona*, dem die Gene STM3254-STM3256 fehlen. Dieser Aufbau ist identisch mit der genomischen Organisation des Galaktitol-spezifischen PTS in *E. coli* K12. Der Genbereich der Stämme *S. 4, [5]12:i:-* und *S. Typhimurium* 14028S ist separat aufgelistet, da diese eine gesonderte genomische Organisation aufweisen.

Bei der Untersuchung von 63 *Salmonella*-Genomen wurden zwei verschiedene *gat*-Gencluster ermittelt, die sich durch die Anzahl ihrer Gene unterscheiden (Abb. 3.20). Dabei zeigten 32 Stämme den gleichen Aufbau wie ST4/74 mit insgesamt zehn Genen und einer 91-100%igen Übereinstimmung auf der Aminosäureebene, wobei es sechs Ausnahmen gab, bei der einzelne Gene eine deutlich geringere Übereinstimmung aufwiesen. Bei 31 weiteren Stämmen fehlten die drei Gene STM3254-STM3256, wobei die restlichen Gene vorhanden waren und auf Aminosäureebene

zu 90-100 % mit ST4/74 übereinstimmten. Hier gab es fünf Ausnahmen, bei der die prozentuale Übereinstimmung von bestimmten Genen aus einzelnen Stämmen geringer war. Interessanterweise zeigte in dieser Gruppe das Protein GatY auf Aminosäureebene nur eine Übereinstimmung von 80-81 % zum GatY aus ST4/74. Anzumerken ist, dass die drei fehlenden Gene STM3254-STM3257 in *S. Typhimurium* ST4/74 in der Maus bei einer pflanzlichen Ernährung hochreguliert sind.

Folgende Stämme besitzen alle zehn Gene des Bereichs: *S. Abony* 14, *S. Aqua* NVSL2001, *S. Bareilly* CFSAN001591, *S. Bovismorbificans* 3114, *S. Breanderup* ATCC BAA-664 (Protein STM3254 nur zu 28 % identisch zu STM3254 aus ST4/74), *S. Cerro* CFSAN001669, *S. Give* S5-487, *S. Hadar* RI_05P066, *S. Hartford* CFSAN001075 (Protein GatD: 28 % identisch zu Protein GatD aus ST4/74), *S. Hvittingfoss* A4-620, *S. Inverness* R8-3668, *S. Javiana* CFSAN001992, *S. Manhattan* CFSAN001992, *S. Mississippi* A4-633, *S. Montevideo* S5-403, *S. Muenchen* RKS4129 (Protein GatC: 40 % identisch zu Protein GatC aus ST4/74), *S. Muenster* 660, *S. Namur* 05-2929, *S. Norwich* CFSAN001077 (Protein GatD: 32 % identisch zu Protein GatD aus ST4/74 und Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Ohio* CFSAN001079, *S. Paratyphi A* ATCC 9150 (Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Paratyphi B* SPB7, *S. Pomona* ATCC 10729, *S. Poona* ATCC BAA-1673, *S. Rubislaw* A4-653, *S. Saintpaul* SARA23, *S. Thompson* RM6836, *S. Typhi* CT18 (Protein STM3254: 33 % identisch zu Protein STM3254 aus ST4/74 und Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Typhimurium* LT2, *S. Typhimurium* var. Copenhagen 84, *S. Uganda* R8-3404 und *S. Wandsworth* A4-580.

Zu den *Salmonella*-Stämmen, welche nur sieben der zehn Gene kodieren, zählen folgende: *S. bongori* NCTC12419, *S. Agona* SL483, *S. Alachua* R6-377, *S. Albany* ATCC 51960 (Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Baildon* R6-199, *S. Bredeney* CFSAN001080, *S. Chester* ATCC 11997, *S. Choleraesuis* ATCC 10708, *S. Cubana* CFSAN001083, *S. Derby* 626 (Protein GatB: 35 % identisch zu Protein GatB aus ST4/74), *S. Dublin* SL1438, *S. Enteritidis* CDC_2010K_0968, *S. Gallinarum* 287/91, *S. Gallinarum/Pullorum* RKS5078, *S. Havana* CFSAN001082, *S. Heidelberg* RI-11-013988, *S. Indiana* ATCC 51959, *S. Infantis* 335-3 (Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Kentucky* CVM29188, *S. Mbandaka* ATCC 51958, *S. Meleagridis* 47, *S. Nchanga* CFSAN001092 (Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Newport* CVM19536, *S. Rissen* 150, *S. Schwarzengrund* CVM19633, *S. Senftenberg* SS209 (Protein GatR: 37 % identisch zu Protein GatR aus ST4/74), *S. Tennessee* 4535, *S. Virchow* ATCC 51955, *S. Weltevreden* HI_N05-537 und *S. Worthington* ATCC 9607.

Ausnahmen von diesen zwei Gruppen bildeten alle untersuchten Subspezies-Stämme: *S. enterica* ssp. *houtenae* serovar 16:z4,z32:-, *S. enterica* ssp. *indica* serovar 6,14,25:z10:1,(2),7, *S. enterica* ssp. *arizonae* serovar 62:z4,z23:- und *S. enterica* ssp. *diarizonae* serovar 60:r:e,n,x,z15. Diese Stämme

besaßen das Gen *gatY*, welches auf Aminosäureebene mit GatY aus ST4/74 nur eine geringe Übereinstimmung von ca. 60 % aufwies. Weitere Galaktitol-spezifischen Gene konnten mittels BLAST-Analyse nicht ermittelt werden. Eine weitere Ausnahme bildete das Genom von *S. enterica* ssp. *houtenae* serovar 16:z4,z32:-, in dem zwei Gene eine Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit GatZ (54 %) und GatR (37 %) aufwiesen. Gene aus dem Serovar-Typ *S. enterica* ssp. *enterica* serovar 4,[5],12:i-CVM23701 zeigten eine hohe Übereinstimmung auf Aminosäureebene mit den Proteinen GatY (100 %), STM3254 (99 %), STM3255 (95 %), GatD (100 %) und GatR (100 %) aus ST4/74 und eine geringere Übereinstimmungen mit den Proteinen GatA (24 %), GatB (37 %) und GatC (41 %). Für die restlichen Gene des Genclusters (STM3256 und *gatZ*) konnten keine Übereinstimmungen durch eine BLAST-Suche gefunden werden und scheinen in dem Genabschnitt nicht vorhanden zu sein (siehe Abb. 3.20). Der Genomvergleich mit dem Stamm *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium 14028S, der nicht fähig ist, Galaktitol als Kohlenstoffquelle zu nutzen, identifizierte eine Deletion in diesem Bereich, die von dem Gen STM3255 bis *gatC* reicht. Die restlichen Gene wiesen auf Aminosäureebene eine 100 %ige Übereinstimmung mit den Proteinen aus ST4/74 auf (Abb. 3.20). Zur funktionellen Charakterisierung der einzelnen Gene wurden die entsprechenden Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen umgewandelt und auf Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen verglichen (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Genbezeichnungen und hypothetische Funktionen der kodierenden Proteine. Angegeben sind die Bezeichnungen der Gene, die zum untersuchenden Genbereich zählen und die hypothetischen Funktionen der dazugehörigen Proteine. Zusätzlich wird die Größe des Gens in Basenpaaren [bp], sowie der GC-Gehalt in Prozent angegeben.

Genbezeichnung	Größe des Gens [bp]	GC-Gehalt [%]	hypothetische Funktion des Proteins
<i>gatY</i>	855	51,3	Tagatose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
STM3254	915	43,3	hypothetische Tagatose-1-Phosphatkinase
STM3255	1428	47,4	hypothetische EIIBC-Komponente
STM3256	807	53,4	hypothetische EIIA-Komponente/HPr-Protein
<i>gatZ</i>	1272	51,6	Tagatose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
<i>gatA</i>	465	54,2	Galaktitol-spezifische EIIA-Komponente (PTS)
<i>gatB</i>	285	49,1	Galaktitol-spezifische EIIB-Komponente (PTS)
<i>gatC</i>	1374	55,4	Galaktitol-spezifische EIIC-Komponente (PTS)
<i>gatD</i>	1044	55,0	Galaktitol-1-Phosphat-Dehydrogenase
<i>gatR</i>	774	50,4	Regulatorprotein (Repressor)

Die BLAST-Analyse ergab, dass in dem Gencluster *gatY-gatR* von *S. Typhimurium* ST4/74 alle Gene, die für eine Verstoffwechslung von Galaktitol notwendig sind, vorhanden sind (Tab. 3.12). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Genbereich um ein Galaktitol-spezifisches PTS handelt. Im Gegensatz zu *E. coli* ist die Verstoffwechslung von Galaktitol in *S. Typhimurium* noch nicht näher genetisch charakterisiert. Basierend auf dem *E. coli*-System wird Galaktitol vermutlich von GatA, GatB und GatC aufgenommen, phosphoryliert und anschließend durch die Dehydrogenase GatD in Tagatose-1-Phosphat umgewandelt. Nach einer weiteren Phosphorylierung kann das Substrat durch die Aldolase, die aus zwei Untereinheiten GatY und GatZ besteht, in Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt und in die Glykolyse eingespeist werden (Nobelmann and Lengeler, 1996).

3.5.2 Wachstumsverhalten verschiedener Serovar-Typen und Spezies der Gattung *Salmonella* in Galaktitol- und Tagatose-haltigem M9-Medium

Basierend auf Unterschieden im genomischen Aufbau des Genclusters *gatY-gatR* wurden die Stämme *S. bongori* NCTC 12419, *S. Newport*, *S. Enteritidis* und *S. 4,[5],12:i-* ausgewählt und diese auf ihre Fähigkeit zum Wachstum in M9-Medium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle getestet. Eine exakte Stammbezeichnung der Serovar-Typen *S. Newport* und *S. Enteritidis* war nicht möglich, da diese in der Weihenstephaner-Sammlung nicht genauer beschrieben waren. *S. bongori* und *S. Enteritidis* zählen laut BLAST-Analyse zur zweiten Gruppe, die nur 7 Gene besitzt. Der Serovar-Typ *S. Newport* kann nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden, da es Stämme sowohl mit sieben als auch mit zehn Genen gibt. In Abb. 3.21 ist zu erkennen, dass *S. bongori* und *S. Enteritidis* eine verkürzte Lag-Phase (3 h) zeigen, wohingegen *S. Newport* und ST4/74 WT einen ähnlichen Wachstumsverlauf mit einer Lag-Phase von 6-8 h aufweisen. Der Stamm *S. 4,[5],12:i-* konnte erwartungsgemäß nicht in der Galaktitolumgebung wachsen, da ihm die Gene STM3256, *gatZ*, *gatA*, *gatB* und *gatC* fehlen.

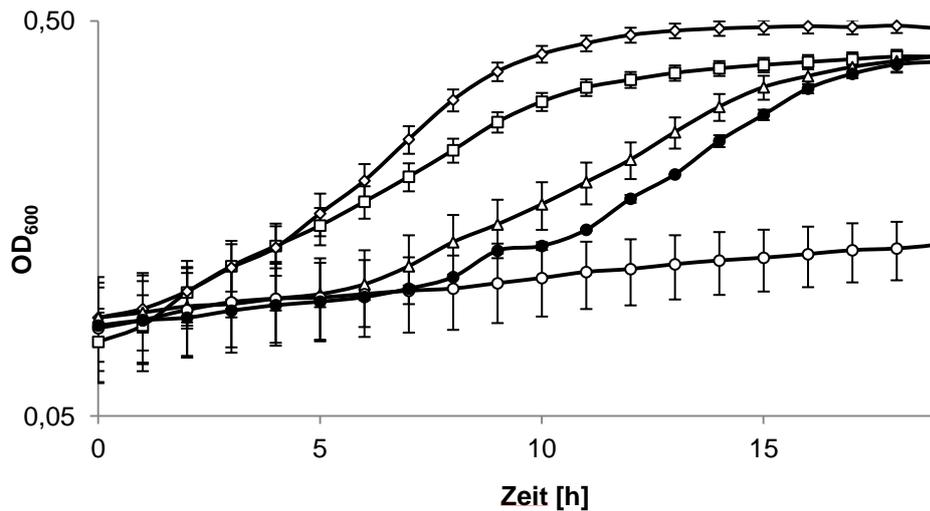


Abb. 3.21: Wachstum von *S. bongori*, *S. Newport*, *S. Enteritidis* und *S. 4,[5],12:i-* in M9+Galaktitol. Minimalmedium mit Galaktitol (1 %) als Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Stämmen angeimpft und die OD₆₀₀ stündlich über 20 h gemessen. Als Vergleichsstamm diente hierbei *S. Typhimurium* ST4/74 (Linie mit schwarzen Kreisen). Getestet wurden die Stämme *S. bongori* NCTC 12415 (Linie mit weißen Vierecken), *S. Newport* (Linie mit weißen Dreiecken), *S. Enteritidis* (Linie mit weißen Rauten) und *S. 4,[5],12:i-* (Linie mit weißen Kreisen).

In *Klebsiella oxytoca* beinhaltet der für die Aufnahme und Metabolisierung von Galaktitol zuständige Genbereich noch ein weiteres Tagatose-spezifisches PTS (Shakeri-Garakani *et al.*, 2004). Da die genomische Organisation von *K. oxytoca* eine hohe Ähnlichkeit zum ST4/74 Galaktitol-spezifischen PTS aufweist, wurden die einzelnen *Salmonella*-Stämme zusätzlich auf das Wachstum mit D-Tagatose als einzige Kohlenstoffquelle getestet.

Hierbei wurden die Stämme *S. bongori* NCTC 12419, *S. Newport* und *S. Enteritidis* auf ihre Wachstumsfähigkeit in D-Tagatose-haltigem Medium überprüft. Wie in Abb. 3.22 dargestellt, sind die Stämme *S. bongori* NCTC 12419 und *S. Enteritidis* nicht in der Lage, D-Tagatose als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

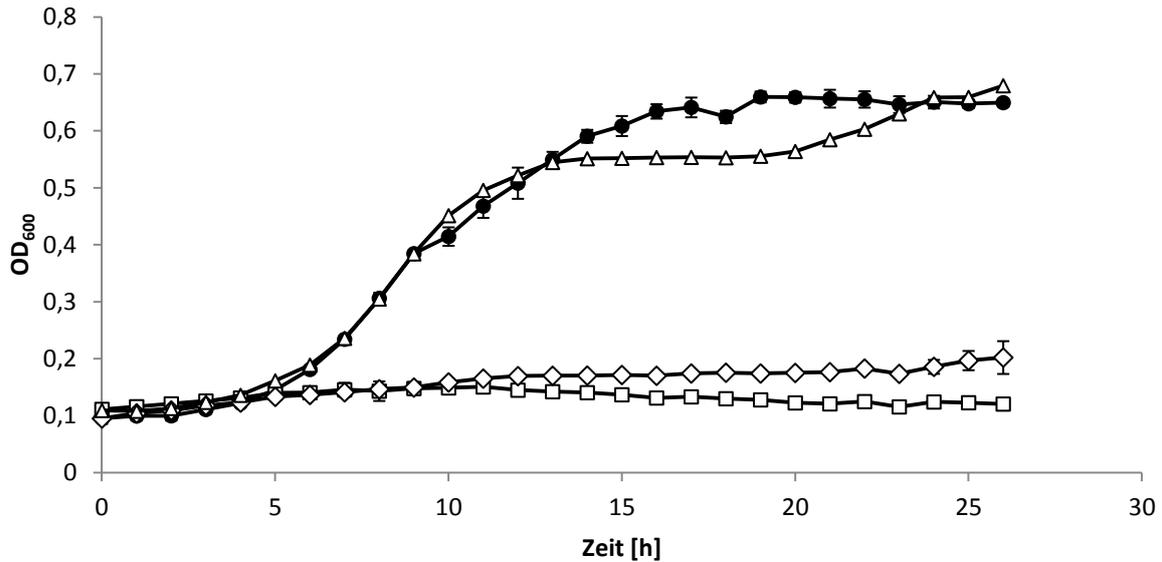


Abb. 3.22: Wachstum von *S. bongori* und *S. Enteritidis* in M9+Tagatose. Minimalmedium mit D-Tagatose (1%) als Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Stämmen angeimpft und die OD₆₀₀ stündlich über 26 h gemessen. Als Kontrollstamm diente hierbei *S. Typhimurium* ST4/74 (Linie mit schwarzen Kreisen). Getestet wurden die Stämme *S. bongori* NCTC 12415 (Linie mit weißen Vierecken) und *S. Enteritidis* (Linie mit weißen Rauten).

3.5.3 Phänotypische Charakterisierung von Deletionsmutanten des Genbereichs *gatY-gatR*

Der bisher beschriebene Genbereich wurde aufgrund bioinformatischer Analysen als ein Galaktitol-spezifisches PTS annotiert. Um dies zu verifizieren wurden verschiedene Deletionsmutanten hergestellt und auf ihr Wachstum im Minimalmedium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gene STM3254, *gatC* und *gatR* bei der Aufnahme und Verstoffwechslung von Galaktitol eine essentielle Rolle spielen (Abb. 3.23). So führten die Deletionen der ersten beiden Gene jeweils zu einem völligen Wachstumsverlust, welcher jedoch durch Komplementierung mittels der Plasmide pBR-STM3254 bzw. pBR-*gatC* wieder kompensiert werden konnte. Dabei zeigte die *gatC* Komplementationsmutante ein besseres Wachstum als der ST4/74-Wildtyp. Der Stamm Δ STM3254/pBR-STM3254 zeigte hingegen ein verzögertes Wachstum mit einer Lag-Phase von etwa 15 h im Gegensatz zur zehnstündigen Lag-Phase des ST4/74-Wildtyps. Teildeletionen in der DNA-Bindedomäne bzw. Substrat-Bindedomäne im Regulatorgen *gatR* verursachten eine verkürzte Lag-Phase (max. 2-3 h). Das Einbringen des Plasmids pBR-*gatR* in die Teildeletionsmutanten hatte einen kompletten Wachstumsverlust in diesem Medium zur Folge. Wie erwartet bewirkte auch die Deletion des gesamten genomischen Bereichs einen Wachstumsverlust (Anhang Abbildung A 9). Eine Deletion des Gens STM3255 führte ebenfalls zu einem Wachstumsverlust, welcher jedoch durch das Plasmid pBR-STM3255 nicht wieder hergestellt werden konnte (Anhang Abbildung A 9).

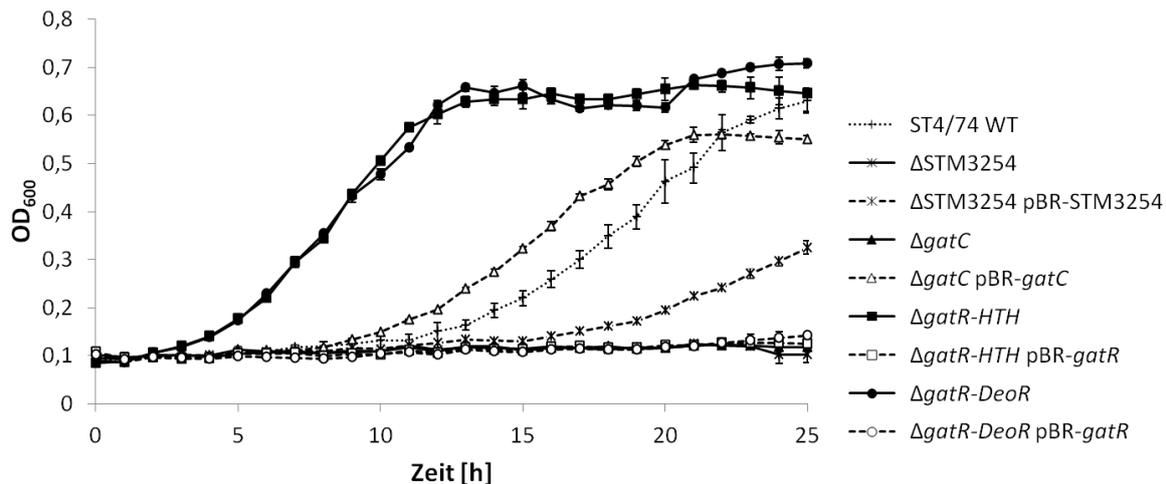


Abb. 3.23: Wachstumsstudien verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9 mit 1 % Galaktitol. Minimalmedium mit Galaktitol (1 %) als einzige Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Deletions- und Komplementationsmutanten von *S. Typhimurium* ST4/74 angeimpft und daraufhin die OD_{600} stündlich über insgesamt 25 h bestimmt. Getestete Stämme waren *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp (gepunktete Linie mit Kreuz), $\Delta STM3254$ (durchgezogene Linie mit Sternen), $\Delta STM3254/pBR-STM3254$ (gestrichelte Linie mit Sternen), $\Delta gatC$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Dreiecken), $\Delta gatC/pBR-gatC$ (gestrichelte Linie mit weißen Dreiecken), $\Delta gatR-HTH$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Vierecken), $\Delta gatR-HTH/pBR-gatR$ (gestrichelte Linie mit weißen Vierecken), $\Delta gatR-DeoR$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Kreisen) und $\Delta gatR-DeoR/pBR-gatR$ (gestrichelte Linie mit weißen Kreisen).

Die einzelnen Mutanten wurden ebenfalls auf das Wachstum in D-Tagatose als einzige Kohlenstoffquelle getestet (Abb. 3.24). Die Mutanten $\Delta gatC$, $\Delta gatR-HTH$ und $\Delta gatR-DeoR$ zeigten das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp in diesem Medium mit einer kurzen Lag-Phase von etwa 4-5 h und dem Eintritt in die stationäre Phase nach 15 h. Interessanterweise wies die Komplementationsmutante von $\Delta gatC$ ($\Delta gatC/pBR-gatC$) ein deutlich schlechteres Wachstum auf als die Deletionsmutante $\Delta gatC$ mit einer verlängerten Lag-Phase von ca. 11 h und einem verlangsamten Wachstum (flachere Kurve). Eventuell sorgt hier die Expression des Galaktitol-spezifischen EIIC Proteins für einen zusätzlichen Energieverbrauch, der sich auf das Wachstum auswirkt. Die Deletionsmutante $\Delta STM3254$ war nicht in der Lage D-Tagatose zu verwerten, wobei dieser Effekt durch das Einbringen des Plasmids pBR-STM3254 kompensiert werden konnte. Die Expression von *gatR* mittels des Plasmids pBR-*gatR* in den beiden Deletionsmutanten $\Delta gatR-HTH$ und $\Delta gatR-DeoR$ führte, wie bereits im Galaktitol-haltigen Medium, zu einem Verlust der Verstoffwechslung der C-Quelle. Die Mutante $\Delta STM3255$ war ebenfalls nicht in der Lage D-Tagatose als Kohlenstoffquelle zu nutzen, wobei hier dieser Effekt nicht durch das Plasmid pBR-STM3255 aufgehoben werden konnte (Anhang Abbildung A 10).

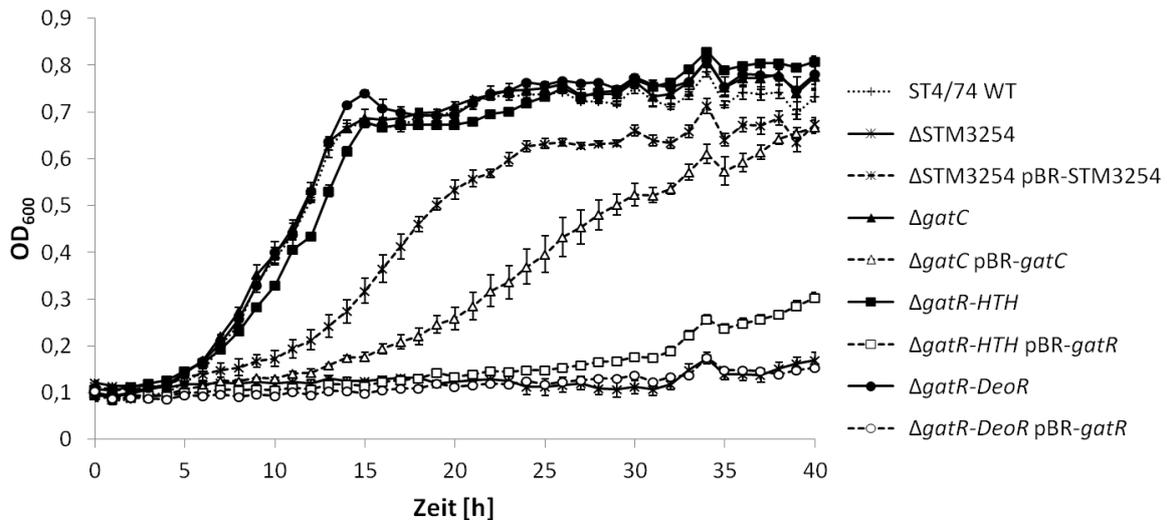


Abb. 3.24: Wachstumsstudien verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9-Medium mit 1% D-Tagatose. Minimalmedium mit D-Tagatose (1%) als einzige Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Deletions- und Komplementationsmutanten von *S. Typhimurium* ST4/74 angeimpft und daraufhin die OD_{600} stündlich über insgesamt 40 h bestimmt. Getestete Stämme waren *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp (gepunktete Linie mit Kreuz), $\Delta STM3254$ (durchgezogene Linie mit Sternen), $\Delta STM3254/pBR-STM3254$ (gestrichelte Linie mit Sternen), $\Delta gatC$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Dreiecken), $\Delta gatC/pBR-gatC$ (gestrichelte Linie mit weißen Dreiecken), $\Delta gatR-HTH$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Vierecken), $\Delta gatR-HTH/pBR-gatR$ (gestrichelte Linie mit weißen Vierecken), $\Delta gatR-DeoR$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Kreisen) und $\Delta gatR-DeoR/pBR-gatR$ (gestrichelte Linie mit weißen Kreisen).

Zusätzlich wurden alle ST4/74-Mutanten in M9-Medium mit Glukose als einzige Kohlenstoffquelle getestet, wobei hier kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten nachgewiesen werden konnte (Anhang Abbildung A 11). Dies lässt auf einen Galaktitol- und Tagatose-spezifischen Phänotyp der jeweiligen Mutanten schließen. Zur weiteren Bestätigung dieser Hypothese wurden Transkriptionsstudien durchgeführt, bei denen die Promotoraktivitäten in verschiedenen Medien analysiert wurden.

3.5.4 Transkriptionsaktivität der drei putativen Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}

Transkriptionsstudien mit dem Reporterprotein GFP zeigten, dass es sich bei den drei putativen Promotoren um aktive Promotoren handelt. In Abb. 3.25 ist zu erkennen, dass alle drei Promotoren eine unterschiedlich starke Aktivität aufwiesen, beginnend mit P_{gatY} nach 24 h mit der höchsten Aktivität (ca. $1,2 \cdot 10^5$ RLU/ OD_{600}), gefolgt von P_{gatZ} (ca. $7 \cdot 10^4$ RLU/ OD_{600}) und P_{gatR} (ca. $3 \cdot 10^4$ RLU/ OD_{600}). Ein erstes Fluoreszenzsignal konnte nach etwa 7 h zeitgleich mit dem Wachstumsbeginn der Stämme (siehe OD_{600} Werte) detektiert werden. In der stationären Phase stagnierte die Fluoreszenzintensität der einzelnen Promotoren. Im Minimalmedium mit Glukose als einzige Kohlenstoffquelle zeigten alle drei Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} , im Gegensatz zur Positivkontrolle P_{rpsM} , keine Aktivität (Anhang Abbildung A 12).

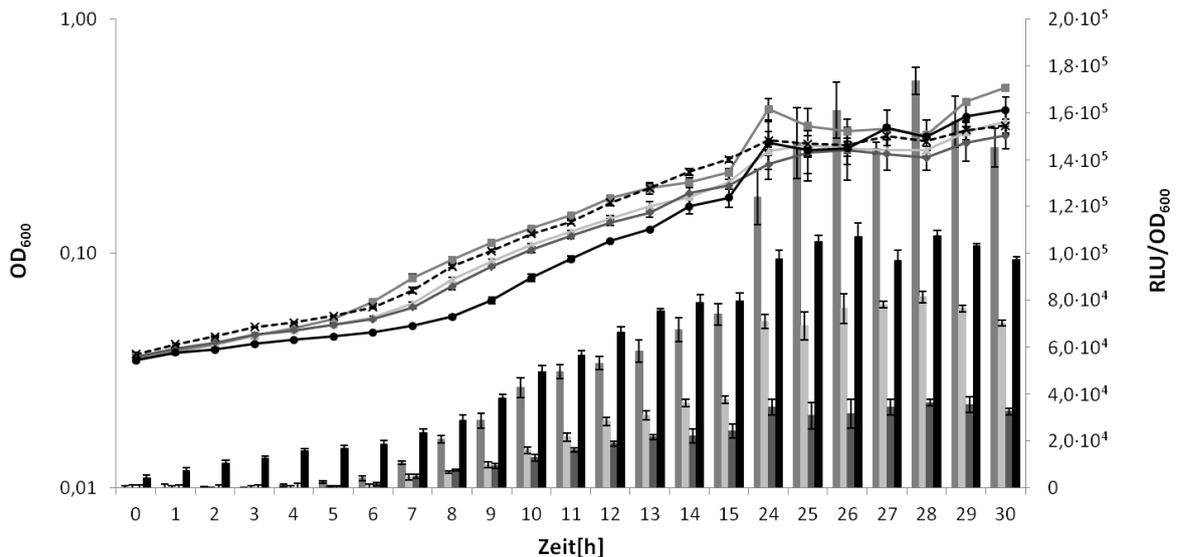


Abb. 3.25: *gfp*-basierte Promotoraktivität von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in M9 mit Galaktitol (Fluoreszenz). Aufgezeichnet ist die Fluoreszenzaktivität der einzelnen Promotoren in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD_{600} . Abgezogen ist die Grundfluoreszenz des Wildtyp-Stammes ST4/74 (nicht gezeigt). Gemessen wurde die RLU/OD_{600} stündlich für die Stämme ST4/74 $P_{gatY}::gfp$ (grauer Balken, jeweils links), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ (hellgrauer Balken, zweiter von links) und ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ (dunkelgrauer Balken, zweiter von rechts). Als Positivkontrolle diente der Stamm ST4/74 $P_{rpsM}::gfp$ (schwarzer Balken), der hinter dem Promotor des Gens *rpsM*, welches das 30S ribosomale Untereinheitsprotein S13 kodiert, das Gen *gfp* integriert hat. Dieser Promotor ist in ST4/74 konstitutiv aktiv. Parallel dazu ist die optische Dichte (OD_{600}) der jeweiligen Stämme aufgetragen: ST4/74 $P_{gatY}::gfp$ (graue Linie mit Vierecken), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ (hellgraue Linie mit Dreiecken), ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ (dunkelgraue Linie mit Rauten), ST4/74 $P_{rpsM}::gfp$ (schwarze Linie mit Kreisen) und ST4/74 Wildtyp (gestrichelte Linie mit Kreuzen). Zwischen den Zeitpunkten $t=15$ h und $t=24$ h erfolgte keine Messung.

Zusätzlich wurden die drei Promotoren noch mit den *lux*-Genen fusioniert und die Lumineszenzintensität als Grad der Promotoraktivität hinzugezogen. Die Ergebnisse hierbei stimmten mit den Fluoreszenzdaten überein, wonach P_{gatY} der aktivste Promotor ist, gefolgt von P_{gatZ} und P_{gatR} (Abb. 3.26). Nach 24 h lagen die RLU-Werte bei den *lux*-Promotorfusionen deutlich höher als bei den *gfp*-Promotorfusionen: für $P_{gatY}::lux$ ca. $8 \cdot 10^6$ RLU/ OD_{600} , für $P_{gatZ}::lux$ ca. $2,5 \cdot 10^6$ RLU/ OD_{600} und für $P_{gatR}::lux$ ca. $2,5 \cdot 10^6$ RLU/ OD_{600} .

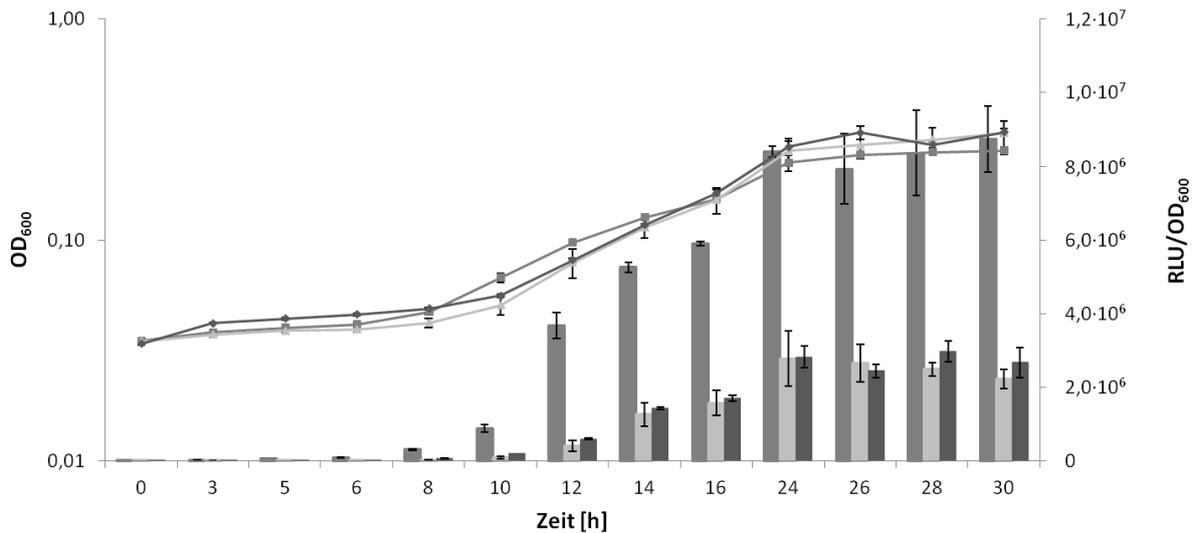


Abb. 3.26: lux-basierte Promotoraktivität von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in M9 mit Galaktitol (Lumineszenz). Aufgezeichnet ist die Lumineszenzaktivität der einzelnen Promotoren in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD₆₀₀. Gemessen wurde die RLU/OD₆₀₀ alle 2-3 h für die Stämme ST4/74 P_{gatY} ::lux (grauer Balken, jeweils links), ST4/74 P_{gatZ} ::lux (hellgrauer Balken, mittig) und ST4/74 P_{gatR} ::lux (dunkelgrauer Balken, rechts). Parallel dazu ist die optische Dichte (OD₆₀₀) von den jeweiligen Stämmen aufgetragen: ST4/74 P_{gatY} ::lux (graue Linie mit Vierecken), ST4/74 P_{gatZ} ::lux (hellgraue Linie mit Dreiecken) und ST4/74 P_{gatR} ::lux (dunkelgraue Linie mit Rauten). Zwischen den Zeitpunkten $t=16$ h und $t=24$ h erfolgte keine Messung.

Für alle drei Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} konnte eine Galaktitol-spezifische Aktivität nachgewiesen werden, wobei sich die Promotoren in ihrer Stärke voneinander unterschieden. Zum Nachweis, dass alle Promotoren ihre jeweiligen Genabschnitte transkribieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt.

3.5.5 Transkriptionsprofil des Genbereichs *gatY-gatR*

Zu Bestimmung des Transkriptionsprofils wurde der Wildtyp-Stamm ST4/74 in Galaktitol-haltigem Medium angezogen und die RNA in der späten exponentiellen Phase isoliert. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mittels PCR überprüft, welche Genabschnitte transkribiert worden sind. Aufgrund der Promotoranzahl wurden 3 Transkripte erwartet, wobei das erste die Gene *gatY* bis STM3256 umfassen sollte, das zweite *gatZ* bis *gatD* und das letzte sollte das Gen *gatR* transkribieren. In Abb. 3.27 ist zu erkennen, dass alle Gene bis auf *gatC* transkribiert werden, wobei die Fragmente für die Gene STM3255 und *gatD* kaum zu erkennen waren. Die Abwesenheit des PCR-Fragmentes von *gatC* könnte sich damit erklären lassen, dass die RNA aus ST4/74 in der späten exponentiellen Phase aus M9-Medium mit Galaktitol isoliert wurde. Da das Protein GatC für die Aufnahme zuständig und in der Membran integriert ist, könnte es sein, dass diese RNA frühzeitig wieder abgebaut wird. Zusätzlich ist das PCR-Fragment über 1.200 bp groß, was bei der Amplifikation von der cDNA ebenfalls zu Problemen führen könnte. Um festzustellen, welche Gene als zusammenhängende Operons transkribiert werden, wurden die Fragmente 11-19 getestet. Es ist zu erkennen, dass hier in allen Fällen ein Transkript vorhanden war, was dafür spricht, dass das

Gencluster als ein Transkript exprimiert wird. Dies war aufgrund der vorhandenen drei Promotoren nicht zu erwarten.

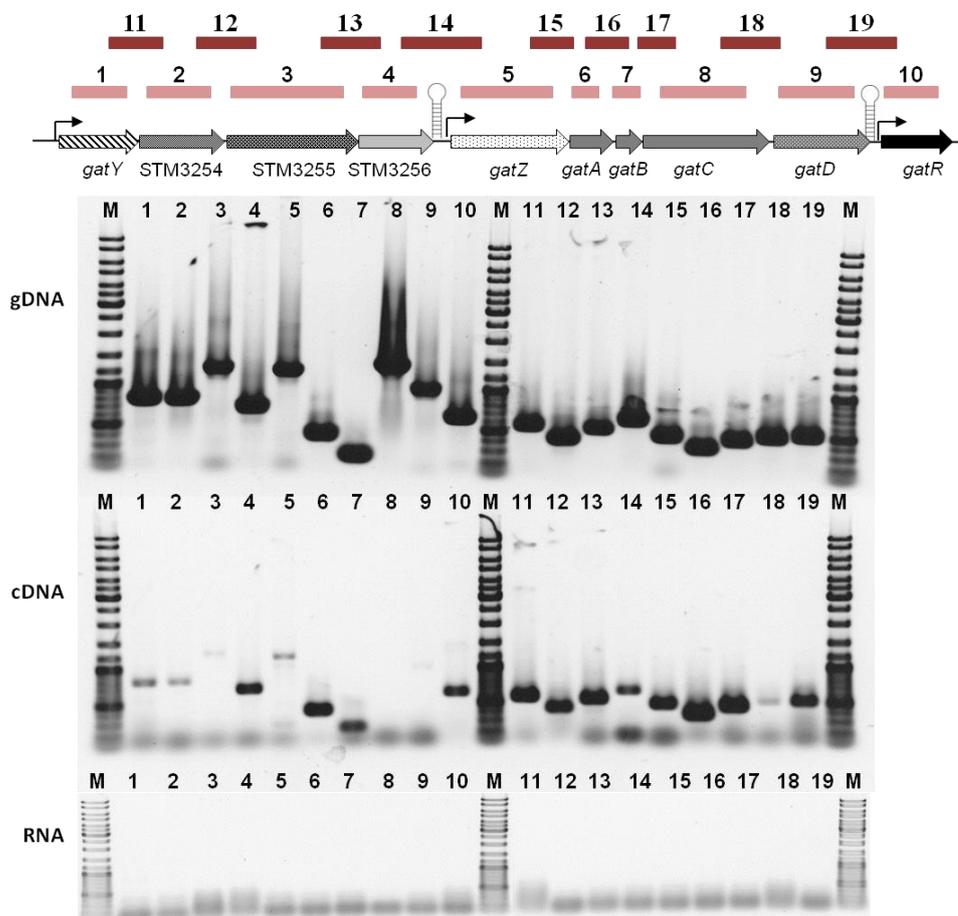


Abb. 3.27: Transkriptionsprofil des genomischen Bereichs *gatY-gatR* in ST4/74. Die Gesamt-RNA wurde aus dem in M9-Medium mit Galaktitol-angezogenem Wildtyp-Stamm ST4/74 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im oberen Abschnitt ist schematisch der genomische Bereich *gatY-gatR* aufgezeigt mit den jeweiligen PCR-Fragmenten (1-19), auf welche die cDNA getestet werden sollte. Als Negativkontrolle wurde die PCR mit DNA-Primern und der RNA als Template durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine genomische DNA mehr in der cDNA-Probe vorhanden ist. Als Positivkontrolle diente genomische DNA (gDNA) des ST4/74 Wildtyp-Stammes. Die Anwesenheit der DNA-Fragmente in der cDNA bedeutet, dass dieser Bereich transkribiert wird: das Gen *gatY* (1), STM3254 (2), STM3255 (3), STM3256 (4), STM3257/*gatZ* (5), *gatA* (6), *gatB* (7), *gatC* (8), *gatD* (9), *gatR* (10), der Bereich zwischen *gatY* und STM3254 (11), zw. STM3254 und STM3255 (12), zw. STM3255 und STM3256 (13), zw. STM3256 und STM3257/*gatZ* (14), zw. STM3257/*gatZ* und *gatA* (15), zw. *gatA* und *gatB* (16), zw. *gatB* und *gatC* (17), zw. *gatC* und *gatD* (18) und zw. *gatD* und *gatR* (19). An beiden Seiten und in der Mitte ist, zur besseren Bewertung der Fragmentgrößen, jeweils der Marker (M) aufgetragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der RT-PCR auf eine polycistronische mRNA hindeuten, die Anwesenheit von drei Promotoren und einem Rho-unabhängigen Terminator stromabwärts des Gens STM3256 jedoch gegen ein einziges Transkript sprechen. Es könnte sich hierbei um einen speziellen Fall handeln, bei dem von einem Operon mehrere, sich überlappende Transkripte gebildet werden, wie es bereits für das *sigB*-Operon gezeigt werden konnte (Donegan and Cheung, 2009). Diese Hypothese wäre mit Hilfe von quantitativer Echtzeit-PCR und Northern Blots überprüfbar.

Um die Regulierung des Genbereichs *gatY-gatR* noch detaillierter zu untersuchen, wurden die Promotorenbereiche zusätzlich nach möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Bei genauerer Betrachtung konnte mittels bioinformatischer Analysen innerhalb der drei Promotorbereiche P_{gatZ} , P_{gatZ} und P_{gatR} jeweils eine putative CRP-Bindungsstelle entdeckt werden. Da es sich bei dem CRP-Protein um ein globales Regulatorprotein handelt, wurde dieses auf eine mögliche Beteiligung bei der Regulierung des Galaktitol-spezifischen PTS untersucht.

3.5.6 Einfluss des CRP-Proteins auf die Regulation des Galaktitol-spezifischen PTS

Zur Klärung, ob das CRP-Protein eine Rolle in der Verstoffwechslung von Galaktitol bei *S. Typhimurium* ST4/74 spielt, wurde zuerst eine *crp*-Deletionsmutante erstellt. Dabei zeigte diese einen vollständigen Wachstumsverlust in M9 mit Galaktitol, welcher durch das Einfügen des Plasmids pBAD-*crp* wieder teilweise aufgehoben werden konnte (Abb. 3.28). Somit scheint das Protein CRP als Aktivator eine wichtige Rolle in bei der Aufnahme und Verstoffwechslung von Galaktitol *S. Typhimurium* ST4/74 zu spielen.

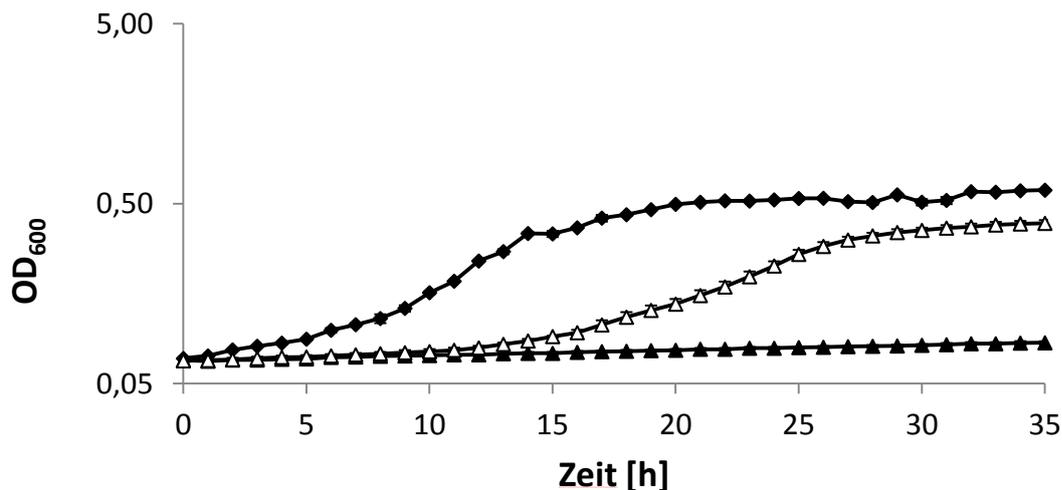


Abb. 3.28: Einfluss von CRP auf das Wachstum von ST4/74 in M9 + Galaktitol. Minimalmedium mit 1 % Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit dem Wildtyp-Stamm ST4/74 (Linie mit Rauten), *ST4/74 Δcrp* (Linie mit schwarzen Dreiecken) und *ST4/74 Δcrp/pBAD-crp* (Linie mit weißen Dreiecken) angeimpft und die OD₆₀₀ stündlich über 35 h gemessen. In allen Fällen wurde kein Antibiotikum hinzugegeben.

Zum Nachweis, dass das CRP-Protein an die Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} bindet, wurden EMSAs durchgeführt. Da innerhalb der Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} eine Bindungsstelle *in silico* identifiziert werden konnte, wurden alle drei Promotorbereiche getestet. Eine Bindung des CRP-Proteins konnte in allen Fällen beobachtet werden, da ein DNA/CRP-Komplexes entstand, was mit einer Positionsverschiebung des jeweiligen DNA-Fragmentes aufgrund der Bindung an CRP einhergeht (Abb. 3.29). Dabei war für alle drei Promotoren bereits ein geringer molarer Überschuss

für die Komplexbildung ausreichend (P_{gatY} : 31, P_{gatZ} : 46 und P_{gatR} : 33). Zusätzlich wurde *in silico* eine putative CRP-Bindungsstelle stromaufwärts des Gens *gatB* detektiert und auf dessen Richtigkeit überprüft. Erwartungsgemäß konnte hier keine Bindung des Proteins CRP an die DNA festgestellt werden, woraus sich schließen lässt, dass das CRP-Protein nur spezifisch innerhalb der drei Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} bindet.

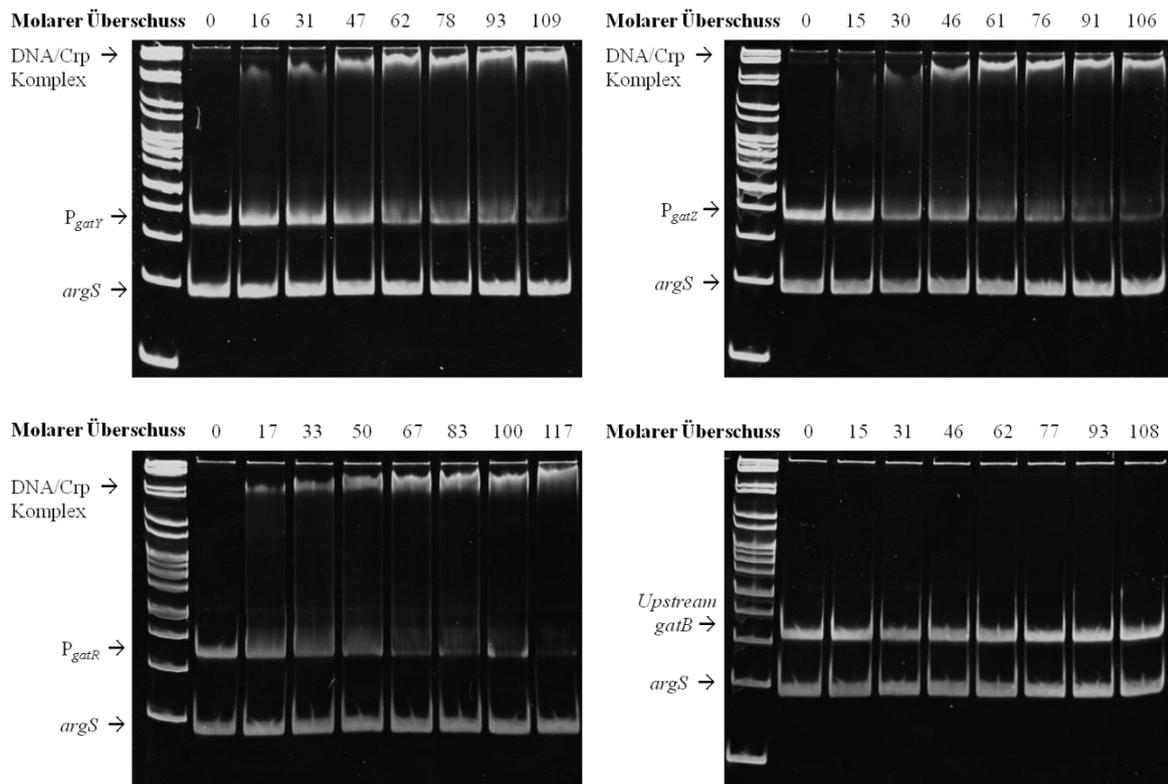


Abb. 3.29: Bindungsfähigkeit des CRP-Proteins an die Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Zu erkennen sind vier EMSAs, bei denen jeweils die Bindungsfähigkeit des CRP-Proteins an vier verschiedene DNA-Fragmente getestet wurde. Aufgetragen ist jeweils der molare Überschuss (Protein zu DNA) und der Marker (links). Als Negativkontrolle diente das DNA-Fragment *argS*, (keine Bindung von CRP). Getestet wurden die DNA-Fragmente P_{gatY} (oben links), P_{gatZ} (oben rechts), P_{gatR} (unten links) und ein DNA-Fragment, welches stromaufwärts des Gens *gatB* liegt (unten rechts). Bei einer Bindung des Proteins CRP an das jeweilige DNA-Fragment bildete sich ein DNA/CRP-Komplex.

Mit Hilfe der bereits bekannten Consensus-Sequenz des CRP-Proteins (5'-TGTGA-N₆-TCACA-3') und dem Durchführen eines virtuellen Footprintings (<http://www.prodoric.de/vfp/>) konnten mögliche CRP-Bindungssequenzen innerhalb der drei Promotorbereiche identifiziert werden (Shimada *et al.*, 2011). Dabei konnte in jedem Promotorbereich jeweils eine Sequenz ausfindig gemacht werden, die stark mit der CRP-Consensus-Sequenz übereinstimmende: P_{gatY} (**TGTG**TGATGATCACA), P_{gatZ} (**TC**GATCAAAATCACA) und P_{gatR} (**CCTG**CGCTGGCTCACA). Die Sequenz innerhalb des P_{gatY} -Promotorbereichs zeigte nur eine Nichtübereinstimmung, die mögliche CRP-Bindungsstelle im P_{gatZ} -Promotorbereichs wich an zwei Positionen von der Consensus-Sequenz ab und in der Sequenz innerhalb des P_{gatR} -Promotorbereichs gab es an drei Positionen eine Diskrepanz zur Consensus-

Sequenz. Die Positionen dieser möglichen CRP-Bindungssequenzen innerhalb der Promotorbereiche sind in Abb. 3.30 aufgezeigt.

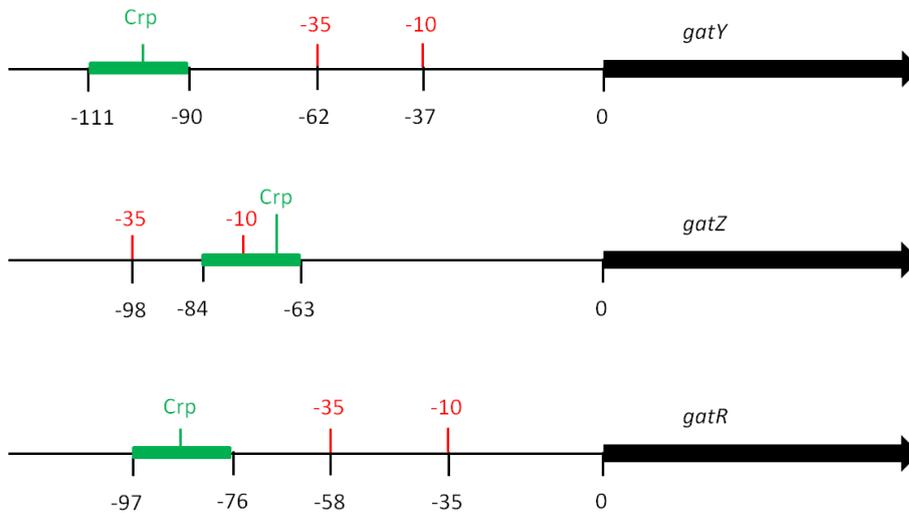


Abb. 3.30: Positionen der CRP-Bindungssequenzen. Aufgetragen sind die drei möglichen CRP-Bindungsstellen (in grün) innerhalb der drei Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Zusätzlich sind jeweils die -35- und -10-Regionen (in rot), die mit Hilfe des Bprom-Programms identifiziert wurden, eingezeichnet. Die erste Base des Startkodons wird als Position 0 definiert, woraus sich die Positionszahlen der stromaufwärts liegenden Regionen ergeben.

Dieser CRP-regulierte Genbereich kodiert unter anderem für das Gen *gatR*, das als ein hypothetischer Repressor annotiert ist (Tab. 3.12). Im Folgenden sollte nun getestet werden, ob dieses Gen ein Genprodukt bildet und inwieweit dieses mögliche Protein in der Lage ist, seinen eigenen Genbereich zu regulieren.

3.6 Charakterisierung des Regulatorproteins GatR

3.6.1 *In silico* Analyse der GatR-Domänen

Das Protein GatR zählt mit seinen 257 Aminosäuren zur DeoR-ähnlichen Familie von transkriptionellen Regulatoren und ist aus zwei Hauptdomänen aufgebaut, der DNA-Bindedomäne (*Helix-turn-Helix* (HTH) Domäne) und der Substratbindedomäne. Die Substratbindedomäne ist in den meisten Fällen auch eine Oligomerisierungsdomäne (Abb. 3.31). Regulatoren der DeoR-Familie (Deoxyribose-Nucleosid-Repressor) sind weit verbreitet in Bakterien und hauptsächlich als Repressoren in Zucker- und Nucleosid-Metabolismen aktiv.



Abb. 3.31: Domänenstruktur des GatR-Proteins. Zu erkennen ist der Domänenaufbau des GatR-Proteins. Dabei befindet sich am N-terminalen Ende eine DNA-Bindedomäne in Form eines *Helix-turn-Helix*-Motivs (HTH). Am C-terminalen Ende findet sich die Substrat- und/oder Oligomerisierungsdomäne (DeoRC).

Mit Hilfe von Promotorfusionen und Überexpression des Regulatorproteins sollte nachgeprüft werden, ob es sich tatsächlich um einen Repressor handelt.

3.6.2 Einfluss von GatR auf die Aktivität der Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}

Um die repressorische Wirkung des GatR-Proteins auf die Promotoren nachzuweisen, wurden in die Stämme ST4/74 $P_{gatY}::lux$, ST4/74 $P_{gatZ}::lux$ und ST4/74 $P_{gatR}::lux$ die Plasmide pBAD, pBAD-*reiD* oder pBAD-*gatR* eingefügt. Nach 5 h in M9-Medium mit Galaktitol wurde Arabinose zur Überexpression des jeweiligen Proteins hinzugegeben. Die beiden Plasmide pBAD und pBAD-*reiD* dienen hierbei als Negativkontrollen. Allgemein war zu beobachten, dass bei Überexpression von GatR die Stämme ein schlechteres Wachstum zeigten als bei Überexpression von *ReiD* oder des Leerplasmids.

Tab. 3.13: : Quantifizierung der Promotoraktivitäten von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in Abhängigkeit von GatR. Die Lumineszenz wurde in der späten exponentiellen Phase bestimmt (Zeitpunkt $t=16$ h). Angegeben ist die relative Lichteinheit pro OD_{600} (RLU/ OD_{600}) und deren Standardabweichung (SD) in Prozent. Die Werte stammen von drei unabhängigen Experimenten. Die Stämme ST4/74 $P_{gatY}::lux/pBAD$, ST4/74 $P_{gatY}::lux/pBAD-gatR$, ST4/74 $P_{gatY}::lux/pBAD-reiD$, ST4/74 $P_{gatZ}::lux/pBAD$, ST4/74 $P_{gatZ}::lux/pBAD-gatR$, ST4/74 $P_{gatZ}::lux/pBAD-reiD$, ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD$, ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD-gatR$ und ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD-reiD$ wurden in M9 mit Galaktitol angezogen. Arabinose wurde zum Zeitpunkt $t = 5$ h dazugegeben, um die Expression der Proteine (GatR bzw. *ReiD*) zu induzieren. Zur Bestimmung des p -Wertes wurden die Stämme mit dem Leervektor als Referenz verwendet. p -Werte kleiner als 0,0005 sind mit drei Sternen (***) markiert.

Genotyp	Plasmid	RLU/ OD_{600}	SD [%]	p -Wert
<i>gatY</i>				
$P_{gatY}::lux$	pBAD	1559.216	11,29	Referenz
$P_{gatY}::lux$	pBAD- <i>gatR</i>	259.972	9,23	0,00012***
$P_{gatY}::lux$	pBAD- <i>reiD</i>	2239.118	0,43	0,41
<i>gatZ</i>				
$P_{gatZ}::lux$	pBAD	449.647	4,04	Referenz
$P_{gatZ}::lux$	pBAD- <i>gatR</i>	4.557	4,95	$9,17 \cdot 10^{-7}$ ***
$P_{gatZ}::lux$	pBAD- <i>reiD</i>	479.851	9,24	0,63
<i>gatR</i>				
$P_{gatR}::lux$	pBAD	402.563	7,26	Referenz
$P_{gatR}::lux$	pBAD- <i>gatR</i>	27.506	7,72	$3,77 \cdot 10^{-6}$ ***
$P_{gatR}::lux$	pBAD- <i>reiD</i>	316.429	1,83	0,032

Bei allen drei Promotoren ist erkennbar, dass GatR für eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität sorgte (Tab. 3.13). Auch hier zeigte der Promotor P_{gatY} die höchste Aktivität, wodurch die Ergebnisse aus Abb. 3.25 und Abb. 3.26 bestätigt wurden. Die Standardabweichungen der einzelnen Messdaten liegen in einem Bereich zwischen 0,4 und 11,3 %. Wurde GatR im Stamm ST4/74 $P_{gatY}::lux$ überexprimiert, so betrug die Aktivität dieses Promotors nach 16 h nur noch ein Sechstel derjenigen des Stammes ST4/74 $P_{gatY}::lux/pBAD$. Die Überexpression des Proteins *ReiD* hatte dagegen keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Ein ähnliches Bild zeigte sich für den Promotor P_{gatZ} . Hier betrug die Promotoraktivität nach GatR-Expression nur noch 1 %, so dass die Repression

des Promotors P_{gatZ} deutlich stärker war als die von P_{gatY} . Auch hier übte die Expression von *ReiD* keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Promotors aus. Wurde *GatR* im Stamm ST4/74 $P_{gatR}::lux$ exprimiert, so zeigte der Promotor nur noch eine Aktivität von 6,83 %. Die Expression von *ReiD* sorgte hier für eine etwas niedrigere Promotoraktivität, die allerdings nicht signifikant war.

Die Ergebnisse konnten mit den Stämmen ST4/74 $P_{gatY}::gfp$, ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ und ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ weiter bestätigt werden (Anhang Abbildung A 13, Abbildung A 14 und Abbildung A 15). Auch hier zeigte sich, dass *GatR* einen hemmenden Einfluss auf alle drei Promotoren ausübte. Zusätzlich wurde hier noch der Kontrollstamm ST4/74 $P_{rpsM}::gfp$ verwendet (Abb. 3.32). Die Expression der Proteine *GatR* bzw. *ReiD* als Kontrolle hatten keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors P_{rpsM} . Wie bereits im Experiment mit den *lux*-Promotorfusionen, war auch hier deutlich zu erkennen, dass eine Expression des *GatR*-Proteins diese Stämme im Vergleich zu den Stämmen ohne *GatR*-Überexpression schlechter in M9-Medium mit Galaktitol wachsen ließen.

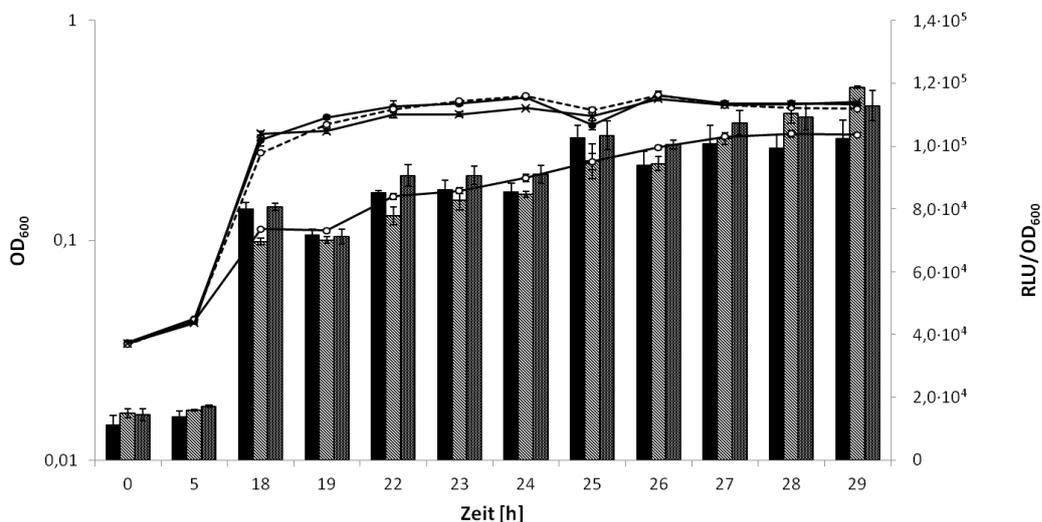


Abb. 3.32: Promotoraktivität von P_{rpsM} in M9-Medium mit Galaktitol (Fluoreszenz) in Abhängigkeit der Proteine *GatR* bzw. *ReiD*. Dargestellt ist die Fluoreszenzaktivität des Promotors $P_{rpsM}::gfp$ in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD_{600} . Abgezogen ist die Grundfluoreszenz des Wildtyp-Stammes ST4/74 (nicht gezeigt). Gemessen wurde die RLU/OD_{600} zu Beginn ($t=0$ h), nach Zugabe von Arabinose ($t=5$ h) und nach 18 h stündlich für die Stämme ST4/74 $P_{rpsM}::gfp/pBAD$ (schwarzer Balken, links), ST4/74 $P_{rpsM}::gfp/pBAD-gatR$ (gestreifter hellgrauer Balken, mittig) und ST4/74 $P_{rpsM}::gfp/pBAD-reiD$ (dunkelgrauer Balken, rechts). Parallel dazu ist die optische Dichte (OD_{600}) von den jeweiligen Stämmen aufgetragen: ST4/74 $P_{rpsM}::gfp/pBAD$ (Linie mit schwarzen Kreisen), ST4/74 $P_{rpsM}::gfp/pBAD-gatR$ (Linie mit weißen Kreisen), ST4/74 $P_{rpsM}::gfp/pBAD-reiD$ (gestrichelte Linie mit weißen Kreisen) und ST4/74 Wildtyp (Linie mit Kreuzen).

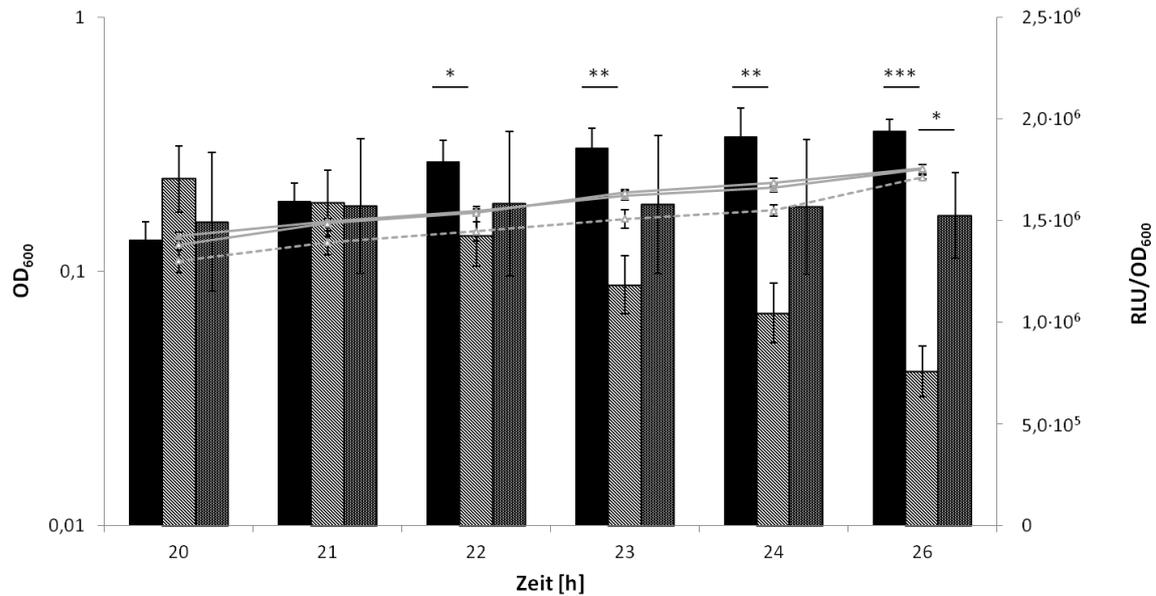


Abb. 3.33: GatR-Einfluss auf die Promotoraktivität von P_{gatR} in der stationären Phase. Die Stämme ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD$ (schwarzer Balken, links), ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD-gatR$ (gestreifter hellgrauer Balken, mittig) und ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD-reiD$ (dunkelgrauer Balken, rechts) wurden in M9-Medium mit 1 % Galaktitol angezogen. Nach 20 h wurde 0,02 % Arabinose hinzugefügt, um die Expression der Proteine GatR und ReiD zu induzieren. Sowohl die OD_{600} der Stämme ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD$ (hellgraue Linie mit schwarzen Dreiecken), ST4/74 $P_{gatR}::lux/pBAD-gatR$ (hellgraue Linie mit weißen Dreiecken) und $P_{gatR}::lux/pBAD-reiD$ (gestrichelte Linie mit weißen Dreiecken) als auch die relative Lichteinheit pro OD_{600} (RLU/ OD_{600}) wurde daraufhin stündlich bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den Lumineszenzaktivitäten der einzelnen Stämme sind wie folgt angegeben: p -Werte $<0,05$ (*), $<0,005$ (**) oder $<0,0005$ (***)

In einem weiteren Versuch wurde der direkte Einfluss der GatR-Überexpression auf die Promotoraktivität von P_{gatR} getestet. Dazu wurden die *gatR*-Reporterkonstrukte vorab in M9 mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle über 20 h angezogen und anschließend die Produktion von GatR bzw. ReiD mit 0,02 % Arabinose induziert. Wie in Abb. 3.33 zu erkennen ist, konnte bereits 2 h nach Arabinose-Zugabe eine signifikante Reduktion der Lumineszenzaktivität bei GatR-Überexpression gemessen werden, was bedeutet, dass der Promotor $P_{gatR}::lux$ von GatR aktiv in seiner Aktivität gehemmt wird. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise, dass GatR auf alle drei Promotoren eine regulatorische Funktion ausübt. Mittels Gelmobilitätsstudien sollte daher eine direkte Bindung des GatR-Proteins an die DNA-Promotorbereiche nachgewiesen werden.

3.6.3 Bindeaffinität des GatR-Proteins zu den Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR}

Als Promotorbereiche wurden die Genbereiche definiert, die jeweils 300 bp stromaufwärts der Gene *gatY*, *gatZ* und *gatR* lagen. Wurden diese Bereiche mit dem GatR-Protein zusammengebracht, so bildeten sich in allen drei Fällen DNA-Protein-Komplexe aus (Abb. 3.34). Das Protein GatR schien hierbei am effektivsten an den Promotor P_{gatZ} zu binden, da hier bereits nach einem molaren Überschuss von 52 kein P_{gatZ} -DNA-Fragment mehr zu erkennen war. Es folgte der Promotorbereich P_{gatR} , den das GatR-Protein bei einem molaren Überschuss von 72 fast vollständig gebunden hatte. Die Bindungsfähigkeit an den Promotor P_{gatY} schien bei diesen EMSAs am ineffektivsten zu sein, da für eine Bindung ein höherer molarer Überschuss von etwa 268 notwendig war. Das Medium, in dem

das Protein GatR überexprimiert und anschließend isoliert wurde (LB-Medium bzw. M9+1% Galaktitol), übte keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit aus. Gezeigt ist dies in Abb. 3.34 für den Promotor P_{gatR} . Gleiches galt für die beiden Promotoren P_{gatY} und P_{gatZ} (Anhang Abbildung A 16). Zusätzlich wurden zur Kontrolle die stromaufwärts liegenden 300 bp-Fragmente von allen weiteren Genen in diesem genomischen Bereich (STM3254-*gatD*) auf eine Bindungsfähigkeit des Proteins GatR getestet, wobei jedoch keine Bindung mehr festgestellt werden konnte (Anhang Abbildung A 17 und Abbildung A 18).

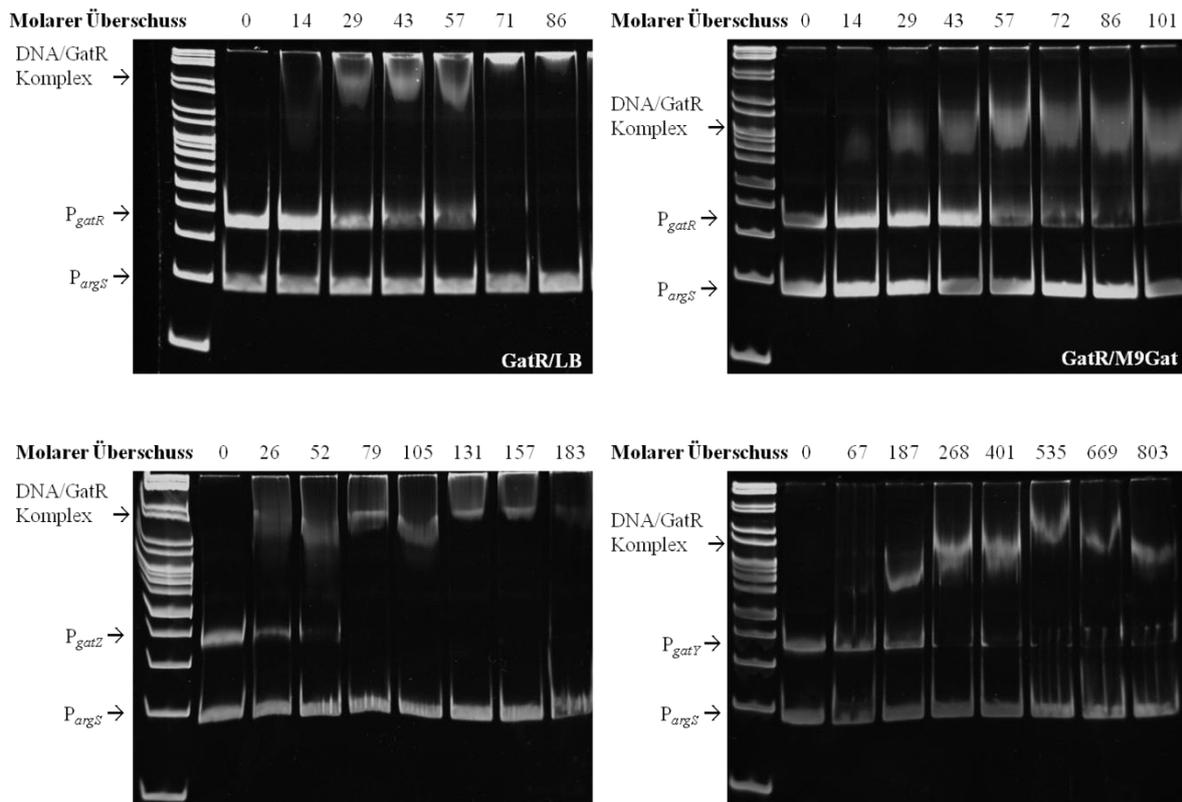


Abb. 3.34: Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an die Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Dargestellt sind vier EMSAs, bei der jeweils die Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an drei verschiedenen DNA-Fragmenten getestet wurde. Aufgetragen sind jeweils der molare Überschuss (Protein zu DNA-Menge) und der Marker (links). Als Negativkontrolle diente das DNA-Fragment *argS*, (keine Bindung von GatR). Getestet wurden die DNA-Fragmente P_{gatR} (oben rechts), P_{gatZ} (unten links) und P_{gatY} (unten rechts). Das Protein wurde dabei in M9 mit Galaktitol überexprimiert. Gezeigt ist ebenso noch die Bindung von aus LB-Medium isoliertem GatR an P_{gatR} (oben links). Bei Bindung des Proteins GatR an das jeweilige DNA-Fragment bildet sich ein DNA/GatR-Komplex.

Nachdem die Bindung des GatR-Proteins an die drei Promotorenbereiche nachgewiesen werden konnte, sollte der Bindebereich des GatR-Proteins weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden die 300 bp-Promotorbereiche jeweils in drei kürzere, sich überlappende Fragmente aufgeteilt und erneut die Bindung von GatR an diese Bereiche überprüft. Dabei konnte die Bindung an die Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} auf 150 bp eingegrenzt werden. In allen Fällen lagen mögliche -35- und -10-Regionen in diesen 150 bp (Details siehe (Fritschle, 2016)). Diese Eingrenzung des Promotorbereichs ermöglichte eine Quantifizierung der Bindungsfähigkeit von GatR an die DNA-Fragmente mittels SPR.

3.6.4 Quantifizierung der Bindung von GatR und CRP an Promotorbereiche mittels SPR-Spektroskopie

Die SPR-Versuche wurden in Kooperation mit Ralf Heermann von der LMU München durchgeführt. Diese Versuche ermöglichten eine Quantifizierung der Assoziations- und Dissoziationskonstante der Proteine CRP und GatR an die Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Dazu wurden die DNA-Fragmente an einen SPR-Sensorchip gebunden und verschiedene Konzentrationen an GatR bzw. CRP (+ 20 μ M cAMP Cofaktor) injiziert und auf den Chip gegeben. Das Sensorgramm zeigte eine hohe Affinität des Proteins GatR zu allen drei Promotoren (Abb. 3.35 A-C). Als Negativkontrolle wurde GatR in Kombination mit dem Promotor des Gens *pcf* aus *P. luminescens* getestet, bei dem keine Bindung festgestellt werden konnte. GatR zeigte die höchste Affinität zu dem Promotor P_{gatZ} ($K_D = 3,2$ nM), gefolgt von dem Promotor P_{gatY} ($K_D = 6,6$ nM) und P_{gatR} ($K_D = 18,8$ nM). Die höchste maximale Antwort (R_{max}) zeigte ebenso P_{gatZ} (R_{max} ca. 1.300 RU), gefolgt von P_{gatR} (R_{max} ca. 700 RU) und P_{gatY} (R_{max} ca. 300 RU). Die maximale Antwort bei einer 1:1-Interaktion (d.h. ein GatR-Proteinmolekül bindet an ein DNA-Fragment) liegt etwa bei 150 RU. Der deutlich höhere R_{max} -Wert des Promotors P_{gatZ} kann daher rühren, dass GatR hier als ein höheres Oligomer bindet oder dass in den 150 bp langen DNA-Fragmenten mehr als eine Bindungsstelle für GatR vorhanden ist. Die Bindung von GatR an den Promotor P_{gatY} zeigte eine langsame An/Aus-Kinetik ($k_a=2,4 \cdot 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$; $k_d=1,6 \cdot 10^{-4}$ s^{-1}), wohingegen die Dissoziationskonstanten der anderen beiden Promotoren annäherungsweise 10fach höher waren (P_{gatZ} : $k_a=3,7 \cdot 10^5$ $M^{-1} s^{-1}$; $k_d=1,2 \cdot 10^{-3}$ s^{-1} ; und P_{gatR} : $k_a=2,1 \cdot 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$; $k_d=3,9 \cdot 10^{-3}$ s^{-1}). Das Substrat Galaktitol übte dabei keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von GatR zu allen drei Promotorbereichen aus (Anhang Abbildung A 19).

Das Protein CRP zeigte eine Bindung an alle drei Promotoren (Abb. 3.35 D-F) mit ähnlich hoher Affinität (P_{gatY} : $R_{max}=36,0$ nM; P_{gatZ} : $R_{max}=37,6$ nM; P_{gatR} : $R_{max}=22,8$ nM). Da für das Protein CRP auch die R_{max} für alle drei Promotoren ähnlich waren, ebenso wie die Assoziations- und Dissoziationskonstanten, lässt sich hierauf einen gleichen molekularen Bindungsmechanismus von CRP an die drei Promotoren schließen.

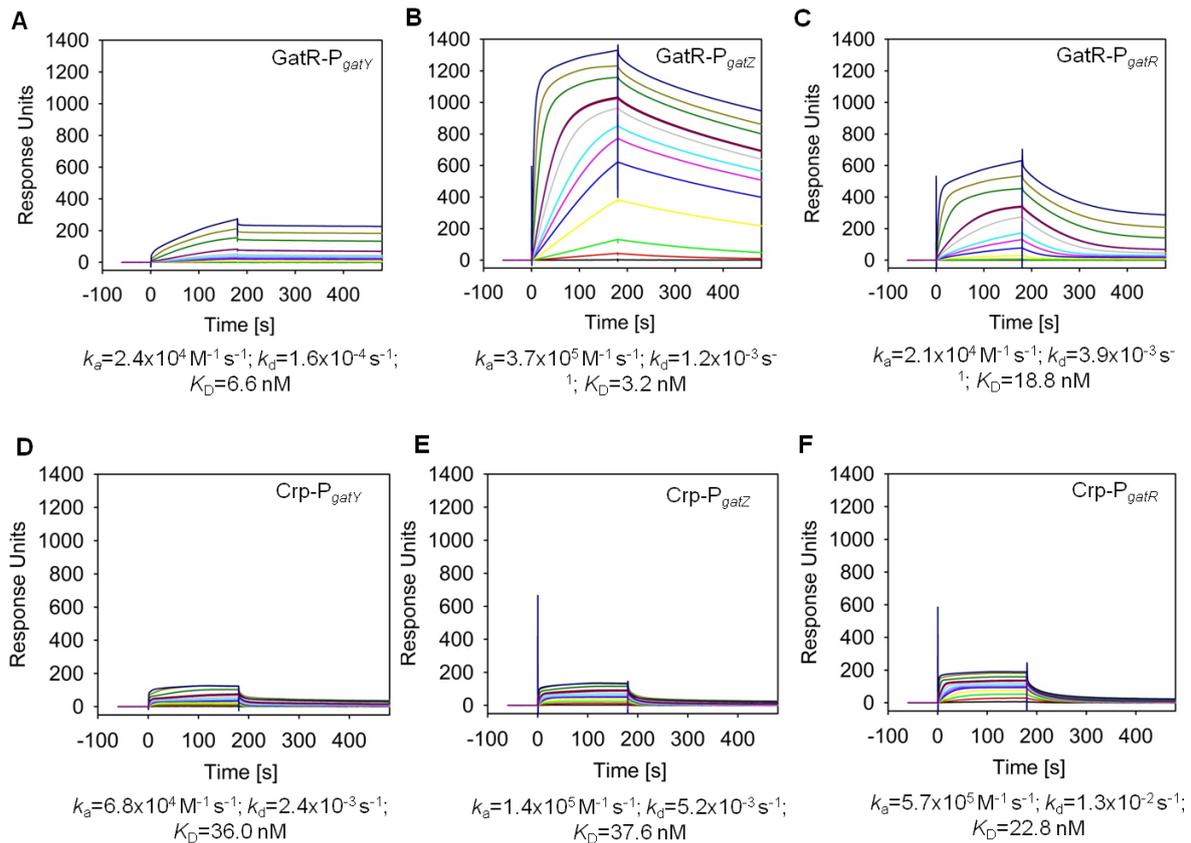


Abb. 3.35: Quantifizierung der DNA-Bindungsfähigkeit von GatR und CRP mittels SPR-Spektroskopie. Die biotinmarkierten DNA-Fragmente P_{gatY} (A, D), P_{gatZ} (B, E) und P_{gatR} (C, F) wurden auf einem Streptavidin-haltigen Sensorchip befestigt. Anschließend wurde aufgereinigtes GatR-Protein (A, B, C) oder CRP-Protein (D, E, F) über den Chip mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ und bei 25 $^\circ\text{C}$ (in folgenden Konzentrationen: 0 nM, 0,5 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 2mal 50 nM, 125 nM, 250 nM und 500 nM für GatR; und 0 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 2mal 100 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM für CRP) geführt. Die Kontaktzeit (Assoziation) betrug dabei 180 s, gefolgt von einer 300 s langen Dissoziationsphase. Unterhalb der Sensorgramme sind die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsraten (k_d), sowie die Affinität (K_D) angegeben unter der Annahme eines 1:1-Bindealgorithmus.

3.6.5 Ausbildung von GatR-Oligomeren

Die SPR-Daten ergaben erste Hinweise hinsichtlich einer möglichen Oligomerisierung des Proteins GatR. Ebenso kann die vorhandene DeoR-Domäne, die als Substratbindungsdomäne charakterisiert ist, in manchen Proteinen als eine Oligomerisierungsdomäne fungieren. Daher sollte überprüft werden, ob GatR Oligomere ausbilden kann, was in Abb. 3.36 bestätigt werden konnte. Das Monomer wanderte dabei auf einer Höhe von ca. 35-37 kDa, weitere Banden waren bei ca. 70 kDa (Dimer), ca. 100 kDa (Trimer) und ca. 140 kDa (Tetramer) zu erkennen. Zusätzlich war eine leichte Bande auf einer Höhe von über 180 kDa erkennbar, was für eine höhere Komplexbildung spricht. Die Zugabe von Formaldehyd, ein Crosslinker, verstärkte die Oligomerisierung. Einen Einfluss von Galaktitol auf die Komplexbildung konnte nicht nachgewiesen werden.

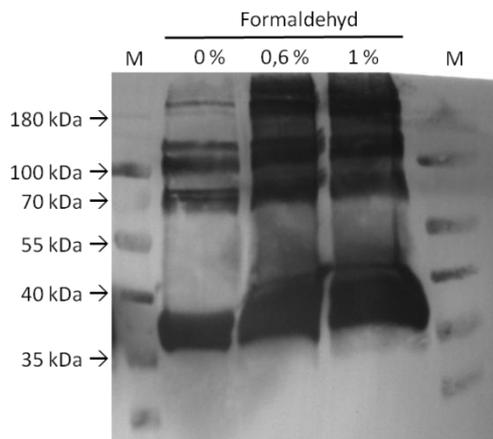


Abb. 3.36: Western Blot mit aufgereinigtem GatR-Protein. Sowohl rechts als auch links ist der Proteinmarker (M) aufgetragen, wobei die Größen der Banden links in kDa angegeben sind. Das Protein GatR wurde in dem Stamm *S. Typhimurium* $\Delta araA$ pBAD-*gatR* überexprimiert und mit Hilfe des Äktapurifizier-Geräts isoliert. Das aufgereinigte Protein wurde in einem Puffer, welcher kein (0 %), 0,6 % oder 1 % Formaldehyd enthielt für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-His₆-Tag-Antikörper aus der Maus.

3.7 SPI3(III)-Insel

Im Genom von *S. Typhimurium* ST4/74 konnte noch ein weiteres Galaktitol-spezifisches PTS (STM3779-STM3785) identifiziert werden, welches im Folgenden charakterisiert werden soll.

3.7.1 SPI3(III)-Region kodiert für ein putatives Zuckeraufnahmesystem

Für die genetische Charakterisierung eines unbekanntes Genbereichs ist der genomische Aufbau die erste Möglichkeit, Hinweise auf mögliche Funktionen der einzelnen Proteine abzuleiten, die in diesem Genbereich kodiert vorliegen. Mit einer Länge von 5,9 kb kodiert der Genbereich STM3779-STM3785 sieben Gene. Seit 2001 wird dieser Genbereich als Bestandteil der Pathogenitätsinsel SPI3 angesehen und als SPI3(III) bezeichnet (McClelland *et al.*, 2001). SPI3(III) wurde bis heute nur unvollständig charakterisiert, wobei die Herleitung der hypothetischen Funktionen der Genprodukte bisher durch Homologie in ihrer Aminosäuresequenz zu anderen Proteinen erfolgte (BLAST-Analyse). Der GC-Gehalt von jedem der sieben Gene ist deutlich niedriger (Tab. 3.14) als der durchschnittliche GC-Gehalt des kompletten Genoms von *S. Typhimurium*, der bei 52,2 % liegt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu anderen Proteinen wurde dieser Genomabschnitt als ein Zuckeraufnahmesystem-kodierender Bereich deklariert. Abb. 3.37 zeigt dazu ein hypothetisches Zusammenspiel dieser Proteine. Das Modell basiert auf dem Glukose-spezifischen Aufnahmesystem und ist entsprechend modifiziert worden. Der Substrattransport über die Membran erfolgt vermutlich über das putative EIIC-Komponentensystem (STM3782), wobei es durch EIIB (STM3783) phosphoryliert wird. Das übertragene Phosphat stammt vom Phosphoenolpyruvat und wird über eine Enzymkette (STM3779 und STM3784) zum EIIB-Protein transportiert. Die putative Kinase (STM3781) und Aldolase (STM3780) spielen vermutlich bei der Verstoffwechslung des Substrates

eine wichtige Rolle. Einen Hinweis, welches Substrat durch dieses putative PTS aufgenommen wird, lieferte die Annotierung des EIIc-Proteins (STM3783) als ein Galaktitol-spezifisches IIC-Protein.

Tab. 3.14: Organisation und Eigenschaften der Gene des SPI3(III)-Lokus aus ST4/74. Der Lokalisierungsbereich bezieht sich auf das Genom von ST4/74 bei NCBI. Die Größe der Nukleotidsequenz ist in Basenpaaren (bp) angegeben, wobei das Stoppcodon nicht mitgezählt wird. Die Größe der putativen Proteine wird in Aminosäuren (AS) angegeben, der GC-Gehalt der DNA in Prozent (%). Die hypothetische Funktion des zu kodierenden Proteins ist von NCBI übernommen worden.

Gen	Lokalisierung	Größe Gen [bp]	Größe Protein [AS]	GC-Gehalt [%]	hypothetische Funktion
STM3779	400865- 4001134	267	89	39,6	hypothetisches Phosphocarrier-Protein eines PTS
STM3780	4001144- 4002004	858	286	43,3	hypothetische Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (Klasse II)
STM3781	4002067- 4003551	1482	494	49,0	hypothetische Zuckerkinase (Pentulose und Hexulose)
STM3782	4003544- 4004902	1356	452	46,8	hypothetisches Galaktitol-spezifische IIC-Komponente eines PTS
STM3783	4004978- 4005265	285	95	38,9	hypothetische IIB-Komponente eines PTS
STM3784	4005262- 4005735	471	157	44,1	hypothetisches PEP-abhängiges Zucker-PTS, EIIa 2
STM3785	4005753- 4006496	741	247	40,9	hypothetischer GntR-Regulator

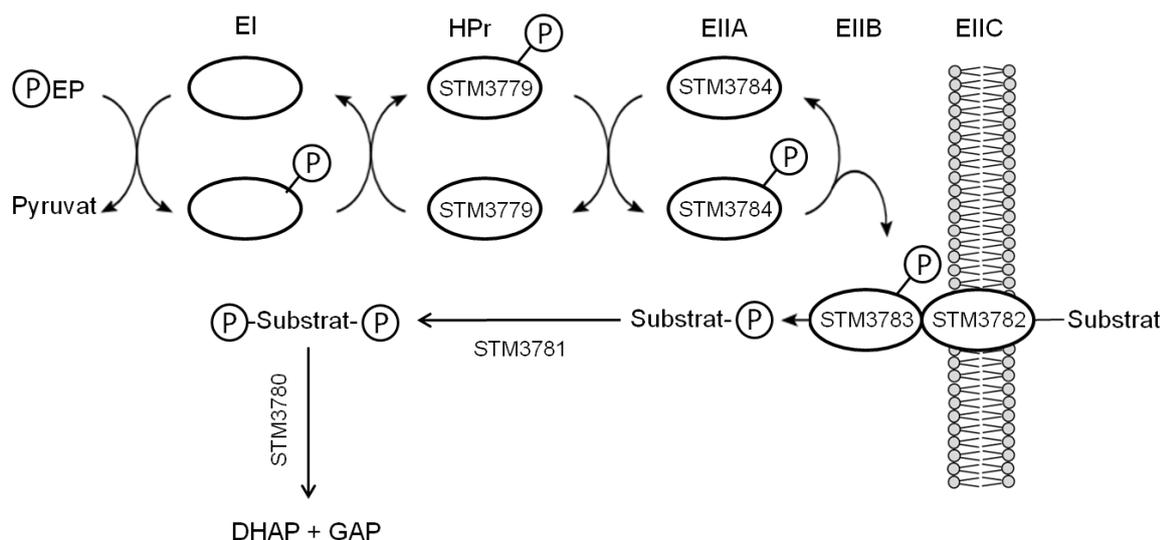


Abb. 3.37: Hypothetisches Modell der Funktion des Genbereichs STM3779-3785. Mit Hilfe der putativen Funktionsannotationen wurde ein Modell, basierend auf dem Glukose-spezifischen Aufnahmesystem, erstellt. Dabei wird das Substrat durch das Protein STM3782 aufgenommen und mittels STM3783 phosphoryliert. Das Phosphat wird vom Phosphoenolpyruvat (PEP) über eine Enzymkette zum Protein STM3783 übertragen. Nach Prozessierung durch die Proteine STM3781 und STM3780 kann das Substrat in den Glykolyse-Stoffwechsel eingespeist werden.

BLAST-Analysen ergaben eine hohe Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz des putativen Proteins STM3782 mit einer Galaktitol-spezifischen EIIC-Komponente. Ein Vergleich des EIIC-Proteins (GatC) aus *E. coli* K12 str. EC3132 mit dem Protein STM3782 ergab, dass beide Proteine zu 37,5 % identisch sind und eine Ähnlichkeit von 66,4 % aufweisen. Zur Verifizierung der Beteiligung des Genbereichs in der Aufnahme und Metabolisierung von Galaktitol wurde der gesamte Genbereich, bzw. die einzelnen Gene STM3782 oder STM3785, nach der Datsenko & Wanner-Methode deletiert. Wie in Abb. 3.38 zu erkennen ist, zeigten alle drei Mutanten keinen Wachstumsnachteil in Minimalmedium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle. Auch auf Festmedium war deutlich zu erkennen, dass die Mutanten trotz Deletion Kolonienbildung aufwiesen. Eine Funktion des SPI3(III)-Genbereichs bei der Galaktitolaufnahme und -verstoffwechslung konnte nicht gezeigt werden.

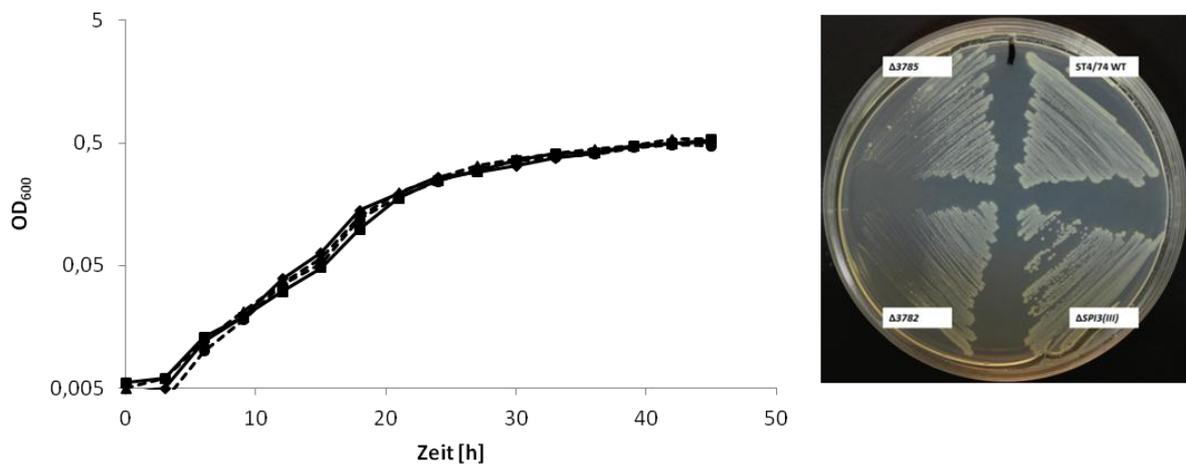


Abb. 3.38: Wachstumsverhalten der Mutanten im M9-Medium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) der einzelnen Stämme ist in Abhängigkeit von der Zeit (in Stunden) aufgetragen. Die Stämme wurden im Verhältnis 1:100 in Minimalmedium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle überimpft und für 45 h bei 37 °C stehend inkubiert. Die OD_{600} wurde alle 3 h gemessen. Gemessen wurden der Wildtyp ST4/74 (schwarze durchgängige Linie mit Rauten), die SPI3(III)-Mutante (schwarze durchgängige Linie mit Vierecken), die STM3782-Mutante (schwarze gestrichelte Linie mit Dreiecken) und die STM3785-Mutante (schwarze gestrichelte Linie mit Kreisen). Zusätzlich wurden die Stämme auf einer Platte mit M9 + Galaktitol ausgestrichen und für 2 Tage bei 37 °C inkubiert (separates Bild-rechts).

3.7.2 Phänotypische Charakterisierung des Wildtyps und der SPI3(III)-Deletionsmutanten

Zur Identifizierung des Substrates, welches durch das PTS aufgenommen wird, wurde ein Substrat-Screening durchgeführt. Dazu wurden Mikrotiterplatten (PM1 und PM2A) der Firma Biolog (Hayward CA, USA) verwendet, die je Kavität ein anderes Substrat, das als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) dienen konnte, beinhaltete. Mit Hilfe dieses Screening-Systems konnten insgesamt 190 verschiedene Substrate im Hinblick auf die C-Quellen-Verwertung getestet werden. Eine Auflistung der Substrate befindet sich im Anhang Tabelle A 9.

Unter aeroben Bedingungen war *S. Typhimurium* ST4/74-Wildtyp in der Lage von den 190 getesteten Substraten 84 metabolisch zu verstoffwechseln (Abb. 3.41), wobei die Farbbildung stark zwischen den einzelnen Substraten variierte. So zeigte der WT-Stamm z.B. in Anwesenheit von Galaktitol (A12) eine starke Atmung, erkennbar durch eine kräftige Violett-Färbung, während die Färbung in Anwesenheit von L-Arabinose (A2) deutlich schwächer ausfiel. Vergleicht man die Verstoffwechslung dieser Substrate durch *S. Typhimurium* ST4/74 mit der Verstoffwechslungsfähigkeit von *S. Typhimurium* LT2 aus der Literatur, so finden sich einige Übereinstimmungen (Abb. 3.39). *S. Typhimurium* LT2 zeigte bei 97 der insgesamt 190 Substrate eine metabolische Aktivität (AbuOun *et al.*, 2009). Von den 84 verstoffwechselbaren Substraten durch *S. Typhimurium* ST4/74 (s. Anhang Tabelle A 10), entsprachen 77 denen bei *S. Typhimurium* LT2. Die restlichen sieben Substrate, bei denen nur *S. Typhimurium* ST4/74 eine Aktivität zeigte, waren D-Raffinose, Succinamic Acid, L-Tartaric-Acid, L-Alaninamide, L-Arginine, Glycine und L-Histidine. Zu den übrigen 20 Substraten, die laut Literatur nur *S. Typhimurium* LT2 als Kohlenstoffquelle nutzen konnte, gehörten unter anderem *myo*-Inositol, D-Xylose, L-Rhamnose und 1,2-Propanediol.

Gesamt: 190 Substrate

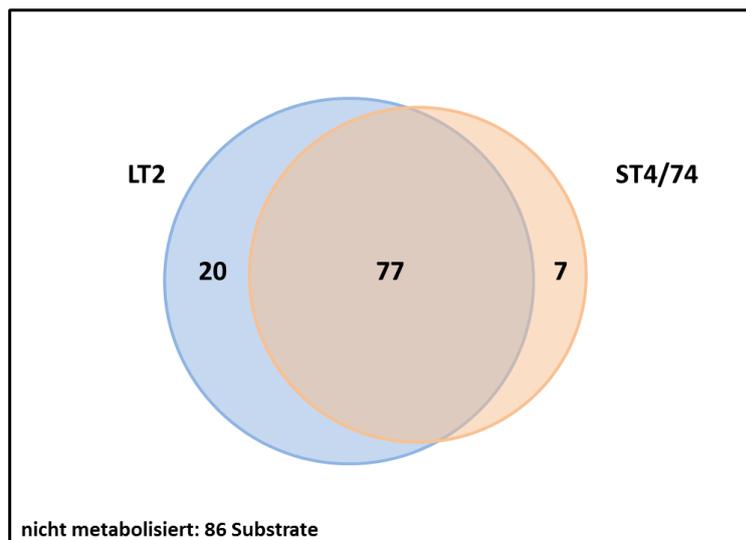


Abb. 3.39: Venn-Diagramm der Verstoffwechslungsfähigkeit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen von *S. Typhimurium* LT2 und ST4/74. Insgesamt konnten 190 verschiedene Kohlenstoffquellen auf ihre Verwertbarkeit von den Stämmen *S. Typhimurium* LT2 und ST4/74 getestet werden. Von den 190 Substraten konnten 86 nicht als C-Quelle von beiden Stämmen genutzt werden. 77 Substrate konnten von beiden verwertet werden. Außerdem konnte *S. Typhimurium* LT2 noch 20 weitere und *S. Typhimurium* ST4/74 noch 7 jeweils unterschiedliche Substrate verwerten.

Zur Identifizierung des unbekanntes Substrates, welches durch das putative PTS aufgenommen und metabolisiert wird, wurden *S. Typhimurium* ST4/74 WT und die SP3(III)-Mutante auf ihre Verstoffwechslung der einzelnen Substrate unter aeroben und anaeroben Bedingungen hin getestet. Unter anaeroben Bedingungen konnte kein Unterschied in der Verstoffwechslung der einzelnen Substanzen festgestellt werden (Abb. 3.40). Auffällig war, dass unter Sauerstoffausschluss deutlich

weniger Substrate verstoffwechselt werden konnten (vgl. Abb. 3.40 und Abb. 3.41). Dazu zählten einige proteinogene Aminosäuren, wie L-Asparaginsäure (PM1-A7), L-Prolin (PM1-A8) oder L-Glutamin (PM1-E1), sowie einige (Di-) Carbonsäuren, wie Bernsteinsäure (*Succinic Acid*; PM1-A5) oder Citronensäure (*Citric Acid*; PM1-F2). L-Rhamnose (PM1-C6) schien nur unter Sauerstoffausschluss von *S. Typhimurium* ST4/74 WT verstoffwechselbar zu sein, da nur unter anaeroben Bedingungen eine deutliche Färbung des Mediums erkennbar war.

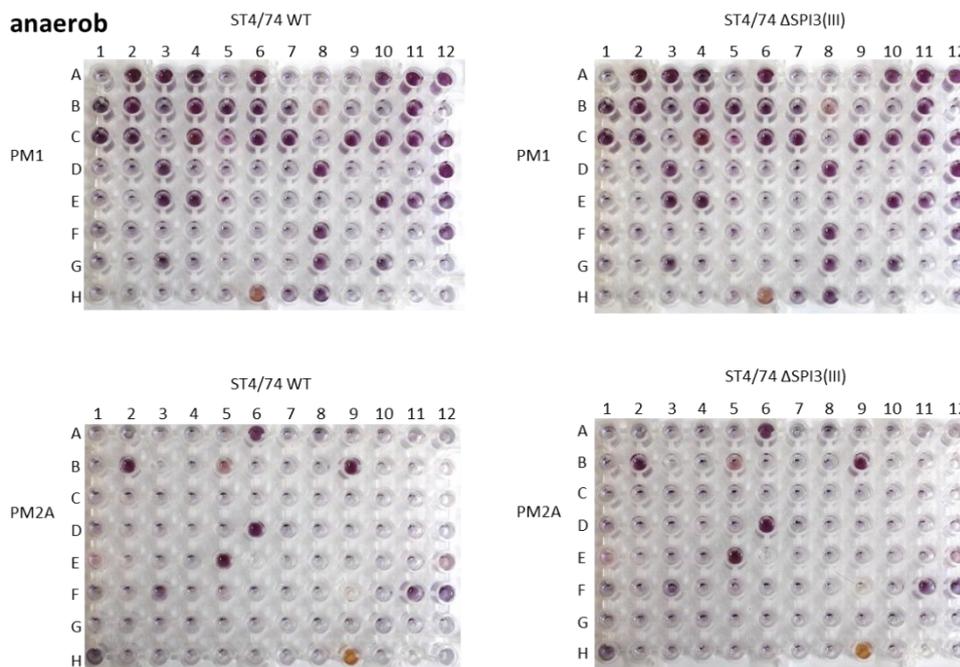


Abb. 3.40: Metabolische Aktivität von Wildtyp und SPI3(III)-Mutante unter anaeroben Bedingungen.

ÜNK des Wildtyps (ST4/74 WT) und der SPI3(III)-Mutante (ST4/74 Δ SPI3(III)) wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle 1:100 überimpft. 200 μ l dieser Suspension wurden in jede Kavität pipettiert und für 24 h bei 37 °C unter Sauerstoffausschluss stehend inkubiert. Jede Kavität der Platte beinhaltet eine andere Kohlenstoffquelle und die Verstoffwechslung dieses Substrates wird durch eine Färbung aufgezeigt.

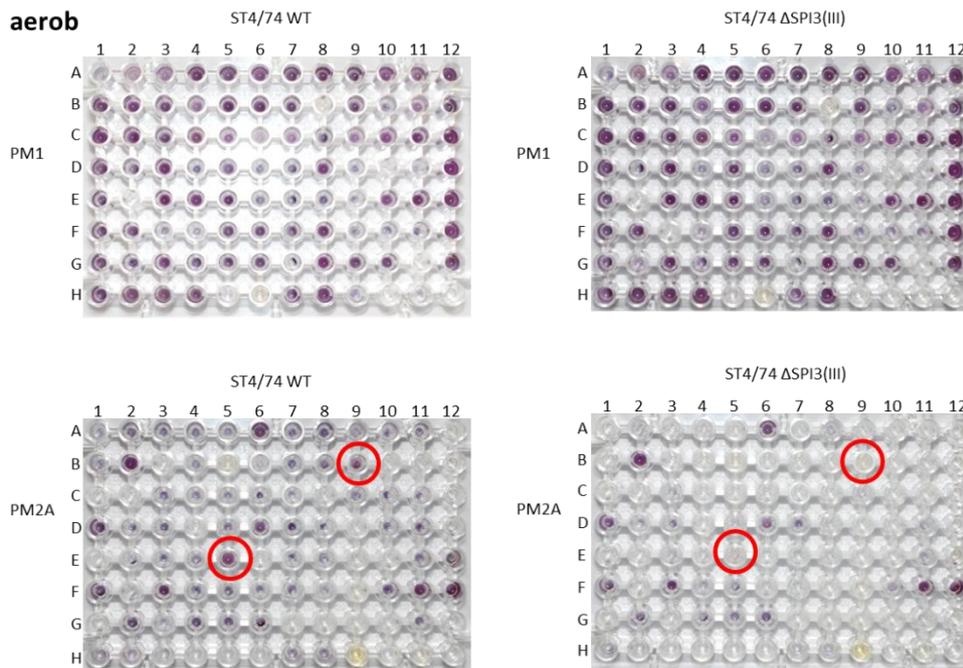


Abb. 3.41: Metabolische Aktivität von Wildtyp und SPI3(III)-Mutante unter aeroben Bedingung.

ÜNK des Wildtyps (ST4/74 WT) und der SPI3(III)-Mutante (ST4/74 Δ SPI3(III)) wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle 1:100 überimpft. 200 μ l dieser Suspension wurden in jede Kavität pipettiert und für 24 h bei 37 °C stehend inkubiert. Jede Kavität der Platte beinhaltet eine andere Kohlenstoffquelle und eine Verstoffwechslung dieses Substrates wird durch eine Färbung aufgezeigt. Rot umkreist sind die Kavitäten, bei der sich ein Unterschied in der Verstoffwechslung eines speziellen Substrates zwischen Wildtyp und Mutante zeigte.

Unter aeroben Bedingungen konnte keine Verstoffwechslung durch die SPI3(III)-Mutante bei der Platte PM2A in den Kavitäten B9 und E5 nachgewiesen werden (Abb. 3.41), wogegen *S. Typhimurium* ST4/74 WT dazu in der Lage war. Es handelte sich dabei um die Substrate Desoxyribose (2-Deoxy-D-Ribose) und D-Glucosamin.

3.7.3 Verstoffwechslungsfähigkeit von Desoxyribose und D-Glucosamin durch die SPI3(III)-Mutante

Unter aeroben Bedingungen zeigte die SPI3(III)-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp bei zwei Substraten in den Biolog-Platten keine Verstoffwechslung. Es handelte sich dabei um die zwei C-Quellen Desoxyribose und D-Glucosamin. Das Wachstum der SPI3(III)-Mutante wurde daraufhin zum einen in M9-Medium mit Desoxyribose und zum anderen in M9-Medium mit D-Glucosamin als einzige Kohlenstoffquelle getestet. Hierfür wurde die OD₆₀₀ des Wildtyp-Stammes und drei unterschiedlicher Mutanten der SPI3(III)-Insel (Δ SPI3(III), Δ 3782 und Δ 3785) in Anwesenheit dieser Kohlenstoffquellen geprüft. Wie in Abb. 3.42 erkennbar ist, wiesen alle drei Mutanten ein Wachstum in Anwesenheit von Desoxyribose als einzige Kohlenstoffquelle auf. Kein Wachstum erfolgte, wenn

keine Kohlenstoffquelle vorhanden war (Negativkontrolle) und klares Wachstum war erkennbar bei der Positivkontrolle (Glukose als Kohlenstoffquelle).

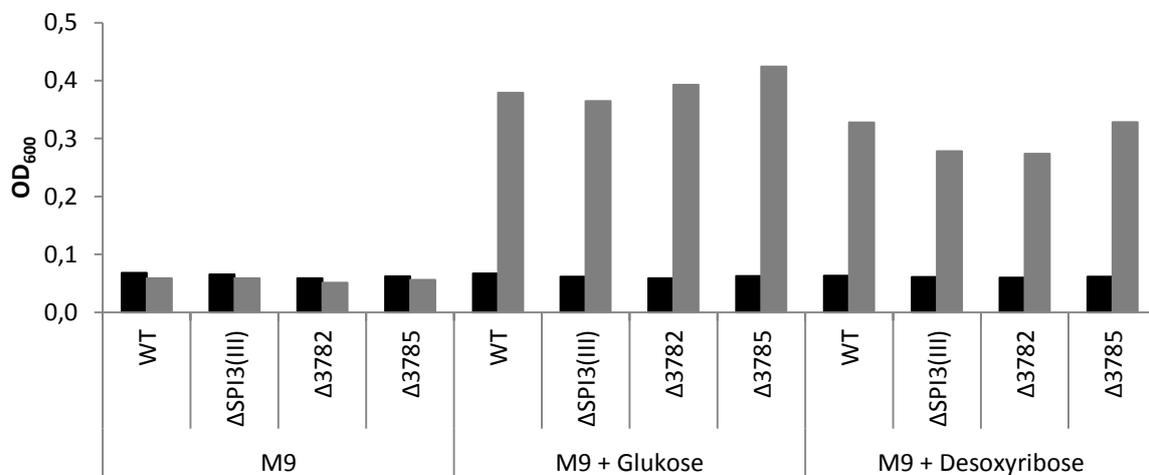


Abb. 3.42: Optische Dichte verschiedener Stämme bei Anwesenheit von Desoxyribose.

Das Wachstum des ST4/74-Wildtyps und von drei SPI3(III)-Mutanten (Δ SPI3(III), Δ 3782 und Δ 3785) wurde in drei verschiedenen Medien getestet: Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle als Negativkontrolle (M9), Minimalmedium mit Glukose als Positivkontrolle (M9 + Glukose) und Minimalmedium mit Desoxyribose (M9 + Desoxyribose). Das Wachstum wurde zu Versuchsbeginn zum Zeitpunkt $t = 0$ (schwarze Balken) und nach $t = 19$ h (graue Balken) gemessen.

Beim zweiten getesteten Substrat, handelte es sich um D-Glucosamin. Auch hier war kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen dem Wildtyp und den SPI3(III)-Mutanten erkennbar (Abb. 3.43). Es konnte somit nicht bestätigt werden, dass der SPI3(III)-Genbereich für die Aufnahme und Metabolisierung von einem dieser zwei Substrate zuständig ist.

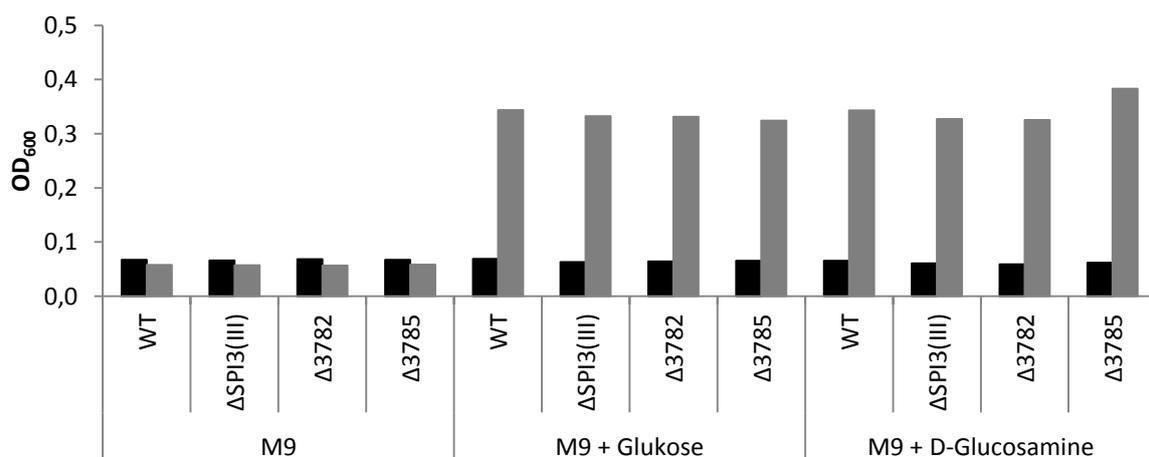


Abb. 3.43: Optische Dichte verschiedener Stämme bei Anwesenheit von D-Glucosamin.

Das Wachstum des ST4/74-Wildtyps und von drei SPI3(III)-Mutanten (Δ SPI3(III), Δ 3782 und Δ 3785) wurde in drei verschiedenen Medien getestet: Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle als Negativkontrolle (M9), Minimalmedium mit Glukose als Positivkontrolle (M9 + Glukose) und Minimalmedium mit D-Glucosamin (M9 + D-Glucosamin). Das Wachstum wurde zu Versuchsbeginn zum Zeitpunkt $t = 0$ (schwarze Balken) und nach $t = 19$ h (graue Balken) gemessen.

3.7.4 Kompetitiver Index

Zur phänotypischen Charakterisierung des Wildtyps und der SPI3(III)-Mutante wurden jeweils separate BIOLOG-Platten verwendet, die keinen direkten Wachstumsvergleich in Konkurrenz ermöglichen. Daher wurde ein kompetitiver Index mit den Substraten der PM1-Platte durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp und SPI3(III)-Mutante im Verhältnis 1:2 vermischt und nach 24 h die relative Fitness, d.h. die Ratio der KbE/ml der Mutante zu KbE/ml des Wildtyps, bestimmt. Blieb das Verhältnis stabil, so lag die relative Fitness bei 1 und bei einem Wachstumsnachteil der Mutante müsste dieser Wert gegen 0 gehen. Von den insgesamt 68 verwertbaren Substanzen der PM1-Platte wurden Propionsäure (F7), Propan-1,2,3-Tricarbonsäure (G2), L-Threonin (G4), L-Alanin (G5) und Polysorbat 20 (C5) nicht aufgeführt, da sie kein Wachstum zeigten. Einen Widerspruch zu den Biolog-Platten stellte dies nicht dar, da die BIOLOG-Platten oft sensitiver reagieren (Nachweis von NADH-Produktion, nicht direktes Wachstum). L-Rhamnose zeigte keine Verfärbung in der Biolog-Platte bei WT und Mutante, allerdings starkes Wachstum bei der OD_{600} -Messung. Wie in Abb. 3.44 zu erkennen ist, zeigte bei keinem der Substrate der Wildtyp einen klaren Wachstumsvorteil und bestätigte damit die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung.

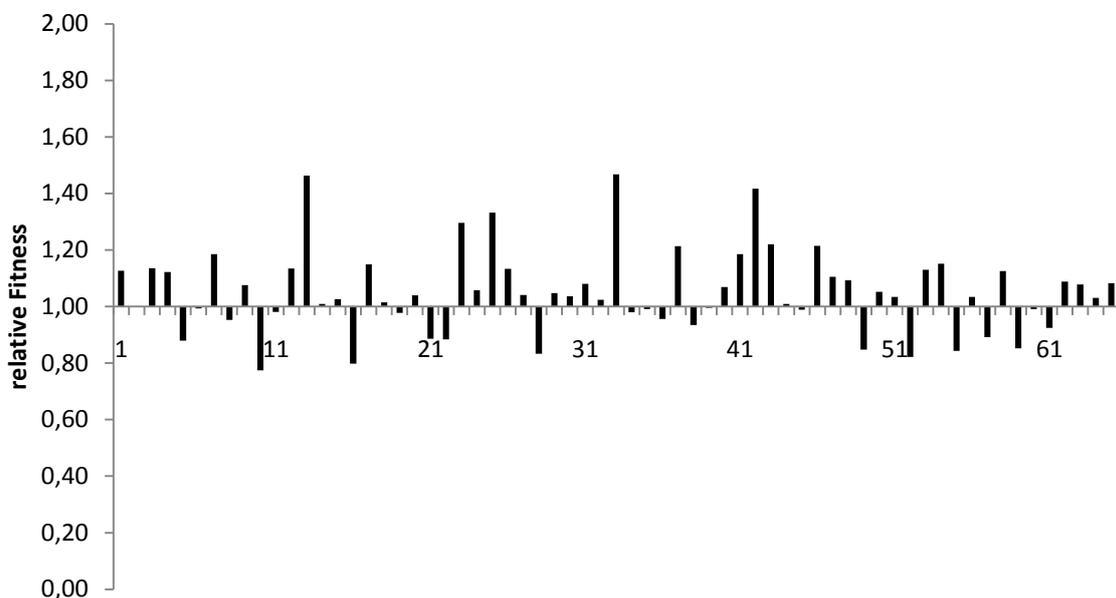


Abb. 3.44: Kompetitiver Index von ST4/74 WT und ΔSPI3(III).

Die relative Fitness gibt das Verhältnis der KbE/ml von ST4/74 WT zu ΔSPI3(III) an. Es sind nur die Substrate aufgezeigt, mit denen ein Wachstum erfolgte. Folgende Substrate wurden getestet: kein Substrat als Negativkontrolle (1), L-Arabinose (2), N-Acetylglucosamin (3), D-Glucarsäure (4), Bernsteinsäure (5), D-Galaktose (6), L-Asparaginsäure (7), L-Prolin (8), D-Alanin (9), D-Trehalose (10), D-Mannose (11), Galaktitol (12), D-Serin (13), D-Sorbitol (14), Glycerin (15), L-Fucose (16), D-Glucuronsäure (17), D-Gluconsäure (18), Glycerin-3-Phosphat (19), L-Milchsäure (20), D-Mannitol (21), L-Glutaminsäure (22), D-Glukose-6-Phosphat (23), D-Galactonsäure-γ-Lacton (24), D,L-Apfelsäure (25), D-Ribose (26), L-Rhamnose (27), D-Fruktose (28), Essigsäure (29), α-D-Glukose (30), Maltose (31), D-Melibiose (32), Thymidin (33), L-Asparagin (34), D-Asparaginsäure (35), D-Glucosaminsäure (36), Polysorbat 40 (37), α-Methyl-D-Galactosid (38), Uridin (39), L-Glutamin (40), D-Glukose-1-Phosphat (41), D-Fruktose-6-Phosphat (42), Polysorbat 80 (43), Maltotriose (44), 2-Deoxyadenosin (45), Adenosin (46),

Glycyl-L-Asparaginsäure (47), Citronensäure (48), Fumarsäure (49), Brom-Bernsteinsäure (50), Schleimsäure (51), Inosin (52), Glycyl-L-Glutaminsäure (53), L-Serin (54), L-Alanyl-Glycin (55), N-Acetylmannosamin (56), Mono-Methyl-Succinat (57), methyl-Pyruvat (58), L-Apfelsäure (59), Glycyl-L-Prolin (60), p-Hydroxy-Phenyl-Essigsäure (61), m-Hydroxy-Phenyl-Essigsäure (62), Tyramin (63), Glucuronamid (64), Brenztraubensäure (65)

3.7.5 Wachstumseigenschaften in verbrauchtem Schweinedarminhalt

Da einige Gene aus dem SPI3(III)-Genbereich im Huhn, Schwein und Kalb eine Rolle in der Kolonisierung zu spielen scheinen (Chaudhuri *et al.*, 2013), wurde das Wachstumsverhalten der SPI3(III)-Mutante im Vergleich zum Wildtyp im Schweinedarminhalt analysiert. Dazu wurde der Schweinedarminhalt mit der SPI3(III)-Mutante 24 h vorbeimpft, um alle von der Mutante verwertbaren Kohlenstoffquellen zu depletieren. Das sterilfiltrierte und verbrauchte Medium (SPENT-Medium) wurde dann als Ausgangsmaterial für die Wachstumsanalysen verwendet. In Abb. 3.45 ist erkennbar, dass der Wildtyp keinen Wachstumsvorteil gegenüber der SPI3(III)-Mutante zeigte. Auch ein direkter kompetitiver Vergleich (Abb. 3.46) konnte keinen Vorteil für den Wildtyp erkennen lassen.

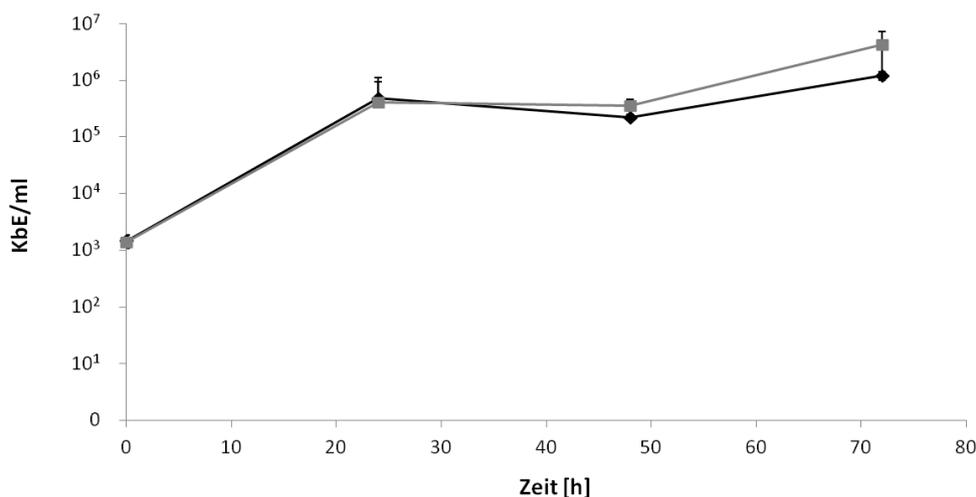


Abb. 3.45: Wachstum der Mutante und des Wildtyps in SPENT-Medium.

Für die Herstellung des SPENT-Mediums wurde Schweinedarminhalt mit dem Δ SPI3(III)-Stamm beimpft und für 24 h bei 37 °C angezogen. Anschließend wurde die Kultur sterilfiltriert und als SPENT-Medium weiter verwendet. Aufgetragen sind die koloniebildenden Einheiten pro ml in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden. Getestet wurden der Wildtyp (schwarze Linie mit Rauten) und die SPI3(III)-Mutante (graue Linie mit Vierecken) in diesem SPENT-Medium.

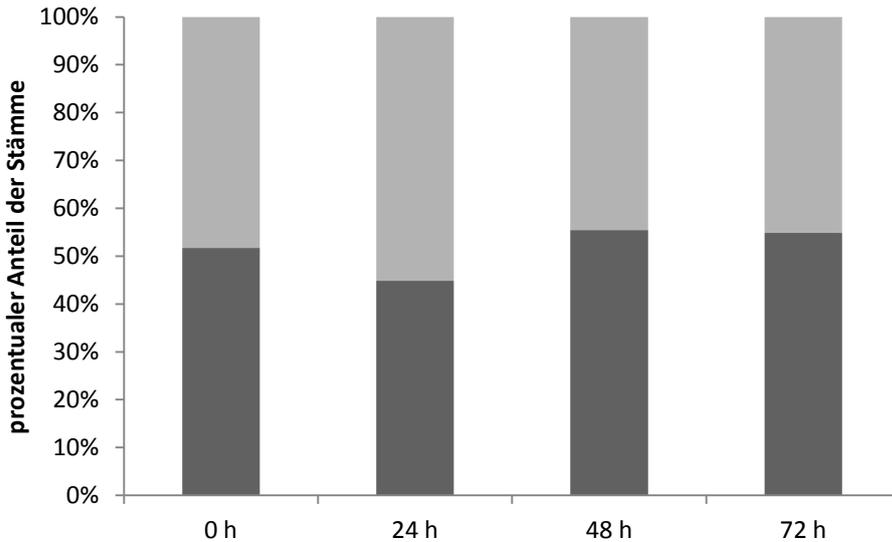


Abb. 3.46: Wachstumsrate unter kompetitiven Bedingungen im SPENT-Medium.

SPENT-Medium wurde mit dem Wildtyp (hellgrauer Balken) und der Δ SPI3(III)::*kanR* -Mutante (dunkelgrauer Balken) im Verhältnis 1:2 angeimpft und bei 37 °C stehend inkubiert. Für die Zeitpunkte $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 72$ h wurden die koloniebildenden Einheiten pro ml (KbE/ml) beider Stämme bestimmt und deren relative Verteilung (%) aufgetragen.

Im Jahr 2013 publizierte Kröger et al. (Kröger *et al.*, 2013) Transkriptomdaten von *S. Typhimurium*, kultiviert bei unterschiedlichen Bedingungen. Daraus war erkennbar, dass durch Zugabe von Gallensalzen die Transkription der Gene STM3783-STM3785 aktiviert wurde. Daher sollte getestet werden, ob der SPI3(III)-Genbereich eine Rolle bei der Gallensalzverwertung einnimmt. Auch hier zeigte sich kein Wachstumsunterschied zwischen dem Wildtyp und der SPI3(III)-Mutante (Abb. 3.47).

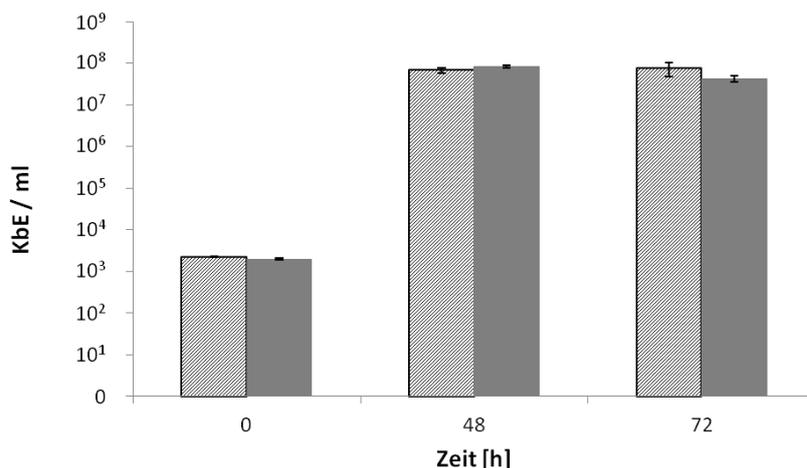


Abb. 3.47: Wachstumsanalyse des Wildtyps und der SPI3(III)-Mutante im mit Gallensalzen versetzten Darminhalt. Der Darminhalt vom Schwein wurde auf eine Verdünnungsstufe von 10^4 verdünnt und mit 3 % Gallensalzen (Natriumcholeate) versetzt. Aufgetragen sind der Wildtyp (schwarze, gestrichelte Balken) und die SPI3(III)-Mutante (graue Balken). Die KbE/ml wurde zu Versuchsbeginn bei 0 h und nach 48 h bzw. 72 h bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dem SPI3(III)-Genbereich keine Funktion *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Bioinformatische Analysen ergaben, dass es sich bei dem Genbereich STM3779-STM3785 um ein putatives PTS handelt. Obwohl 190 verschiedene Substrate unter

aeroben und anaeroben Bedingungen getestet wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit kein Substrat identifiziert werden, welches von diesem PTS aufgenommen und verstoffwechselt wird. Da allerdings bekannt ist, dass der Genbereich STM3779-STM3785 eine Rolle *in vivo* bei der Kolonisierung von Schwein, Rind, Huhn und Maus spielt (Chaudhuri *et al.*, 2013), benötigt dieser möglicherweise zur Ausübung seiner Funktion einen weiteren nur *in vivo* vorkommenden Faktor.

3.8 Schlussfolgerungen: Einfluss des Metabolismus auf die Virulenz von *S. Typhimurium*

Der Gastrointestinal-Trakt des Menschen beherbergt etwa 70 Billionen Mikroorganismen, wobei in diesem Milieu eine ständige Konkurrenz um Nährstoffe herrscht. Die Bakterien sind dabei abhängig von der Ernährung des Wirts, da diese einen großen Einfluss auf die Nährstoffverfügbarkeit im Darm ausübt. Die Fähigkeit, außergewöhnliche Substanzen als Kohlenstoffquellen zu nutzen, kann daher für pathogene Bakterien im Hinblick auf eine erfolgreiche Besiedelung von Vorteil sein.

Im ersten Teil der Arbeit wurde dabei die Diät-abhängige bakterielle Zusammensetzung des Mäusedarms und die Auswirkungen der jeweiligen Diät auf das Transkriptom von *S. Typhimurium* ST4/74 untersucht. In diesem *in vivo*-Versuch erhielten die Mäuse entweder eine pflanzliche oder eine Western-Diät. Dabei war erkennbar, dass die Darm-Mikrobiota von pflanzlich ernährten Mäusen eine höhere Diversität aufwies als die Mikrobiota der Western-Diät-Gruppe. Während das Phylum *Tenericutes* nur bei einer pflanzlichen Ernährung auftrat, zeigten die Phyla *Deferribacteres* und *Proteobacteria* in der Western-Diät-Gruppe eine höhere Präsenz. Nach einer zweiwöchigen Fütterungsphase der beiden Diäten, wurden die Mäuse mit *S. Typhimurium* ST4/74 infiziert und 24 Stunden später die Menge an Salmonellen im Kot bestimmt. Dabei war erkennbar, dass die Diäten keinen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit von *S. Typhimurium* ST4/74 ausübten. Allerdings konnte ein Effekt der Diäten auf das Transkriptom von *S. Typhimurium* ST4/74 beobachtet werden. Insgesamt konnten 66 Gene identifiziert werden, deren Expression abhängig war von der jeweiligen Diät. Auffallend war, dass nach einer Infektion von pflanzlich ernährten Mäusen vor allem metabolisch aktive Gene in *S. Typhimurium* ST4/74 hochreguliert waren. Zu diesen gehörten auch vier Gene, die Teil eines Genbereichs sind, welches für ein Galaktitol-spezifisches PTS kodiert und im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit im Detail charakterisiert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Genbereich verantwortlich für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Galaktitol und D-Tagatose ist. Er unterliegt dabei der Regulation des CRP-Proteins und des GatR-Repressors. Insgesamt konnten drei Promotoren innerhalb dieses Genbereichs identifiziert werden, deren Aktivität in Galaktitol-haltigem Medium nachgewiesen werden konnte. Die Bindungsaffinität des GatR-Proteins zu den drei Promotoren konnte mittels SPR-Spektroskopie quantifiziert werden. Im Genom von *S. Typhimurium* ST4/74 konnte noch ein weiteres Galaktitol-spezifisches PTS detektiert werden (STM3779-3785). Es stellte sich allerdings heraus, dass dieses nicht für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Galaktitol verantwortlich ist. Diesem Genbereich konnte keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden.

4 Diskussion und Ausblick

Magen-Darm-Erkrankungen zählen zu den Hauptursachen von globalen Krankheits- und Todesfällen, wobei *Salmonella spp.* als einer der häufigsten bakteriellen Verursacher gilt (Kosek *et al.*, 2003, Majowicz *et al.*, 2010, Scallan *et al.*, 2005). Bei den Salmonellen handelt es sich um Gram-negative und stäbchenförmige Bakterien, welche das terminale Ileum und das Kolon besiedeln, und weltweit jährlich mehrere zehnte Millionen Krankheitsfälle und mehr als 50.000 Todesfälle verursachen (Sleigh and Duguid, 1989, World Health Organization, 2013).

Für eine erfolgreiche Kolonisierung des Darms müssen pathogene Bakterien residierende Mikroorganismen überwachen. Annäherungsweise 70 Billionen solcher kommensaler Bakterien finden sich im Gastrointestinal-Trakt und bilden die sogenannte Darm-Mikrobiota (Whitman *et al.*, 1998, Clemente *et al.*, 2012). Diese kann in etwa 500-1.000 Bakterienspezies unterteilt werden (Sekirov *et al.*, 2010), wobei im gesunden Menschen die beiden Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* dominieren (Bäckhed *et al.*, 2005, Eckburg *et al.*, 2005). Krankheit, die Einnahme von Antibiotikum oder Ernährungswechsel können zu einer Änderung sowohl in der Zusammensetzung der Mikrobiota als auch in der Konzentration ihrer Stoffwechsel-Endprodukte im Darm führen (Brinkworth *et al.*, 2009, Turnbaugh *et al.*, 2009, De Filippo *et al.*, 2010, Sekirov *et al.*, 2010, Carlisle *et al.*, 2013, Scott *et al.*, 2013). Dies wiederum kann es schädlichen Bakterien ermöglichen, die Kolonisierungsresistenz der Mikrobiota zu überwinden und dadurch erfolgreich den Darm zu besiedeln.

In vorliegender Arbeit wurde im ersten Teil die Bedeutung der Ernährung des Wirts auf die Pathogenität von Salmonellen untersucht. Im zweiten Teil erfolgte die Charakterisierung eines Galaktitol-spezifisches PTS auf molekularer Ebene.

4.1 Zusammenspiel zwischen Ernährung, der Darm-Mikrobiota und *S. Typhimurium*

4.1.1 Einfluss der Ernährung auf die Mikrobiota

Die bakterielle Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota korreliert stark mit der Ernährungsweise des Wirts, was auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. So führte die Konsumierung von Polysaccharid-reichen Nahrungsmitteln zu einer erhöhten Diversität der Mikrobiota, wohingegen eine fett- und zuckerhaltige Ernährung eine Verringerung in der Artenvielfalt zur Folge hatte (Abb. 3.8). Dies steht zusätzlich in Einklang mit bereits vorangegangenen Studien (Yatsunencko *et al.*, 2012, Schnorr *et al.*, 2014, Clemente *et al.*, 2015, Sonnenburg *et al.*, 2016).

Die Mikrobiota-Kompositionen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten C57/BL6-Mäuse wiesen ebenso hohe Übereinstimmungen mit den Ergebnissen von De Filippo auf (De Filippo *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde die Mikrobiota von europäischen und afrikanischen Kindern miteinander

verglichen. Die Ernährungsweise von europäischen Kindern (EU) entsprach hierbei einer sogenannten Western-Diät, bestehend aus viel Zucker, Fett, Proteine tierischen Ursprungs und wenigen Ballaststoffen. Kinder aus einem Dorf im afrikanischen Burkina Faso (BF) ernährten sich überwiegend vegetarisch mit reichlich Stärke, Ballaststoffen und Pflanzenpolysacchariden. Die bereits erwähnte höhere Diversität innerhalb der pflanzlich ernährten Gruppe (Abb. 3.8) konnte auch in den pflanzlich ernährten Individuen in der De Filippo-Studie nachgewiesen werden (De Filippo *et al.*, 2010). Ebenso entsprach der prozentuale Anteil der vier prävalenten Phyla innerhalb der Mäuse-Mikrobiota mit kleinen Abweichungen der Mikrobiota-Zusammensetzung der BF-Kinder, bei denen das Phylum *Bacteroidetes* mit einem prozentualen Anteil von 57,7 % dominierte (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Prozentualer Anteil der vier dominierende Phyla in der Mikrobiota. Angegeben ist der prozentuale Anteil der vier dominierenden Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* in der Mikrobiota von Burkina-Faso-Kindern (BF), europäischen Kindern (EU), pflanzlich ernährten C57/BL6-Mäusen (pD) und C57/BL6-Mäuse, die eine Western-Diät erhielten (WD). (De Filippo *et al.*, 2010)

	BF [%]	EU [%]	pD [%]	WD [%]
<i>Actinobacteria</i>	10,1	6,7	2,34	1,22
<i>Bacteroidetes</i>	57,7	22,4	60,41	64,52
<i>Firmicutes</i>	27,3	63,7	31,62	28,82
<i>Proteobacteria</i>	0,8	6,7	2,58	5,71

Auffallend war, dass die Western-Diät-Gruppe der C57/BL6-Mäuse in ihrer Mikrobiota-Zusammensetzung eher der BF-Gruppe ähnelte und im Vergleich zur EU-Gruppe einen deutlich geringeren prozentualen *Firmicutes*-Anteil aufwies (Tab. 4.1). Diese erhöhte *Firmicutes*-Präsenz innerhalb der Mikrobiota bei Fütterung einer Western- oder fettreichen Diät (*high fat diet*; HF-Diät) konnte auch in anderen Mäuse-Studien nachgewiesen werden (Daniel *et al.*, 2014, Agus *et al.*, 2016). Einen Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen stellt dies aber nicht dar, da in diesen Studien die konsumierten Western-Diäten einen höheren Energiegehalt als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Western-Diät innehatten und sich eine gesteigerte Energieeinnahme stark auf den *Firmicutes*-Anteil in der Mikrobiota auswirkt (Jumpertz *et al.*, 2011). Ebenso wurde in beiden Studien den Mäusen die jeweilige Diät über einen Zeitraum von 12 bzw. 18 Wochen anstatt des in der vorliegenden Arbeit gewählten Zeitraums von zwei Wochen verabreicht. Daher ist es möglich, dass die Gesamtenergiemenge und Fütterungsdauer der Western-Diät-Gruppe zu gering bzw. zu kurz war, um einen Anstieg des *Firmicutes*-Anteils hervorzurufen. Die fehlende Gewichtszunahme, die unter anderem in der HF-Diät-Gruppe bei Daniel *et al.* beobachtet werden konnte (Daniel *et al.*, 2014), verstärkt die Vermutung einer zu geringen Energieeinnahme und Fütterungsdauer.

Bei genauerer Analyse der Mikrobiota-Zusammensetzungen zeigte sich, dass die nur in der Mikrobiota von BF-Kindern vorkommende Gattung *Prevotella* ebenfalls ausschließlich in den pflanzlich ernährten C57/BL6-Mäusen detektiert werden konnte (De Filippo *et al.*, 2010). Diese zum Phylum *Bacteroidetes* zugehörige Gattung ist in der Lage, diverse pflanzliche Zellwand-Polysaccharide, z.B. Xylane, zu kurzkettigen Fettsäuren abzubauen (Flint *et al.*, 2008, Flint *et al.*, 2012). Solche Stoffwechsel-Endprodukte können unter anderem Entzündungsreaktionen im Darm verhindern (Topping and Clifton, 2001). Zusätzlich kam die dem Phylum *Firmicutes* zugeordnete Familie *Lachnospiraceae* in pflanzlich ernährten Mäusen signifikant häufiger vor. Bakterien dieser Familie, wie z.B. *Roseburia spp.* und *Eubacterium rectale*, besitzen die Fähigkeit, Stärke zu kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat zu verstoffwechseln (Aminov *et al.*, 2006). Beide Butyrat-produzierenden Bakterien treten unter anderem verstärkt in der Darm-Mikrobiota von Menschen auf, die eine Diät mit einem hohen Stärke-Anteil zu sich nehmen (Duncan *et al.*, 2007). Eine weitere Gattung dieser Familie, nämlich *Butyrivibrio*, ist ebenfalls ausschließlich nur in der Mikrobiota von BF-Kindern zu finden (De Filippo *et al.*, 2010). Die Gattung *Clostridium XIVa* (Familie *Lachnospiraceae*) trat nur in pflanzlich ernährten C57/BL6-Mäusen auf, ist mit der Entwicklung von anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen assoziiert und fördert damit die adaptive Immunabwehr (Atarashi *et al.*, 2013, Van den Abbeele *et al.*, 2013).

In der Mikrobiota der Western-Diät-Gruppe zeigten innerhalb des Phylums *Bacteroidetes* die Gattungen *Alistipes* (Familie *Rikenellaceae*) und *Parabacteroides* (Familie *Porphyromonadaceae*) eine signifikant höhere Präsenz im Vergleich zur Mikrobiota der pflanzlich ernährten Gruppe. Da beide Gattungen auch in der Mikrobiota von an Typ-2-Diabetes erkrankten Menschen verstärkt auftreten, lässt dies die Vermutung zu, dass eine westlich-geprägte Ernährung spezielle Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes hervorrufen kann (Qin *et al.*, 2012). Ein Anstieg im Vorkommen der Gattung *Alistipes* konnte auch nach Fütterung von HF-Diäten beobachtet werden (Daniel *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2012). Innerhalb des Phylums *Proteobacteria*, die keine komplexen Polysaccharide verwerten können (Kamada *et al.*, 2013) und in der pflanzlichen-Diät-Gruppe signifikant geringer vorhanden waren, zeigte die Familie *Desulfovibrionaceae* ein verstärktes Auftreten bei Fütterung einer Western-Diät. Dies konnte ebenso in Mäusen, denen eine HF-Diät zugeführt wurde, gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2012). Wie auch die Gattungen *Alistipes* und *Parabacteroides* des Phylums *Bacteroidetes* ist die Gattung *Desulfovibrionaceae* mit Typ-2-Diabetes-Patienten assoziiert (Qin *et al.*, 2012). Die Familie *Ruminococcaceae* (Phylum *Bacteroidetes*), die bekannt ist für die Fähigkeit Stärke zu spalten und abzubauen, zeigte ebenfalls eine höhere Abundanz in der Western-Diät-Gruppe der C57/BL6-Mäuse. Auch in einer Studie, bei der Mäuse mit einer Diät mit erhöhtem Fett- und geringem Kohlenhydratanteil gefüttert wurden, konnte diese Familie verstärkt in der Mikrobiota nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2012). Dagegen zeigte diese Familie

in einer anderen Studie eine geringere Präsenz in der Mikrobiota von HF-Diät-gefütterten Mäusen (Daniel *et al.*, 2014). Eine weitere, in der Western-Diät-Gruppe stärker vorkommende Gattung ist *Mucispirillum*, die dem Phylum *Deferribacteres* zugeordnet wird. Mucispirillen sind in der Lage, die Affinität der mukosalen Oberfläche zu beeinflussen und die Mucusschicht zu kolonisieren (Robertson *et al.*, 2005). Diese Gattung ist ebenfalls in HF-Diät-gefütterten Mäusen stärker vertreten (Ravussin *et al.*, 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der vorliegenden Arbeit analysierten Diät-abhängigen Mikrobiome der C57/BL6-Mäuse den bereits in anderen Studien beobachteten Diversitätsverlust innerhalb der Mikrobiota durch Fütterung einer Western-Diät bestätigten (De Filippo *et al.*, 2010, Sonnenburg *et al.*, 2016, Turnbaugh *et al.*, 2008). Pflanzlich ernährte Mäuse wurden häufiger von Bakterien kolonisiert, die in der Lage sind, komplexe Polysaccharide zu verstoffwechseln und einen Schutz gegenüber Entzündungsreaktionen bieten. Detektierte Bakterien in der Western-Diät-Gruppe waren mit westlichen Krankheiten, wie z.B. Typ-2-Diabetes, assoziiert (Qin *et al.*, 2012). Der *Firmicutes*-Anteil innerhalb der Western-Diät-Gruppe war geringer als in bereits veröffentlichten Mausstudien (Daniel *et al.*, 2014, Agus *et al.*, 2016) und verdeutlicht die Problematik, die bei der Interpretation von Mikrobiota-Analysen herrscht. Eine vergleichende Analyse von Mikrobiom-Daten ist aufgrund vieler verschiedener Variablen, die einen Einfluss auf die Mikrobiota-Zusammensetzung haben, wie z.B. den Ort der Tierhaltung (Rausch *et al.*, 2016), die Zusammensetzung der Diät oder die Fütterungsdauer oft erschwert.

4.1.2 Diversitätsverlust der Mikrobiota als Folge einer Streptomycin-Behandlung

Bohnhoff und Miller konnten bereits im Jahr 1962 in einem Mausmodell zeigen, dass eine vorherige Streptomycin-Behandlung die Kolonisierungsfähigkeit von Salmonellen fördert (Bohnhoff and Miller, 1962), was später von Que und Hentges bestätigt wurde (Que and Hentges, 1985). Diese Streptomycin-verursachte Salmonellen-Anfälligkeit der Mäuse ermöglichte die Entwicklung eines künstlich induzierten Salmonellen-Gastroenteritis-Modells (Barthel *et al.*, 2003). Dabei werden die Mäuse 24 h vor der *S. Typhimurium*-Infektion mit einer einmaligen Dosis von 20 mg Streptomycin behandelt, um dadurch eine Gastroenteritis hervorzurufen und eine sofortige systemische Infektion zu vermeiden. Dieses Modell stellt eine gute Alternative zum Rindermodell dar, da zahlreiche Inzucht-, Knockout- und transgene Mäusestämme heutzutage verfügbar sind und die Möglichkeit besteht, das angeborene und adaptierte Immunsystem zu untersuchen (Hapfelmeier and Hardt, 2005). Das Salmonellen-Gastroenteritis-Mausmodell wurde in verschiedenen Studien erfolgreich getestet (Stecher *et al.*, 2005, Endt *et al.*, 2010, Stecher *et al.*, 2008, Loetscher *et al.*, 2012) und lässt sich auch für andere Serovar-Typen, z.B. *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* und *S. Pullorum*, verwenden (Suar *et al.*, 2006). Die erhöhte Anfälligkeit der Mäuse gegenüber Salmonellen nach einer

Streptomycin-Behandlung basiert auf der Tatsache, dass die Mikrobiota durch das Antibiotikum in ihrer Zusammensetzung verändert und um mehr als 90 % in ihrer Dichte reduziert wird, wodurch die Kolonisierungsresistenz nicht mehr vorhanden ist (Stecher *et al.*, 2007, Endt *et al.*, 2010). Nach ca. fünf Tagen hat sich die Mikrobiota wieder in ihrer Dichte und Zusammensetzung normalisiert (Antunes *et al.*, 2011c). Zusätzlich können gewisse Bakterien als Indikatoren für die Kolonisierungsresistenz dienen, wie z.B. die Anwesenheit von γ -*Proteobacteria* bei Salmonellen-Infektionen (Stecher *et al.*, 2010). Da Menschen bezüglich ihrer Mikrobiota-Zusammensetzung in unterschiedliche Enterotypen aufgeteilt werden können, nämlich in den *Bacteroides*-, *Prevotella*- oder *Ruminococcus*-Enterotyp (Arumugam *et al.*, 2011), wirft dies die Frage auf, ob diese Enterotypen eventuell auch eine unterschiedliche Anfälligkeit gegenüber *Salmonella*-Infektionen besitzen (Kaiser *et al.*, 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Mikrobiomanalyse bestätigte, dass eine Streptomycin-Behandlung zu einer veränderten Mikrobiota-Zusammensetzung mit signifikant verringerter Diversität führt. Eine reduzierte Diversität durch Streptomycin-Behandlung konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt worden (Langdon *et al.*, 2016, Lichtman *et al.*, 2016). Ebenso sank die OTU-Anzahl signifikant nach Streptomycin-Behandlung ab. Betroffen waren vor allem OTUs, die den Ordnungen *Bacteroidales*, *Clostridiales* und *Desulfovibrionales* zugeordnet werden konnten. Diese Ordnungen zeigten auch in Hühnern nach einer Streptomycin-Behandlung ein signifikant verringertes Vorkommen (Videnska *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte für die beiden Ordnungen *Bacteroidales* und *Clostridiales* die Sensitivität gegenüber Streptomycin bereits in der Maus nachgewiesen werden (Lichtman *et al.*, 2016). Dagegen stieg die Anzahl an Bakterien der Gattung *Olsenella* (Phylum *Actinobacteria*) sowohl in der Western-Diät- als auch der pflanzlich ernährten Gruppe signifikant an. Dies lässt sich durch die Resistenz der *Actinobacteria* gegenüber Aminoglykosiden, wie z.B. Streptomycin, erklären (Ferrer *et al.*, 2016). Die Ordnung *Enterobacteriales* wies sowohl in der Maus als auch im Huhn nach Streptomycin-Behandlung einen Anstieg auf (Videnska *et al.*, 2013). In einer Studie von Stecher *et al.* wurde die Zusammensetzung der Mikrobiota ebenfalls nach Streptomycin-Behandlung analysiert (Stecher *et al.*, 2007). Die ursprüngliche Mikrobiota-Zusammensetzung dieser Mäuse entsprach dabei in etwa der Zusammensetzung der Mikrobiota von den pflanzlich ernährten Mäusen. In der Studie führte eine Streptomycin-Behandlung zu starken, mausspezifischen Unterschieden, die sich in den hohen Standardabweichungen bemerkbar machte (Stecher *et al.*, 2007). Diese individuellen Reaktionen der Mäuse auf die Antibiotika-Behandlung konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden und erschwerte eine Auswertung der Mikrobiom-Daten zu diesem Zeitpunkt. Daher konnten beim Vergleich der Mikrobiota-Zusammensetzung zwischen den beiden Diät-Gruppen nach der Streptomycin-Behandlung auch nur wenige signifikante Unterschiede beobachtet werden. So zeigte die Gattung

Bacteroides keine Veränderung in ihrer Abundanz bei Fütterung einer pflanzlichen Diät. In der Western-Diät-Gruppe hingegen war das Vorkommen dieser Gattung nach einer Streptomycin-Behandlung im Vergleich zur pflanzlich ernährten Gruppe signifikant geringer. Bakterien der Gattung *Bacteroides*, wie z.B. *B. thetaiotaomicron*, besitzen ein großes Repertoire an Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen, die essentiell sind für den Abbau komplexer Polysaccharide (Xu *et al.*, 2003, Flint *et al.*, 2008). Eine verringerte Abundanz in der Western-Diät-Gruppe ist aufgrund der fehlenden Polysaccharide zu erwarten gewesen. Die *Deferribacteres*, die in der Mikrobiota von mit Streptomycin-behandelten Mäusen stärker vertreten waren (Stecher *et al.*, 2007), zeigten nur in der Western-Diät-Gruppe eine stärkere Präsenz. Insgesamt konnte bestätigt werden, dass eine Streptomycin-Behandlung zu einem Diversitätsverlust der Mikrobiota führt und deren Zusammensetzung signifikant verändert. Insgesamt wirkte sich das Antibiotikum positiv auf das Wachstum der beiden Phyla *Actinobacteria* und *Deferribacteres* aus.

4.1.3 Interpendenz zwischen der Darm-Mikrobiota und *S. Typhimurium*

Nach erfolgter Streptomycin-Behandlung konnten die C57/BL6-Mäuse erfolgreich mit Salmonellen infiziert werden. Da das Salmonellen-Transkriptom durch erste Entzündungsreaktionen, die selbst bei einer SPI-1-Mutante schon 48 h nach Infektion auftreten (Hapfelmeier *et al.*, 2005), beeinflusst wird, wurden die Mäuse bereits 24 h nach Infektion getötet. Dadurch wurde gewährleistet, dass es sich um ein Diät-abhängiges Transkriptom handelte. Allerdings hatte der verkürzte Kolonisierungszeitraum zur Folge, dass zwischen beiden Diät-Gruppen 24 h nach der Infektion kein signifikanter Unterschied in der Salmonellen-Anzahl im Kot nachgewiesen werden konnte. Zur Überprüfung, ob die Diät tatsächlich einen Einfluss auf die Kolonisierung von *S. Typhimurium* ausübt, hätten die infizierten Mäuse über einen längeren Zeitraum beobachtet werden müssen. Bestätigt wird diese Vermutung unter anderem von einer Studie, in der erst 48 h nach einer *S. Typhimurium*-Infektion ein Wachstumsvorteil in Anwesenheit von Maltodextrin nachgewiesen werden konnte (Nickerson *et al.*, 2014).

Obwohl nach der *S. Typhimurium*-Infektion kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der OTUs zwischen beiden Diät-Gruppen festgestellt werden konnte, zeigten die pflanzlich ernährten Mäuse in ihrer Mikrobiota eine erhöhte α -Diversität im Vergleich zur Western-Diät-Gruppe. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass in der pflanzlich ernährten Mäusegruppe die *Actinobacteria*-Anzahl deutlich niedriger ist, die *Bacteroidetes*-Anzahl dafür signifikant höher im Vergleich zur Western-Diät-Gruppe. Die beiden Gattungen *Enterococcus* (Phylum *Firmicutes*) und *Barnesiella* (Phylum *Bacteroidetes*, Familie *Porphyromonadaceae*) konnten ausschließlich in der pflanzlich ernährten Gruppe nachgewiesen werden. Interessanterweise korreliert das Vorkommen der Gattung *Barnesiella* mit der Eliminierung des klinischen Vancomycin-resistenten *Enterococcus* im Menschen

(Ubeda *et al.*, 2013). Die Gattung *Barnesiella* wird der Familie *Porphyromonadaceae* zugeordnet, die ebenfalls nach Salmonellen-Infektion in der pflanzlich ernährten Mäusegruppe im Vergleich zur Western-Diät-Gruppe signifikant stärker auftrat. Diese Familie ist Teil einer Bakteriengruppe innerhalb der Mikrobiota, die einen Wirt vor einer Salmonellen-induzierten Colitis schützen kann, wobei sie keinen Einfluss auf die Kolonisierungsfähigkeit der Salmonellen hat (Ferreira *et al.*, 2011). Die Gattung *Allobaculum* (Phylum *Firmicutes*), die in der Western-Diät-Gruppe eine höhere Abundanz aufwies, war auch in übergewichtigen HF-Diät-gefütterten C57/BL6-Mäusen signifikant stärker vertreten. In diesen übergewichtigen Mäusen führte eine Einnahme verschiedener Teesorten zu einem Gewichtsverlust, der mit einem Absinken in der Abundanz dieser Gattung assoziiert war (Liu *et al.*, 2016). Somit scheint die Gattung *Allobaculum* bei Übergewicht, das bei einer Western-Diät gehäuft auftritt, eine Rolle zu spielen.

Nach einer Salmonellen-Infektion wiesen das Mikrobiom der Mäuse-Gruppen abhängig von ihrer jeweiligen Diät signifikante Unterschiede auf. Trotzdem konnte zwischen beiden Diät-Gruppen kein Unterschied in der Salmonellen-Anzahl im Kot detektiert werden. Die pflanzlich ernährte Mäusegruppe hatte schneller eine größere Diversität inne als die Western-Diät-Gruppe und wurde von Bakterien kolonisiert, die mit der Eliminierung verschiedener Pathogener in Verbindung stehen. In der Western-Diät-Gruppe profilierten sich hingegen Bakteriengattungen, die mit Übergewicht assoziiert werden.

4.1.4 Diät-abhängiges Transkriptom

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts führten gesellschaftliche und technologische Veränderungen in der westlichen Welt zu einem Ernährungswechsel, die mit einem starken Anstieg in der Konsumierung von vorgefertigten Nahrungsmitteln mit hohen Anteilen an Fett und Kohlenhydraten einherging. Im selben Zeitraum konnte gleichzeitig ein stetiger Anstieg an Salmonellose-Fällen und chronisch entzündlichen Darm-Erkrankungen, die mit intestinaler Dysbiose assoziiert sind, beobachtet werden (Gould *et al.*, 2013, Cordain *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass die Konsumierung einer Western-Diät somit neben der Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota-Zusammensetzung auch Auswirkungen auf die Kolonisierungsfähigkeit pathogener Bakterien hat. Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen, sind gewisse Bestandteile wie das in Lebensmitteln vorkommende Maltodextrin, welches das Wachstum des intestinalen Pathogens *S. Typhimurium* fördert (Nickerson *et al.*, 2014). Ähnlich verhält es sich mit der Amadori-Komponente Fruktose-Asparagin, dessen Verstoffwechslung Salmonellen im entzündeten Darm einen Fitnessvorteil liefert (Ali *et al.*, 2014). Fruktose-Asparagin ist in verschiedenen Lebensmitteln zu finden und stellt zudem ein Vorprodukt von Acrylamid dar, was bei einer starken Erhitzung von Lebensmitteln entstehen kann (Gökmen and Senyuva, 2006). Andere Pathogene, wie z.B.

opportunistische *E. coli*-Stämme, nutzen die Pentose Desoxyribose als Kohlenstoffquelle, um sich im Darm gegen andere Bakterien durchzusetzen (Martinez-Jehanne *et al.*, 2009). Auch vom Wirt produzierte Substrate wie Sialinsäuren fördern die Darm-Kolonisierung von pathogenen Bakterien, was unter anderem für *Vibrio cholera* gezeigt werden konnte (McDonald *et al.*, 2016). Des Weiteren verschafft die Verstoffwechslung von 1,2-Propandiol, L-Fucose, Ethanolamin oder Tetrathionat Pathogenen einen Wachstumsvorteil (Winter *et al.*, 2010, Thiennimitr *et al.*, 2011, Staib and Fuchs, 2015, Staib and Fuchs, 2014).

Vergleicht man die Nährstoffzusammensetzung einer pflanzlich-basierten Ernährung mit einer Western-Diät so ist ersichtlich, dass jeweils unterschiedliche Energiequellen in den menschlichen Darm gelangen. Dies ruft spezifische Veränderungen in der Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota hervor und führt wiederum zu unterschiedlichen Stoffwechsel-Endprodukten (De Filippo *et al.*, 2010). Eine daraus resultierende veränderte Interaktion mit dem Wirt beeinflusst unter anderem das Darm-Metabolom (Turroni *et al.*, 2016). So beinhaltet das Metabolom der Hadza, einer Volksgruppe in Tansania, die sich überwiegend vegetarisch ernährt, deutlich höhere Menge an Hexosen, wohingegen das Metabolom von italienischen Personen, die sich typisch westlich ernähren, erhöhte Mengen an häufig vorkommenden natürlichen Aminosäuren aufwies (Turroni *et al.*, 2016). Auch eine Antibiotika-Behandlung oder eine *Salmonella*-Infektion übt einen Einfluss auf das Metabolom aus und verändert somit die Nährstoffverfügbarkeit im Darm (Antunes *et al.*, 2011c, Antunes *et al.*, 2011b). Dabei konnte festgestellt werden, dass eine *Salmonella*-Infektion verschiedenste metabolische Wirts-Stoffwechselwege im Darm und in der Leber beeinflusst, unter anderem den Arachidonsäure-, Gallensäure-, Hormon-, Inositol-, Stärke- und Zuckerstoffwechsel (Antunes *et al.*, 2011b). Es ist noch unklar, ob diese Veränderungen einem bakteriellen Mechanismus zu Grunde liegen und den Pathogenen einen Wachstumsvorteil verschaffen können.

Insgesamt konnten 66 Gene identifiziert werden, die in Bezug auf die jeweilige Mausdiät in *S. Typhimurium* ST4/74 unterschiedlich exprimiert wurden (Tab. 3.11). Wurde den Mäusen eine Western-Diät zugeführt, so zeigte *S. Typhimurium* unter anderem eine signifikant erhöhte Expression des Operons *pspA-E* und des Gens *pspG*. Diese *psp*-Gene kodieren für ein Phagen-Schock-Protein (Psp)-System, das im Falle von Membranstress für den Erhalt der Membran-Integrität und des Protonengradienten zuständig ist (Joly *et al.*, 2010). Die *psp*-Gene werden während einer *S. Typhimurium*-Infektion in Epithelzellen und Makrophagen hochreguliert (Eriksson *et al.*, 2003, Hautefort *et al.*, 2008). Zusätzlich sind die Gene *pspA* und *pspB* notwendig für die Virulenz von Salmonellen in Mäusen (Wallrodt *et al.*, 2014). Das Gen *pspB* ist dabei Teil eines Toxin-Antitoxin-Systems, wobei PspB das Antitoxin darstellt (Brown and Shaw, 2003). Des Weiteren war die Transkription eines Gens (STM474_RS07645) hochreguliert, das für eine putative Hydrogenase

kodiert. Auch Hydrogenasen spielen in der Virulenz eine wichtige Rolle und fördern unter anderem das anfängliche Wachstum von Salmonellen, indem sie den von der Mikrobiota produzierten Wasserstoff verwerten und sich dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber der Mikrobiota verschaffen (Maier *et al.*, 2013). Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind die Fimbrien-Gene, wobei in *E. coli* die Expression von Typ-1-Fimbrien zu einer erhöhten Virulenz im Harntrakt führt (Connell *et al.*, 1996). Die Gene *fimA* und *fimC* sind in der Western-Diät-Gruppe signifikant höher exprimiert. FimA bildet das Grundgerüst der Typ-1-Fimbrien (Hahn *et al.*, 2002) und FimC fungiert als ein Chaperon bei der Fimbriensynthese (Munera *et al.*, 2007). Da eine bakterielle Adhäsion mit Hilfe dieser Typ-1-Fimbrien durch die Anwesenheit von Mannose inhibiert werden kann (Old, 1972), erklärt sich auch die in der Western-Diät-Gruppe signifikant erhöhte Expression einiger Gene, die für die Verstoffwechslung von Mannose zuständig sind. Das *marRAB*-Operon steigert die Resistenz in *S. Typhimurium* gegen Gallenflüssigkeit und ist in Anwesenheit des Gallensalzes Deoxycholat hochreguliert (Prouty *et al.*, 2004a). Da alle drei Gene dieses Operons in *S. Typhimurium* ebenfalls in der Western-Diät-Gruppe stärker exprimiert werden, deutet dies möglicherweise auf eine erhöhte Gallensalzkonzentration im Darm hin.

Bei einer pflanzlichen Ernährung der C57/BL6-Mäuse werden überwiegend Gene in *S. Typhimurium* hochreguliert, die eine Rolle in der Metabolisierung verschiedener Kohlenhydraten spielen (Tab. 3.11). Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass bei einer Polysaccharid-reichen Ernährung eine größere Vielfalt an Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen herrscht (Rampelli *et al.*, 2015), wodurch es zu einem verstärkten Abbau der Polysaccharide kommen kann und dadurch Monosaccharide in größeren Mengen freigesetzt werden können (Turroni *et al.*, 2016). So ist z.B. der Arabinose-Stoffwechsel signifikant höher in Salmonellen exprimiert, die pflanzlich ernährte Mäuse kolonisieren, was auf die Anwesenheit dieses Substrates im Darm hindeutet. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass das Substrat Arabinose SPI-1 inhibiert und dadurch die Virulenz attenuiert (Lopez-Garrido *et al.*, 2015). Auch zeigte *S. Typhimurium* in der pflanzlichen-ernährten Mausgruppe eine erhöhte Expression von Genen, die eine Rolle in den Stoffwechselwegen von Sorbitol und Fruktose spielten. Die Aktivität dieser Gene könnte auf ein Vorhandensein dieser beiden Substrate im Darm hindeuten, was unter anderem an der Streptomycin-Behandlung liegen könnte. Hintergrund dieser Behauptung ist dabei eine Studie, in der C57/BL6-Mäuse mit dem Antibiotikum Cefaperzon behandelt wurden und bei denen anschließend im Darm eine signifikant erhöhte Menge an Zucker, wie Fruktose, Galaktose, Raffinose, Sucrose und Lactat, und an Zuckeralkoholen, wie z.B. Sorbitol, Mannitol, Xylitol und Ribitol nachgewiesen werden konnte (Theriot *et al.*, 2014). Wie auch eine Streptomycin-Behandlung eine *S. Typhimurium*-Kolonisierung ermöglicht, so führt eine Cefaperazon-Behandlung bei C57/BL6-Mäusen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *C. difficile*-Infektionen (Theriot *et al.*, 2014). Als einzige mögliche Erklärung, warum Hexitole nach

Antibiotika-Zugabe verstärkt im Darm zu finden sind, wurde eine veränderte fermentative Aktivität der Darm-Mikrobiota angegeben (Theriot *et al.*, 2014). Neben Sorbitol sind in *S. Typhimurium* in der pflanzlich ernährten Gruppe noch Gene für die Verstoffwechslung eines weiteren Zuckeralkohols, nämlich des Galaktitols, signifikant höher exprimiert. Eine erhöhte Menge an Galaktitol konnte ebenfalls im Darm von C57/BL6-Mäusen sechs Wochen nach Antibiotika-Behandlung detektiert werden (Theriot *et al.*, 2014). Diese Publikation liefert damit einen ersten Hinweis auf die Anwesenheit von Galaktitol im Darm. Die Anwesenheit von Galaktitol könnte den Salmonellen einen Wachstumsvorteil im Darm bringen, was erklären würde, warum Transposon-Insertionen in dem Genbereich, der für die Verstoffwechslung dieses Zuckeralkohols zuständig ist, zu einer verringerten Virulenz in Schwein, Huhn, Rind und Maus führen kann (Chaudhuri *et al.*, 2013).

In den Mäusen kommt es in *S. Typhimurium* zu einer Hochregulation von Genen, die eine Rolle sowohl in verschiedenen Stoffwechselwegen als auch in der Virulenz spielen. Dabei liegt der Schwerpunkt der Expression von *S. Typhimurium* in der pflanzlich ernährten Gruppe auf Genen verschiedener Stoffwechselwege. In der Western-Diät-Gruppe weist *S. Typhimurium* dagegen überwiegend eine erhöhte Transkription von Virulenzgenen auf. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Gene lassen sich zwei unterschiedliche Strategien erkennen, mit denen *S. Typhimurium* eine erfolgreiche Kolonisierung zu erreichen versucht. So werden in der pflanzlich ernährten Gruppe speziell Gene aktiviert, die es *S. Typhimurium* erlauben, noch ungenutzte metabolische Nischen zu besetzen und die Verstoffwechslung von z.B. Arabinose, Fruktose, Sorbitol und Galaktitol ermöglicht. In der Western-Diät-Gruppe hingegen sind speziell Virulenzgene, wie z.B. Fimbriengene, aktiv, um einen schnellen Infektionsprozess einzuleiten. Um diese Hypothese auszutesten, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, indem die Mäuse über einen längeren Zeitraum mit *S. Typhimurium* kolonisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Entzündungsreaktionen der Mäuse analysiert werden müssten. Dabei könnte festgestellt werden, ob die Mikrobiota in der Lage ist, die Salmonellen in einer bestimmten Diätgruppe auszukonkurrieren. Zusätzlich könnte man das Metabolom analysieren, um die Interaktionen zwischen der Mikrobiota, dem Wirt und den Salmonellen besser zu verstehen.

4.2 Die Verstoffwechslung von Galaktitol

Die Fähigkeit, die vier verwandten Kohlenhydrate Galaktitol, D-Tagatose, D-Galactosamin und N-Acetyl-Galactosamin zu verstoffwechseln, konnte bereits für viele pathogene und nicht-pathogene enterische Bakterienstämme nachgewiesen werden (Levy and Aminoff, 1980, Gutnick *et al.*, 1969, Brinkkotter *et al.*, 2000, Shakeri-Garakani *et al.*, 2004). N-Acetyl-Galactosamin ist ein natürlicher Bestandteil des Mucins (Robbe *et al.*, 2004), wohingegen die D-Tagatose ein Abbauprodukt von Galactosamin und N-Acetyl-Galactosamin ist. Alle vier Kohlenhydrate werden mit Hilfe von Phosphotransferase-Systemen in die Zelle aufgenommen und durch Substrat-spezifische Enzyme abgebaut. Das dabei entstehende Zwischenprodukt Tagatose-1,6-Bisphosphat wird durch eine Aldolase in die für die Glykolyse verwertbaren Produkte DHAP und GAP umgewandelt (Brinkkotter *et al.*, 2000, Shakeri-Garakani *et al.*, 2004). Der Galaktitol-Abbauweg in *S. Typhimurium* ist bisher noch nicht vollständig genetisch charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *gat*-Gencluster aus *S. Typhimurium* für die Verstoffwechslung von Galaktitol und D-Tagatose zuständig ist. In seiner Organisation ähnelt dieses Gencluster mehr dem für den Abbau von Galaktitol- und D-Tagatose-verantwortlichem Genbereich aus *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) und weniger dem aus *E. coli* (Lengeler, 1977).

4.2.1 Die Rolle des *gat*-Genclusters in der Virulenz von *S. Typhimurium*

Die ersten fünf Gene des *gat*-Genclusters zeigten eine erhöhte Expression in Salmonellen, die aus pflanzlich ernährten Mäusen isoliert wurden (Tab. 3.11). Um die Rolle dieses *gat*-Genclusters bei der Kolonisierung von Schwein, Huhn, Rind und Maus festzustellen, erfolgte eine Analyse der TraDIS-Daten von Chaudhuri *et al.* (Chaudhuri *et al.*, 2013). In *S. Typhimurium* ST4/74 führte eine Insertion in den Genen *gatR* und STM3254 jeweils zu einer abgeschwächten Kolonisierung in allen vier Tiermodellen (Anhang Tabelle A 7). Eine deutlich attenuierte Kolonisierung im Huhn, Schwein und Rind wurde durch einen Defekt im Gen STM3255 hervorgerufen. Eine Insertion im Gen *gatY* führte nur im Huhn- und Schweinmodell zu einer schlechteren Kolonisierung. Transposoninsertionen in den restlichen Genen zeigten keine signifikanten Abschwächungen. Dies deutet daraufhin, dass das *gat*-Gencluster in *S. Typhimurium* essentiell für die Kolonisierung des Darms von Nutztieren ist.

4.2.2 Verstoffwechslung von Galaktitol und D-Tagatose

Das in dieser Arbeit untersuchte *Salmonella gat*-Gencluster beinhaltet sowohl Galaktitol- als auch D-Tagatose-abbauende Gene (Abb. 4.1). Da das Gen STM3254 als eine hypothetische Tagatose-1-Phosphatkinase annotiert ist, wurde die Deletionsmutante Δ STM3254 auf ihre Fähigkeit hin überprüft, in M9 mit 1 % Tagatose bzw. Galaktitol zu wachsen. Es zeigte sich, dass die Mutante weder D-Tagatose noch Galaktitol als Kohlenstoffquelle nutzen konnte, wobei der Wachstumsdefekt durch episodale Expression des Gens STM3254 wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 3.23 und

Abb. 3.24). Somit scheint die putative Tagatose-1-Phosphatkinase in beiden Stoffwechselwegen involviert zu sein und verbindet den Tagatose- mit dem Galaktitol-Abbau in *S. Typhimurium*, was bereits in früheren Studien angedeutet wurde (Shakeri-Garakani *et al.*, 2004). BLAST-Analysen ergaben, dass die Aminosäuresequenz des Gens STM3256 Ähnlichkeiten zu Sequenzen von HPr- und EIIA-Proteinen aufweist, wobei es sich um ein sogenanntes Hybrid-Protein handeln könnte, bei dem die EIIA-Domäne mit einer Pseudo-HPr-Domäne fusioniert ist. Diese Art der Funktionsfusion ist bereits für das Fruktose-spezifische PTS in *S. Typhimurium* bekannt, bei dem die EIIA-Domäne mit einer HPr-Domäne zum Hybrid-Protein FPr fusioniert vorliegt (Postma *et al.*, 1993, Geerse *et al.*, 1989). Auch in dem Galaktitol- und Tagatose-spezifischen Gencluster in *K. oxytoca* konnte ein solches Protein identifiziert werden, das aufgrund seiner D-Tagatose-Spezifität als TPr bezeichnet wird (Shakeri-Garakani *et al.*, 2004).

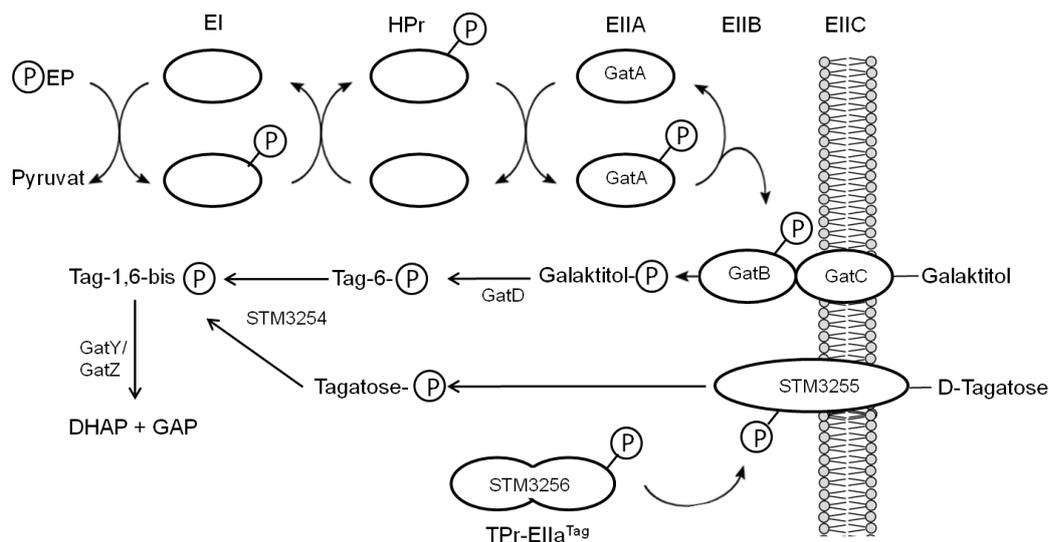


Abb. 4.1: Modell des Galaktitol- und Tagatose-spezifischen PTS. Mit Hilfe der putativen Funktionsannotationen wurde ein Modell, basierend auf dem Glukose-spezifischen Aufnahmesystem, erstellt. Dabei wird Galaktitol durch das EIIC-Protein GatC aufgenommen und mittels GatB phosphoryliert. Das Phosphat hat seinen Ursprung im Phosphoenolpyruvat (PEP) und wird über eine Enzymkette auf das EIIA-Protein GatA übertragen. Das Substrat D-Tagatose wird von dem EIIBC-Protein STM3255 in die Bakterienzelle aufgenommen und dabei phosphoryliert. Das Phosphat stammt von dem TPr-EIIA-Protein STM3256, welches sein Phosphat von dem EI-Protein erhält (nicht gezeigt). Galaktitol wird durch die Dehydrogenase GatD in Tagatose-6-Phosphat umgewandelt und durch STM3254 erneut phosphoryliert. Das von STM3255-aufgenommene Tagatose-6-Phosphat kann durch die gleiche Kinase (STM3254) ebenfalls phosphoryliert werden. In beiden Fällen entsteht Tagatose-1,6-Bisphosphat, welches durch eine Aldolase, die aus den beiden Untereinheiten GatY und GatZ aufgebaut ist, in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) umgewandelt wird und damit in den Glykolyse-Stoffwechsel eingespeist werden kann. Die Abbildung wurde von (Postma *et al.*, 1993) übernommen und mit Erlaubnis von ASM modifiziert.

Gene, die für die Verstoffwechslung von Galaktitol verantwortlich sind, konnten in *Citrobacter rodentium*, nicht jedoch in *Bacillus subtilis* oder *Listeria* spp. identifiziert werden. Allerdings trägt *C. rodentium* im *gatD*-Gen eine Phageninsertion, die zu einem Verlust des Wachstums mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle führt (Petty *et al.*, 2011). In einigen Stämmen,

wie z.B. *E. coli* K12, *S. bongori* und *S. Enteritidis*, fehlen die Gene STM3254-STM3256. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. bongori* und *S. Enteritidis* nicht in der Lage sind, D-Tagatose als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Abb. 3.22). Allerdings zeigen beide Stämme in Galaktitol-haltigem Minimalmedium ein Wachstum mit einer deutlich kürzeren Lag-Phase als der Stamm ST4/74 (Abb. 3.21). Dies lässt vermuten, dass die Gene STM3254-STM3256 für die Verstoffwechslung von D-Tagatose notwendig sind, wobei die Anwesenheit dieser Gene das Wachstum in M9 mit 1 % Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle verzögert. Betrachtet man das Salmonellen-Transkriptom, welches aus der pflanzlich ernährten Mäusegruppe isoliert wurde, so fällt auf, dass in dieser Gruppe die Gene *gatY*, STM3254, STM3255, STM3256 und *gatZ* signifikant hochreguliert waren (Tab. 3.11). Alle diese Gene sind an der Verstoffwechslung von D-Tagatose beteiligt. D-Tagatose ist in geringen Mengen in Lebensmitteln, wie z.B. Milch, zu finden (Mendoza *et al.*, 2005) und wird immer häufiger als Süßstoff eingesetzt, da er 92 % der Süße von Sucrose besitzt, aber nur 38 % von dessen Kalorien beinhaltet (Levin *et al.*, 1995). Manche Bakterien sind in der Lage, Galaktose mit Hilfe einer Galaktose- bzw. Arabinose-Isomerase in D-Tagatose umzuwandeln, was bei der industriellen Produktion dieses Süßstoffs gezielt genutzt wird (Mei *et al.*, 2016, Shin *et al.*, 2016, Kim, 2004). Da in den speziell hergestellten Maus-Diäten des *in vivo* Versuchs keine D-Tagatose enthalten war, eine Expression der für den Abbau von Tagatose-zuständigen Gene aber in *S. Typhimurium* stattfand, wäre es möglich, dass D-Tagatose von Bakterien der Mikrobiota gebildet worden ist, welches dann von den Salmonellen verwertet werden konnte. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Menge an D-Tagatose im Darm von diabetischen Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer war. Dabei führte die Zugabe eines präbiotischen Polysaccharides, das unter anderem bei der Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt wird, zu einem Anstieg an der D-Tagatose-Menge im Darm dieser diabetischen Mäuse (Zhu *et al.*, 2014). Auch in dieser Studie wurde die Vermutung angestellt, dass D-Tagatose durch eine Mikrobiota-abhängige Umwandlung der Galaktose entsteht (Zhu *et al.*, 2014). Zusätzlich wird D-Tagatose mit einem besseren Gesundheitszustand in Verbindung gebracht, da es einer Körpergewichtszunahme entgegen wirken kann und bei einer Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt wird (Levin, 2002, Espinosa and Fogelfeld, 2010, Lu *et al.*, 2008). Die Expression der für den Tagatose-Abbau-zuständigen Gene in *S. Typhimurium* in der pflanzlichen-ernährten Mausgruppe könnte daher indirekt auf eine Mikrobiota-Zusammensetzung hindeuten, die das Risiko an Diabetes zu erkranken, verringert (Abb. 4.2).

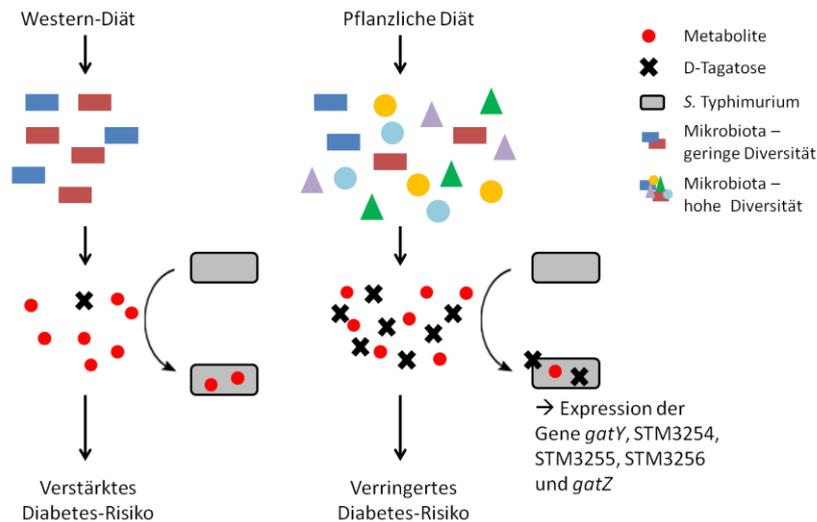


Abb. 4.2: D-Tagatose-Diabetes-Modell. Die Einnahme einer Western-Diät führt zu einer Mikrobiota mit geringerer Diversität im Vergleich zu einer pflanzlichen Diät. Aufgrund der veränderten bakteriellen Zusammensetzung im Darm werden auch unterschiedliche Metabolite freigesetzt. In der pflanzlich ernährten Gruppe zeigte *S. Typhimurium* eine signifikant erhöhte Expression der für den Tagatose-Abbau zuständigen Gene. Daher scheint D-Tagatose bei einer pflanzlichen Diät in erhöhten Mengen vorzukommen. Da D-Tagatose den Blutzuckerspiegel kontrollieren kann und damit einen anti-diabetischen Effekt ausübt, könnte eine pflanzliche Ernährung das Risiko an Typ-2-Diabetes zu erkranken verringern.

4.2.3 Rolle des DeoR-ähnlichen Regulators in der Expression der *gat*-Gene

In *E. coli*, einen nahen Verwandten von *S. Typhimurium*, gibt es schätzungsweise 314 regulatorische DNA-bindende Proteine, von denen 35 % Aktivatoren, 43 % Repressoren und 22 % duale Regulatoren sind (Perez-Rueda and Collado-Vides, 2000). Alle DNA-bindenden Regulatorproteine haben einen ähnlichen Aufbau und bestehen zum einen aus der DNA-Bindungsdomäne und zum anderen aus einer Oligomerisierungsdomäne, die als Substratbindedomäne fungieren kann. (Perez-Rueda *et al.*, 1998). Neue Studien identifizierten mindestens 54 unterschiedliche Familien in *E. coli* (Ishihama *et al.*, 2016). Die Einteilung in die jeweilige Familie verläuft überwiegend über die DNA-Bindungsdomäne (*Helix-turn-Helix* Motiv). Das Regulatorprotein GatR, welches für die Regulierung des Galaktitol-spezifischen PTS zuständig ist, zählt zur DeoR-Familie, welche der ISOCOT Superfamilie zugehörig ist (Anantharaman and Aravind, 2006). Zu der DeoR-Familie zählen zahlreiche Regulatoren, die unter anderem in *E. coli* die Aufnahme und Verstoffwechslung von Deoxyribose-Nucleoside durch DeoR (Valentin-Hansen *et al.*, 1985), N-Acetylgalactosamine durch AgaR (Ray and Larson, 2004) und L-Ascorbat durch UlaR kontrollieren (Garces *et al.*, 2008, Campos *et al.*, 2002). Auch bei dem Repressor IolR, der den *myo*-Inositol-Stoffwechsel reguliert, handelt es sich um einen Regulator der DeoR-Familie (Yebra *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass GatR an alle drei Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} bindet und deren Aktivität negativ beeinflusst. Nach Überexpression von *gatR* war die Promotoraktivität für P_{gatZ} am geringsten, gefolgt von P_{gatY} und P_{gatR} . Dies ist in Übereinstimmung mit der mittels SPR-Spektroskopie bestimmten höheren Affinität von GatR zu P_{gatZ} im Vergleich zu P_{gatY}

und mit dem höheren molaren Überschuss, der für die Bindung an P_{gatY} in Gelmobilitätsassays notwendig war (Abb. 3.34 und Abb. 3.35). SPR-Sensorgramme wiesen dabei verschiedene Bindungsmuster des GatR-Proteins auf, was darauf hindeutet, dass das Protein auf unterschiedliche Art und Weise mit den drei Promotoren interagiert. Diese Interaktion folgt nicht einer einfachen 1:1 Stöchiometrie, sondern ist deutlich komplexer und imitiert im Falle der Bindung von GatR an P_{gatZ} den erst vor kurzem beschriebenen Response-Regulator YpdB (Behr *et al.*, 2016). In beiden Fällen zeigt sich eine deutlich schnellere Dissoziation des Proteins von der DNA. Diese schnelle und erfolgreiche Promotor-Freigabe ermöglicht eine feine Regulation der Zielgen-Expression. Aufgrund der maximalen Antwort R_{max} kann davon ausgegangen werden, dass GatR als Dimer an die DNA bindet. Die deutlich höhere Affinität von GatR zu P_{gatZ} und die starke maximale Antwort R_{max} dieses Promotors könnten auf eine erhöhte Anzahl von GatR-Bindungsstellen innerhalb der drei Promotoren zurückzuführen sein. Gelmobilitätsassays, die in Anhang Abbildung A 20 dargestellt sind, bestätigen, dass GatR an mindestens zwei unterschiedlichen Stellen innerhalb des P_{gatZ} -Promotors bindet. GatR könnte daher aufgrund seiner Oligomerisierungs-Fähigkeit (Abb. 3.36 und Abb. 3.35) eine DNA-Protein-DNA-Brücke innerhalb des $gatZ$ -Promotors bilden, was zu einer Blockierung der RNA-Polymerase und somit zur Transkriptionshemmung führt. Solch ein regulatorischer Mechanismus ist ebenfalls für das Regulatorprotein H-NS beschrieben (Stoebel *et al.*, 2008). Die starke Repression von P_{gatZ} kann möglicherweise ein Mechanismus sein, eine ungewollte Expression des $gatZ$ - $gatD$ -Operons in der Anwesenheit von geringen Galaktitol-Konzentrationen zu verhindern. Sequenzvergleiche der gebundenen Fragmente ergab die Identifikation einer putativen 19 bp Consensus-Sequenz: YYHAHMWWTHMTTCGAAR (Abb. 4.3). Diese mögliche Consensus-Sequenz ist sowohl in den Promotorbereichen P_{gatY} und P_{gatR} also auch mit hoher Übereinstimmung an zwei Positionen im P_{gatZ} -Promotor vorzufinden (Abb. 4.4).

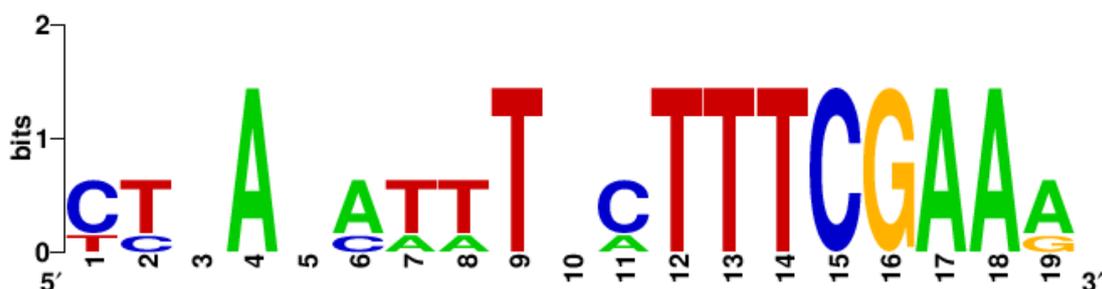


Abb. 4.3: Sequenz-Logo der putativen GatR-Consensus-Bindungssequenz. Eine bioinformatische Analyse der DNA-Fragmente, die eine Bindung mit dem GatR-Protein aufwiesen, ermöglichte die Identifikation einer konservierten, 19 bp-langen putativen Consensus-Nukleotidabfolge, hier als ein Sequenz-Logo dargestellt.

Die Entfernung des gesamten Gens $gatR$ aus dem Chromosom führte zu einem kompletten Wachstumsverlust von *S. Typhimurium* in Galaktitol-haltigem Medium. Dies widerspricht den Tatsachen, dass es sich bei dem Protein GatR um einen Repressor handelt und die Teildeletionen

$\Delta gatR$ -HTH und $\Delta gatR$ -DeoR ein deutlich besseres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Um mögliche methodenbedingte Fehlerquellen ausschließen zu können, wurde die *gatR*-Deletion mehrfach wiederholt. Unter anderem wurden kürzere Deletionen innerhalb von *gatR* eingefügt, jedoch zeigten alle *gatR*-Mutanten kein Wachstum in M9-Medium mit Galaktitol als einzige Kohlenstoffquelle. Ein möglicher Grund könnte eine bisher unbekannt regulatorische Funktion des Repressors sein.

4.2.4 DNA-CRP-Komplex aktiviert die Expression der *gat*-Gene

Ein sehr gut charakterisierter, dualer Regulator, der sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann, ist das Protein CRP (Kolb *et al.*, 1993). Das Protein CRP (*cAMP receptor protein*), auch bekannt als CAP (*catabolite activator protein*), bindet als ein Dimer mittels seiner HTH-Domäne an die DNA. Bei der Transkriptionsaktivierung durch CRP wird unterschieden zwischen der Klasse I, bei der die CRP-DNA-Bindungsstelle stromaufwärts des Kernpromotors liegt (z.B. beim *lac*-Operon), und der Klasse II, wobei hier die CRP-DNA-Bindungsstelle mit dem Kernpromotor überlappt (Lawson *et al.*, 2004, Reznikoff, 1992). Das Regulon von CRP umfasst über 100 Gene, von denen der Hauptteil eine Rolle in der Metabolisierung von Kohlenstoffquellen spielt (Kolb *et al.*, 1993). In den letzten Jahren zeigte sich allerdings, dass CRP noch in vielen weiteren Regulationsmechanismen involviert ist (Zheng *et al.*, 2004, Shimada *et al.*, 2011), unter anderem im Metabolismus von Persistern (Mok *et al.*, 2015), in der Pathogenität und Virulenz von Yersinien (Heroven *et al.*, 2012, Lathem *et al.*, 2014), in der temperaturabhängigen Regulierung durch regulatorische RNAs in Yersinien (Nuss *et al.*, 2015) und ebenso in der Synthese von Liponsäuren (Zhang *et al.*, 2015).

In der Anwesenheit von cAMP erkennt der Aktivator CRP die drei Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} und bindet an diese. Die Anzahl der CRP-Moleküle, die für die DNA-Bindung notwendig sind, und die Bindungskinetik des CRP-Proteins waren für alle drei Promotoren ähnlich. Durch die bereits bekannte Consensus-Sequenz des CRP-Proteins (Shimada *et al.*, 2011) konnte der Bindungsbereich innerhalb der drei Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} lokalisiert werden (Abb. 4.4). Dabei ist zu erkennen, dass für die zwei Promotoren P_{gatY} und P_{gatR} die Aktivierung nach dem Klasse I Mechanismus, im Falle des Promotors P_{gatZ} die Aktivierung nach der Klasse II erfolgt, da hier die Consensus-Sequenz mit der -10-Region überlappt (Lawson *et al.*, 2004).

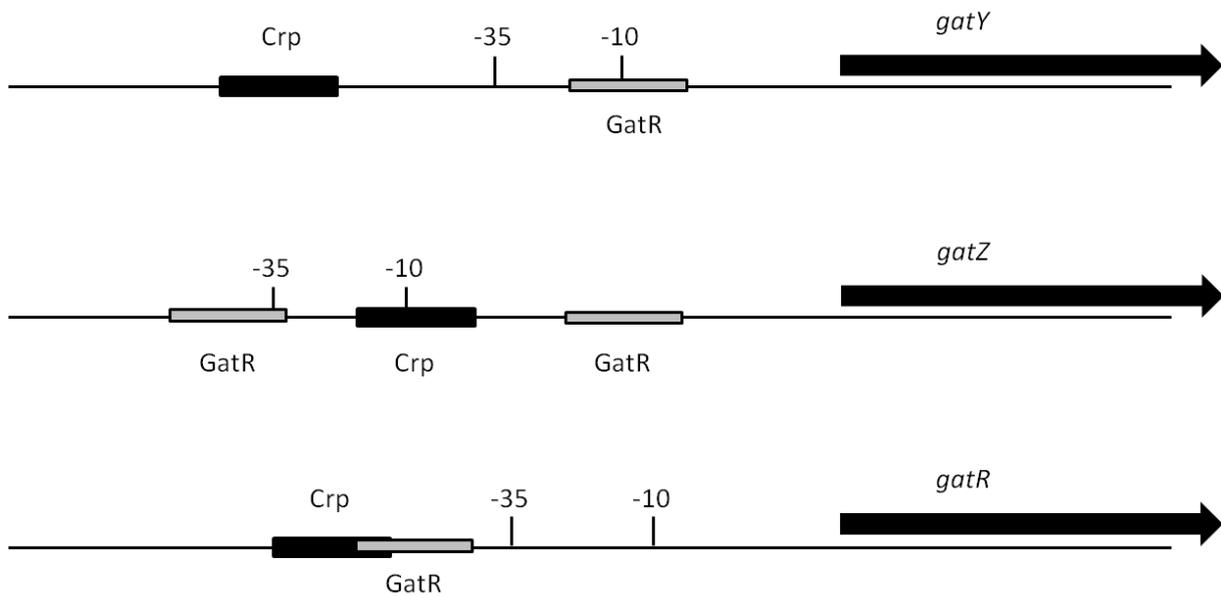


Abb. 4.4: Promotorbereiche mit GatR und CRP-Bindungsstellen. Gezeigt sind die drei möglichen CRP- (schwarzer Kasten) und GatR- Bindungsstellen (grauer Kasten) innerhalb der drei Promotorbereiche P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Zusätzlich sind jeweils die -35- und -10-Regionen, die mit Hilfe des Bprom-Programms identifiziert wurden, eingezeichnet. Die Gene werden als schwarze Pfeile dargestellt.

4.2.5 Modell des Regulationsmechanismus des *gat*-Genclusters durch GatR und CRP

Basierend auf den gewonnenen Daten in dieser Arbeit war es möglich, ein Modell des Regulationsmechanismus von GatR und CRP zu erstellen. Da die SPR-Sensorgramme keine signifikanten Unterschiede in der Affinität des CRP-Proteins zu allen drei Promotoren aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass das Expressionsmuster von *gatY*, *gatZ* und *gatR* eher durch verschiedene GatR-Bindungseigenschaften als von CRP beeinflusst wird. Diese Vermutung wird durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigt.

In Abwesenheit von Galaktitol bindet das dimerisierte GatR an seine DNA-Bindungssequenz innerhalb des *gatY*-Promotorbereichs, welche mit der -10-Region überlappt (Abb. 4.4). Dadurch wird eine Bindung der RNA-Polymerase an die DNA verhindert und die Expression der Gene *gatY* bis STM3256 blockiert (Abb. 4.5). Im *gatR*-Promotorbereich liegt die GatR-Bindungssequenz stromaufwärts der -35-Region und überlappt mit der CRP-Bindungssequenz, wodurch GatR vermutlich mit der Bindung des cAMP-CRP-Komplexes an die DNA interferiert (Abb. 4.4). Durch die fehlende Unterstützung eines gebundenen cAMP-CRP-Komplexes kann die RNA-Polymerase nicht mehr an die DNA binden, und die Expression des Gens *gatR* bleibt aus. Sporadische Bindungen der RNA-Polymerase sind dennoch nicht auszuschließen, was zu einer basalen Expression des *gatR*-Gens führen könnte. Dadurch liegt der Repressor immer in minimaler, jedoch ausreichender Menge vor, um die Aktivität der drei Promotoren zu hemmen. Solch eine überlappende Konstellation konnte

ebenfalls für AgaR und den Promotor von *agaZ* im N-Acetyl-Galactosamin-Stoffwechselweg beobachtet werden (Ray and Larson, 2004). Im P_{gatZ} -Promotor konnten zwei GatR-Bindungsstellen identifiziert werden (Abb. 4.4). GatR könnte daher aufgrund seiner Oligomerisierungs-Fähigkeit eine DNA-Protein-DNA-Brücke innerhalb des *gatZ*-Promotors bilden, was zu einer Blockierung der RNA-Polymerase und zur Transkriptionshemmung führt (Abb. 4.5).

In Anwesenheit von Galaktitol, bindet der Induktor an die Oligomerisierungsdomäne des GatR-Proteins, sodass GatR als Monomer vorliegt und nicht mehr an die DNA bindet. Dadurch ist der Promotor frei, das CRP-Protein und die RNA-Polymerase können binden und die Transkription starten (Abb. 4.5). Dabei dissoziiert GatR am schnellsten von dem P_{gatZ} -Promotor, wodurch die Gene, die für die Aufnahme von Galaktitol zuständig sind (*gatA-gatD*), zuerst transkribiert werden. Die GatR-Dissoziation von dem P_{gatY} -Promotor ist deutlich langsamer, sodass eine verzögerte Transkription der Gene, die für die Verstoffwechslung zuständig sind, stattfindet. Mittels SPR-Spektroskopie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Substrat Galaktitol keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von GatR zu den drei Promotoren ausübte. Möglicherweise dient die phosphorylierte Form von Galaktitol als Induktor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in vorliegender Arbeit ein experimenteller Nachweis für einen regulatorischen Antagonismus zwischen CRP und GatR erbracht werden konnte. Dabei spielen beide Proteine eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Expression der *gat*-Gene. Die Umweltbedingungen, unter denen eine Galaktitol-Verstoffwechslung den *S. enterica* Serovar-Typen einen Wachstumsvorteil verschafft, bleiben jedoch weiterhin ungeklärt. Galaktitol konnte in einer anderen Studie als Metabolit im Darm nachgewiesen werden (Theriot *et al.*, 2014) und könnte daher *S. Typhimurium* als alternative Kohlenstoffquelle dienen. Um nachzuweisen, dass die Gene tatsächlich in der Maus aktiv sind, müssten die drei Promotorfusions-Stämme ST4/74 $P_{gatY}::lux$, ST4/74 $P_{gatZ}::lux$ und ST4/74 $P_{gatR}::lux$ *in vivo* getestet werden. Den Nachweis, dass die Verstoffwechslung von Galaktitol den Salmonellen einen Wachstumsvorteil verschafft, müsste mittels Deletionsmutanten *in vivo* überprüft werden. Dazu könnte man in einem kompetitiven Assay die Kolonisierungsfähigkeit des Wildtyps und der *gat*-Deletionsmutante in Abhängigkeit von der Diät direkt miteinander vergleichen.

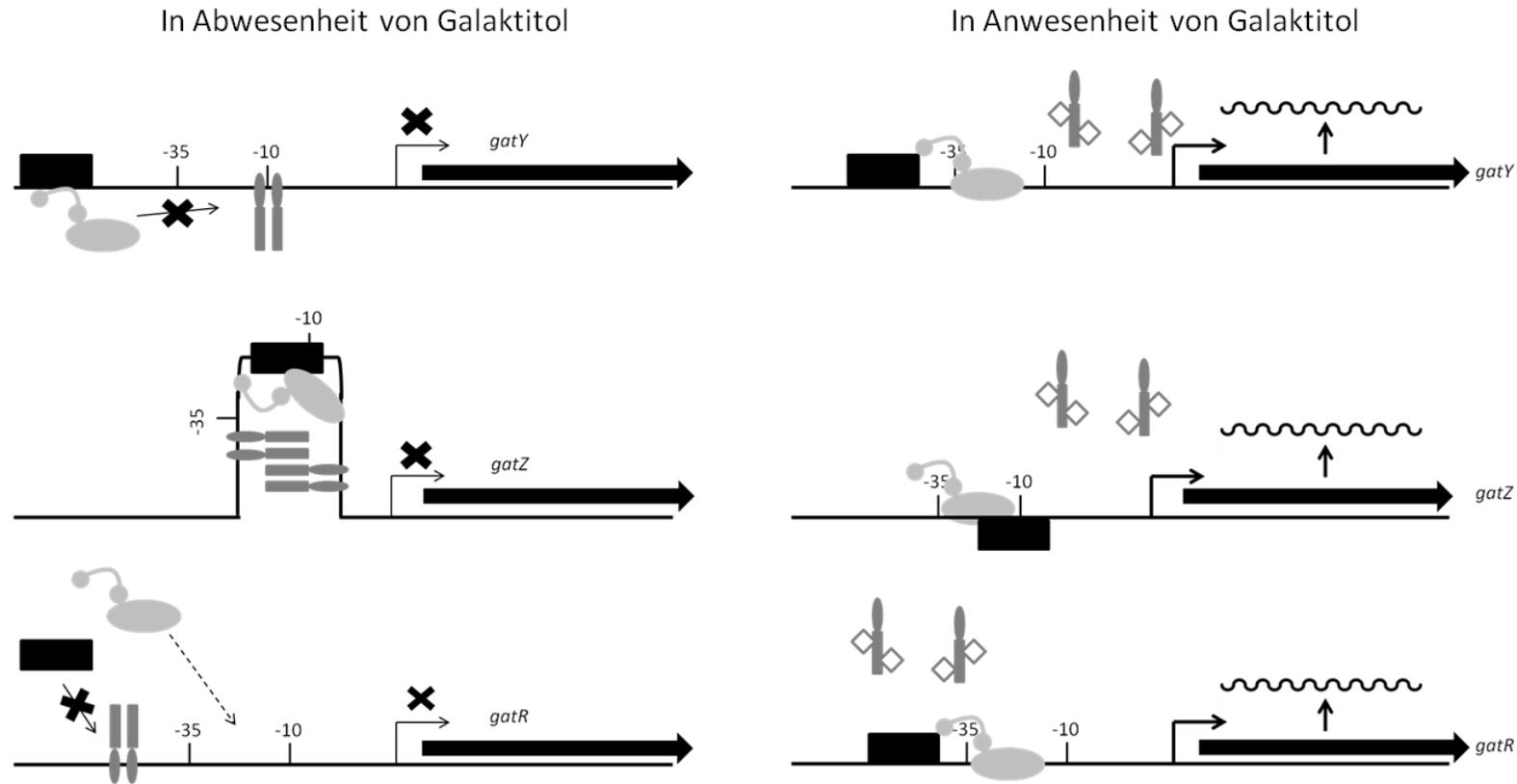
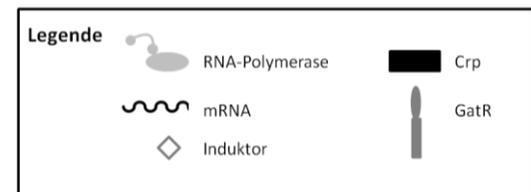


Abb. 4.5: Regulationsmechanismus des *gat*-Genclusters. In Abwesenheit von Galaktitol bindet das GatR-Protein als Dimer an seine Bindungsstelle innerhalb der drei Promotoren P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} . Dabei wird im Falle von P_{gatY} die Bindung der RNA-Polymerase direkt verhindert. Innerhalb des P_{gatZ} -Promotors kommt es aufgrund zweier Bindungsstellen zu einer Brückenbildung, bei der die RNA-Polymerase gefangen gehalten wird. Im Falle des P_{gatR} -Promotors wird die Bindung des cAMP-CRP-Komplexes verhindert und dadurch indirekt die Bindung der RNA-Polymerase. In Anwesenheit von Galaktitol bindet der Induktor (möglicherweise Galaktitol-Phosphat) an GatR und verhindert eine Dimerisierung. Das monomere GatR-Protein ist nicht mehr in der Lage an die DNA zu binden, und die Transkription wird gestartet.



5 Literaturverzeichnis

- ABRAHAMS, G. L. & HENSEL, M. 2006. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol*, 8, 728-37.
- ABU KWAIK, Y. & BUMANN, D. 2013. Microbial quest for food in vivo: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. *Cell Microbiol*, 15, 882-90.
- ABUOUN, M., SUTHERS, P. F., JONES, G. I., CARTER, B. R., SAUNDERS, M. P., MARANAS, C. D., WOODWARD, M. J. & ANJUM, M. F. 2009. Genome Scale Reconstruction of a *Salmonella* Metabolic Model: COMPARISON OF SIMILARITY AND DIFFERENCES WITH A COMMENSAL *Escherichia coli* STRAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 29480-29488.
- AGBAJE, M., BEGUM, R. H., OYEKUNLE, M. A., OJO, O. E. & ADENUBI, O. T. 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol (Praha)*, 56, 497-503.
- AGUS, A., DENIZOT, J., THEVENOT, J., MARTINEZ-MEDINA, M., MASSIER, S., SAUVANET, P., BERNALIER-DONADILLE, A., DENIS, S., HOFMAN, P., BONNET, R., BILLARD, E. & BARNICH, N. 2016. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep*, 6, 19032.
- AILION, M., BOBIK, T. A. & ROTH, J. R. 1993. Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 175, 7200-8.
- ALBENBERG, L., ESIPOVA, T. V., JUDGE, C. P., BITTINGER, K., CHEN, J., LAUGHLIN, A., GRUNBERG, S., BALDASSANO, R. N., LEWIS, J. D., LI, H., THOM, S. R., BUSHMAN, F. D., VINOGRADOV, S. A. & WU, G. D. 2014. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 147, 1055-63 e8.
- ALI, M. M., NEWSOM, D. L., GONZALEZ, J. F., SABAG-DAIGLE, A., STAHL, C., STEIDLEY, B., DUBENA, J., DYSZEL, J. L., SMITH, J. N., DIEYE, Y., ARSENESCU, R., BOYAKA, P. N., KRAKOWKA, S., ROMEO, T., BEHRMAN, E. J., WHITE, P. & AHMER, B. M. 2014. Fructose-asparagine is a primary nutrient during growth of *Salmonella* in the inflamed intestine. *PLoS Pathog*, 10, e1004209.
- ALVAREZ-ORDONEZ, A. 2011. The Acid Tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45, 483-493.
- AMAVISIT, P., LIGHTFOOT, D., BROWNING, G. F. & MARKHAM, P. F. 2003. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol*, 185, 3624-35.
- AMINOV, R. I., WALKER, A. W., DUNCAN, S. H., HARMSSEN, H. J., WELLING, G. W. & FLINT, H. J. 2006. Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to *Roseburia* spp. or *Eubacterium rectale*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 6371-6.
- ANANTHARAMAN, V. & ARAVIND, L. 2006. Diversification of catalytic activities and ligand interactions in the protein fold shared by the sugar isomerases, eIF2B, DeoR transcription factors, acyl-CoA transferases and methenyltetrahydrofolate synthetase. *J Mol Biol*, 356, 823-42.
- ANDREWS-POLYMERIS, H. L., BÄUMLER, A. J., MCCORMICK, B. A. & FANG, F. C. 2010. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infect Immun*, 78, 2356-69.
- ANTUNES, L. C., ANDERSEN, S. K., MENENDEZ, A., ARENA, E. T., HAN, J., FERREIRA, R. B., BORCHERS, C. H. & FINLAY, B. B. 2011a. Metabolomics reveals phospholipids as important nutrient sources during *Salmonella* growth in bile in vitro and in vivo. *J Bacteriol*, 193, 4719-25.
- ANTUNES, L. C., ARENA, E. T., MENENDEZ, A., HAN, J., FERREIRA, R. B., BUCKNER, M. M., LOLIC, P., MADILAO, L. L., BOHLMANN, J., BORCHERS, C. H. & FINLAY, B. B. 2011b. Impact of salmonella infection on host hormone metabolism revealed by metabolomics. *Infect Immun*, 79, 1759-69.

- ANTUNES, L. C., HAN, J., FERREIRA, R. B., LOLIC, P., BORCHERS, C. H. & FINLAY, B. B. 2011c. Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1494-503.
- ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., YAMADA, T., MENDE, D. R., FERNANDES, G. R., TAP, J., BRULS, T., BATTO, J. M., BERTALAN, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., FERNANDEZ, L., GAUTIER, L., HANSEN, T., HATTORI, M., HAYASHI, T., KLEEREBEZEM, M., KUROKAWA, K., LECLERC, M., LEVENEZ, F., MANICHANH, C., NIELSEN, H. B., NIELSEN, T., PONS, N., POULAIN, J., QIN, J., SICHERITZ-PONTEN, T., TIMS, S., TORRENTS, D., UGARTE, E., ZOETENDAL, E. G., WANG, J., GUARNER, F., PEDERSEN, O., DE VOS, W. M., BRUNAK, S., DORE, J., ANTOLIN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H. M., ALMEIDA, M., BRECHOT, C., CARA, C., CHERVAUX, C., CULTRONE, A., DELORME, C., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FOERSTNER, K. U., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., HUBER, W., VAN HYLCKAMA-VLIEG, J., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KNOL, J., LAKHDARI, O., LAYEC, S., LE ROUX, K., MAGUIN, E., MERIEUX, A., MELO MINARDI, R., M'RINI, C., MULLER, J., OOZEER, R., PARKHILL, J., RENAULT, P., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., SUNAGAWA, S., TORREJON, A., TURNER, K., VANDEMEULEBROUCK, G., VARELA, E., WINOGRADSKY, Y., ZELLER, G., WEISSENBACH, J., EHRLICH, S. D. & BORK, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-80.
- ATARASHI, K., TANOUE, T., OSHIMA, K., SUDA, W., NAGANO, Y., NISHIKAWA, H., FUKUDA, S., SAITO, T., NARUSHIMA, S., HASE, K., KIM, S., FRITZ, J. V., WILMES, P., UEHA, S., MATSUSHIMA, K., OHNO, H., OLLE, B., SAKAGUCHI, S., TANIGUCHI, T., MORITA, H., HATTORI, M. & HONDA, K. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500, 232-6.
- AUDIA, J. P., WEBB, C. C. & FOSTER, J. W. 2001. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol*, 291, 97-106.
- AUSTIN, J. W., SANDERS, G., KAY, W. W. & COLLINSON, S. K. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 162, 295-301.
- BÄCKHED, F., LEY, R. E., SONNENBURG, J. L., PETERSON, D. A. & GORDON, J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915-20.
- BALBAS, P., SOBERON, X., MERINO, E., ZURITA, M., LOMELI, H., VALLE, F., FLORES, N. & BOLIVAR, F. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review. *Gene*, 50, 3-40.
- BARABOTE, R. D. & SAIER, M. H., JR. 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 608-34.
- BARTHEL, M., HAPFELMEIER, S., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., KREMER, M., ROHDE, M., HOGARDT, M., PFEFFER, K., RUSSMANN, H. & HARDT, W. D. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun*, 71, 2839-58.
- BAUCHERON, S., NISHINO, K., MONCHAUX, I., CANEPA, S., MAUREL, M. C., COSTE, F., ROUSSEL, A., CLOECKAERT, A. & GIRAUD, E. 2014. Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*.
- BÄUMLER, A. J. 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol*, 5, 318-22.
- BÄUMLER, A. J., TSOLIS, R. M., BOWE, F. A., KUSTERS, J. G., HOFFMANN, S. & HEFFRON, F. 1996. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun*, 64, 61-8.
- BEGLEY, M., GAHAN, C. G. & HILL, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 625-51.
- BEHR, S., HEERMANN, R. & JUNG, K. 2016. Insights into the DNA-binding mechanism of a LytTR-type transcription regulator. *Biosci Rep*, 36.
- BERGMAN, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*, 70, 567-90.

- BERTANI, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 62, 293-300.
- BLANC-POTARD, A. B. & GROISMAN, E. A. 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J*, 16, 5376-85.
- BLANC-POTARD, A. B., SOLOMON, F., KAYSER, J. & GROISMAN, E. A. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 181, 998-1004.
- BLASER, M. J. & NEWMAN, L. S. 1982. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis*, 4, 1096-106.
- BLONDEL, C. J., JIMENEZ, J. C., CONTRERAS, I. & SANTIVIAGO, C. A. 2009. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics*, 10, 354.
- BLONDEL, C. J., JIMENEZ, J. C., LEIVA, L. E., ALVAREZ, S. A., PINTO, B. I., CONTRERAS, F., PEZOA, D., SANTIVIAGO, C. A. & CONTRERAS, I. 2013. The type VI secretion system encoded in *Salmonella* pathogenicity island 19 is required for *Salmonella enterica* serotype Gallinarum survival within infected macrophages. *Infect Immun*, 81, 1207-20.
- BOGOMOLNAYA, L. M., SANTIVIAGO, C. A., YANG, H. J., BÄUMLER, A. J. & ANDREWS-POLYMERIS, H. L. 2008. 'Form variation' of the O12 antigen is critical for persistence of *Salmonella* Typhimurium in the murine intestine. *Mol Microbiol*, 70, 1105-19.
- BOHNHOFF, M. & MILLER, C. P. 1962. Enhanced susceptibility to *Salmonella* infection in streptomycin-treated mice. *J Infect Dis*, 111, 117-27.
- BOHNHOFF, M., MILLER, C. P. & MARTIN, W. R. 1964. Resistance of the Mouse's Intestinal Tract to Experimental *Salmonella* Infection. II. Factors Responsible for Its Loss Following Streptomycin Treatment. *J Exp Med*, 120, 817-28.
- BOWDEN, S. D., RAMACHANDRAN, V. K., KNUDSEN, G. M., HINTON, J. C. & THOMPSON, A. 2010. An incomplete TCA cycle increases survival of *Salmonella* Typhimurium during infection of resting and activated murine macrophages. *PLoS One*, 5, e13871.
- BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J., TAUXE, R. & SWAMINATHAN, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, 38, 2465-7.
- BRINKKOTTER, A., KLOSS, H., ALPERT, C. & LENGELER, J. W. 2000. Pathways for the utilization of N-acetyl-galactosamine and galactosamine in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 37, 125-35.
- BRINKKÖTTER, A., SHAKERI-GARAKANI, A. & LENGELER, J. W. 2002. Two class II D-tagatose-bisphosphate aldolases from enteric bacteria. *Arch Microbiol*, 177, 410-419.
- BRINKWORTH, G. D., NOAKES, M., CLIFTON, P. M. & BIRD, A. R. 2009. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *Br J Nutr*, 101, 1493-502.
- BROKATZKY, D. 2015. *Regulation der Inositoldegradation von Salmonella enterica*. Masterarbeit, TU München.
- BROOKS, J. 1996. The sad and tragic life of Typhoid Mary. *CMAJ*, 154, 915-6.
- BROWN, A. J., GOLDSWORTHY, S. M., BARNES, A. A., EILERT, M. M., TCHEANG, L., DANIELS, D., MUIR, A. I., WIGGLESWORTH, M. J., KINGHORN, I., FRASER, N. J., PIKE, N. B., STRUM, J. C., STEPLEWSKI, K. M., MURDOCK, P. R., HOLDER, J. C., MARSHALL, F. H., SZEKERES, P. G., WILSON, S., IGNAR, D. M., FOORD, S. M., WISE, A. & DOWELL, S. J. 2003. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*, 278, 11312-9.
- BROWN, J. M. & SHAW, K. J. 2003. A novel family of *Escherichia coli* toxin-antitoxin gene pairs. *J Bacteriol*, 185, 6600-8.
- BURGIN, A. B., PARODOS, K., LANE, D. J. & PACE, N. R. 1990. The excision of intervening sequences from *Salmonella* 23S ribosomal RNA. *Cell*, 60, 405-14.
- CAMPOS, E., AGUILAR, J., BALDOMA, L. & BADIA, J. 2002. The gene *yjfQ* encodes the repressor of the *yjfR-X* regulon (*ula*), which is involved in L-ascorbate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184, 6065-8.

- CANTAREL, B. L., COUTINHO, P. M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V. & HENRISSAT, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37, D233-8.
- CARLISLE, E. M., POROYKO, V., CAPLAN, M. S., ALVERDY, J., MOROWITZ, M. J. & LIU, D. 2013. Murine gut microbiota and transcriptome are diet dependent. *Ann Surg*, 257, 287-94.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. & PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-5.
- CHAUDHURI, R. R., MORGAN, E., PETERS, S. E., PLEASANCE, S. J., HUDSON, D. L., DAVIES, H. M., WANG, J., VAN DIEMEN, P. M., BUCKLEY, A. M., BOWEN, A. J., PULLINGER, G. D., TURNER, D. J., LANGRIDGE, G. C., TURNER, A. K., PARKHILL, J., CHARLES, I. G., MASKELL, D. J. & STEVENS, M. P. 2013. Comprehensive assignment of roles for *Salmonella typhimurium* genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS Genet*, 9, e1003456.
- CHEN, J., HE, X. & HUANG, J. 2014. Diet effects in gut microbiome and obesity. *J Food Sci*, 79, R442-51.
- CHEN, P., ANDERSSON, D. I. & ROTH, J. R. 1994. The control region of the pdu/cob regulon in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 176, 5474-82.
- CHILCOTT, G. S. & HUGHES, K. T. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 694-708.
- CLEMENTE, J. C., PEHRSSON, E. C., BLASER, M. J., SANDHU, K., GAO, Z., WANG, B., MAGRIS, M., HIDALGO, G., CONTRERAS, M., NOYA-ALARCON, O., LANDER, O., MCDONALD, J., COX, M., WALTER, J., OH, P. L., RUIZ, J. F., RODRIGUEZ, S., SHEN, N., SONG, S. J., METCALF, J., KNIGHT, R., DANTAS, G. & DOMINGUEZ-BELLO, M. G. 2015. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv*, 1.
- CLEMENTE, J. C., URSELL, L. K., PARFREY, L. W. & KNIGHT, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148, 1258-70.
- COCKS, G. T., AGUILAR, T. & LIN, E. C. 1974. Evolution of L-1, 2-propanediol catabolism in *Escherichia coli* by recruitment of enzymes for L-fucose and L-lactate metabolism. *J Bacteriol*, 118, 83-8.
- CONNELL, I., AGACE, W., KLEMM, P., SCHEMBRI, M., MARILD, S. & SVANBORG, C. 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9827-32.
- CORDAIN, L., EATON, S. B., SEBASTIAN, A., MANN, N., LINDBERG, S., WATKINS, B. A., O'KEEFE, J. H. & BRAND-MILLER, J. 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*, 81, 341-54.
- COSTELLO, E. K., LAUBER, C. L., HAMADY, M., FIERER, N., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694-7.
- CROUCH, M. L., BECKER, L. A., BANG, I. S., TANABE, H., OUELLETTE, A. J. & FANG, F. C. 2005. The alternative sigma factor sigma is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. *Mol Microbiol*, 56, 789-99.
- DANIEL, H., MOGHADDAS GHOLAMI, A., BERRY, D., DESMARCHELIER, C., HAHNE, H., LOH, G., MONDOT, S., LEPAGE, P., ROTHBALLER, M., WALKER, A., BOHM, C., WENNING, M., WAGNER, M., BLAUT, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., KUSTER, B., HALLER, D. & CLAVEL, T. 2014. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J*, 8, 295-308.
- DATSENKO, K. A. & WANNER, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6640-5.
- DAVIE, J. R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, 133, 2485S-2493S.
- DE FILIPPO, C., CAVALIERI, D., DI PAOLA, M., RAMAZZOTTI, M., POULLET, J. B., MASSART, S., COLLINI, S., PIERACCINI, G. & LIONETTI, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14691-6.
- DEUTSCHER, J., AKE, F. M., DERKAOUI, M., ZEBRE, A. C., CAO, T. N., BOURAOUI, H., KENTACHE, T., MOKHTARI, A., MILOHANIC, E. & JOYET, P. 2014. The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein

- phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 78, 231-56.
- DONALDSON, G. P., LEE, S. M. & MAZMANIAN, S. K. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 14, 20-32.
- DONEGAN, N. P. & CHEUNG, A. L. 2009. Regulation of the mazEF toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on sigB expression. *J Bacteriol*, 191, 2795-805.
- DONG, T. & SCHELLHORN, H. E. 2010. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun*, 78, 887-97.
- DUNCAN, S. H., BELENGUER, A., HOLTROP, G., JOHNSTONE, A. M., FLINT, H. J. & LOBLEY, G. E. 2007. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1073-8.
- DUNCAN, S. H., RUSSELL, W. R., QUARTIERI, A., ROSSI, M., PARKHILL, J., WALKER, A. W. & FLINT, H. J. 2016. Wheat bran promotes enrichment within the human colonic microbiota of butyrate-producing bacteria that release ferulic acid. *Environ Microbiol*, 18, 2214-25.
- EARLE, K. A., BILLINGS, G., SIGAL, M., LICHTMAN, J. S., HANSSON, G. C., ELIAS, J. E., AMIEVA, M. R., HUANG, K. C. & SONNENBURG, J. L. 2015. Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization. *Cell Host Microbe*, 18, 478-88.
- EBERTH, C. J. 1880. Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis. *Archiv f. pathol. Anat.*, 81, 58-74.
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E. & RELMAN, D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-8.
- EL KAOUTARI, A., ARMOUGOM, F., GORDON, J. I., RAOULT, D. & HENRISSAT, B. 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 11, 497-504.
- ELDER, J. R., CHIOK, K. L., PAUL, N. C., HALDORSON, G., GUARD, J. & SHAH, D. H. 2016. The Salmonella pathogenicity island 13 contributes to pathogenesis in streptomycin pre-treated mice but not in day-old chickens. *Gut Pathog*, 8, 16.
- ENDT, K., STECHER, B., CHAFFRON, S., SLACK, E., TCHITCHEK, N., BENECKE, A., VAN MAELE, L., SIRARD, J. C., MUELLER, A. J., HEIKENWALDER, M., MACPHERSON, A. J., STRUGNELL, R., VON MERING, C. & HARDT, W. D. 2010. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal Salmonella diarrhea. *PLoS Pathog*, 6, e1001097.
- ERIKSSON, S., LUCCHINI, S., THOMPSON, A., RHEN, M. & HINTON, J. C. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Mol Microbiol*, 47, 103-18.
- ESPINOSA, I. & FOGELFELD, L. 2010. Tagatose: from a sweetener to a new diabetic medication? *Expert Opin Investig Drugs*, 19, 285-94.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13, 4329.
- EVEREST, P., KETLEY, J., HARDY, S., DOUCE, G., KHAN, S., SHEA, J., HOLDEN, D., MASKELL, D. & DOUGAN, G. 1999. Evaluation of Salmonella typhimurium mutants in a model of experimental gastroenteritis. *Infect Immun*, 67, 2815-21.
- FABICH, A. J., JONES, S. A., CHOWDHURY, F. Z., CERNOSEK, A., ANDERSON, A., SMALLEY, D., MCHARGUE, J. W., HIGHTOWER, G. A., SMITH, J. T., AUTIERI, S. M., LEATHAM, M. P., LINS, J. J., ALLEN, R. L., LAUX, D. C., COHEN, P. S. & CONWAY, T. 2008. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal Escherichia coli strains in the mouse intestine. *Infect Immun*, 76, 1143-52.
- FABREGA, A. & VILA, J. 2013. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*, 26, 308-41.

- FAITH, J. J., GURUGE, J. L., CHARBONNEAU, M., SUBRAMANIAN, S., SEEDORF, H., GOODMAN, A. L., CLEMENTE, J. C., KNIGHT, R., HEATH, A. C., LEIBEL, R. L., ROSENBAUM, M. & GORDON, J. I. 2013. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341, 1237439.
- FAUCHER, S. P., CURTISS, R., 3RD & DAIGLE, F. 2005. Selective capture of Salmonella enterica serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the Salmonella enterica serovar Typhimurium genome. *Infect Immun*, 73, 5217-21.
- FERREIRA, R. B., GILL, N., WILLING, B. P., ANTUNES, L. C., RUSSELL, S. L., CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. 2011. The intestinal microbiota plays a role in Salmonella-induced colitis independent of pathogen colonization. *PLoS One*, 6, e20338.
- FERRER, M., MENDEZ-GARCIA, C., ROJO, D., BARBAS, C. & MOYA, A. 2016. Antibiotic use and microbiome function. *Biochem Pharmacol*.
- FLINT, H. J., BAYER, E. A., RINCON, M. T., LAMED, R. & WHITE, B. A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*, 6, 121-31.
- FLINT, H. J., SCOTT, K. P., DUNCAN, S. H., LOUIS, P. & FORANO, E. 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3, 289-306.
- FORBESTER, J. L., GOULDING, D., VALLIER, L., HANNAN, N., HALE, C., PICKARD, D., MUKHOPADHYAY, S. & DOUGAN, G. 2015. Interaction of Salmonella enterica Serovar Typhimurium with Intestinal Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Infect Immun*, 83, 2926-34.
- FRITSCHLE, K. 2016. *Die Regulierung des Galaktitol-Abbaus in Salmonella Typhimurium*. Technische Universität München.
- FRYMIER, J. S., REED, T. D., FLETCHER, S. A. & CSONKA, L. N. 1997. Characterization of transcriptional regulation of the kdp operon of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol*, 179, 3061-3.
- FUCHS, T. M., EISENREICH, W., HEESEMANN, J. & GOEBEL, W. 2012. Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiol Rev*, 36, 435-62.
- GAFFKY, G. T. A. 1884. Zur Aetiologie des Abdominaltyphus. *Mitt. a. d. Kaiserl. Ges. Amte*, 2, 372-420.
- GALAN, J. E. 2001. Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 53-86.
- GALAN, J. E. & CURTISS, R., 3RD 1991. Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: invA mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun*, 59, 2901-8.
- GALAN, J. E., GINOCCHIO, C. & COSTEAS, P. 1992. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. *J Bacteriol*, 174, 4338-49.
- GARCES, F., FERNANDEZ, F. J., GOMEZ, A. M., PEREZ-LUQUE, R., CAMPOS, E., PROHENS, R., AGUILAR, J., BALDOMA, L., COLL, M., BADIA, J. & VEGA, M. C. 2008. Quaternary structural transitions in the DeoR-type repressor UlaR control transcriptional readout from the L-ascorbate utilization regulon in Escherichia coli. *Biochemistry*, 47, 11424-33.
- GEERSE, R. H., IZZO, F. & POSTMA, P. W. 1989. The PEP: fructose phosphotransferase system in Salmonella typhimurium: FPr combines enzyme III Fru and pseudo-HPr activities. *Mol Gen Genet*, 216, 517-25.
- GIRAUD, A., MATIC, I., TENAILLON, O., CLARA, A., RADMAN, M., FONS, M. & TADDEI, F. 2001. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, 291, 2606-8.
- GÖKMEN, V. & SENYUVA, H. Z. 2006. A simplified approach for the kinetic characterization of acrylamide formation in fructose-asparagine model system. *Food Addit Contam*, 23, 348-54.
- GORE, A. L. & PAYNE, S. M. 2010. CsrA and Cra influence Shigella flexneri pathogenesis. *Infect Immun*, 78, 4674-82.
- GÖRKE, B. & STULKE, J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*, 6, 613-24.

- GOULD, L. H., WALSH, K. A., VIEIRA, A. R., HERMAN, K., WILLIAMS, I. T., HALL, A. J., COLE, D., CENTERS FOR DISEASE, C. & PREVENTION 2013. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1998-2008. *MMWR Surveill Summ*, 62, 1-34.
- GREENHALGH, K., MEYER, K. M., AAGAARD, K. M. & WILMES, P. 2016. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environ Microbiol*, 18, 2103-16.
- GUARNER, F. & MALAGELADA, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-9.
- GUCCIONE, E., HITCHCOCK, A., HALL, S. J., MULHOLLAND, F., SHEARER, N., VAN VLIET, A. H. & KELLY, D. J. 2010. Reduction of fumarate, mesaconate and crotonate by Mfr, a novel oxygen-regulated periplasmic reductase in *Campylobacter jejuni*. *Environ Microbiol*, 12, 576-91.
- GUTNICK, D., CALVO, J. M., KLOPOTOWSKI, T. & AMES, B. N. 1969. Compounds which serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT-2. *J Bacteriol*, 100, 215-9.
- HABERMEHL, G. 2008. *Naturstoffchemie: eine Einführung*, Springer Verlag.
- HAHN, E., WILD, P., HERMANN, U., SEBBEL, P., GLOCKSHUBER, R., HANER, M., TASCHNER, N., BURKHARD, P., AEBI, U. & MULLER, S. A. 2002. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol*, 323, 845-57.
- HANSSON, G. C. 2012. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol*, 15, 57-62.
- HAPFELMEIER, S. & HARDT, W. D. 2005. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol*, 13, 497-503.
- HAPFELMEIER, S., STECHER, B., BARTHEL, M., KREMER, M., MULLER, A. J., HEIKENWALDER, M., STALLMACH, T., HENSEL, M., PFEFFER, K., AKIRA, S. & HARDT, W. D. 2005. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol*, 174, 1675-85.
- HARVEY, P. C., WATSON, M., HULME, S., JONES, M. A., LOVELL, M., BERCHIERI, A., JR., YOUNG, J., BUMSTEAD, N. & BARROW, P. 2011. *Salmonella enterica* serovar typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. *Infect Immun*, 79, 4105-21.
- HAUTEFORT, I., THOMPSON, A., ERIKSSON-YGBERG, S., PARKER, M. L., LUCCHINI, S., DANINO, V., BONGAERTS, R. J., AHMAD, N., RHEN, M. & HINTON, J. C. 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, 958-84.
- HAVELAAR, A. H., KIRK, M. D., TORGERSON, P. R., GIBB, H. J., HALD, T., LAKE, R. J., PRAET, N., BELLINGER, D. C., DE SILVA, N. R., GARGOURI, N., SPEYBROECK, N., CAWTHORNE, A., MATHERS, C., STEIN, C., ANGULO, F. J. & DEVLEESSCHAUWER, B. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med*, 12, e1001923.
- HAYWARD, M. R., ABUOUN, M., LA RAGIONE, R. M., TCHORZEWSKA, M. A., COOLEY, W. A., EVEREST, D. J., PETROVSKA, L., JANSEN, V. A. & WOODWARD, M. J. 2014. SPI-23 of *S. Derby*: role in adherence and invasion of porcine tissues. *PLoS One*, 9, e107857.
- HENSEL, M. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, 36, 1015-23.
- HENSEL, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294, 95-102.
- HENSEL, M., HINSLEY, A. P., NIKOLAUS, T., SAWERS, G. & BERKS, B. C. 1999a. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 32, 275-87.
- HENSEL, M., NIKOLAUS, T. & EGELSEER, C. 1999b. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, 31, 489-98.
- HEROVEN, A. K., SEST, M., PISANO, F., SCHEB-WETZEL, M., STEINMANN, R., BOHME, K., KLEIN, J., MUNCH, R., SCHOMBURG, D. & DERSCH, P. 2012. Crp induces switching of the CsrB and CsrC RNAs in *Yersinia pseudotuberculosis* and links nutritional status to virulence. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 158.

- HERRERO, A., MENDOZA, M. C., RODICIO, R. & RODICIO, M. R. 2008. Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 4514-7.
- HOFREUTER, D., NOVIK, V. & GALAN, J. E. 2008. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe*, 4, 425-33.
- HORMANNSPERGER, G., CLAVEL, T. & HALLER, D. 2012. Gut matters: microbe-host interactions in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 1452-9.
- HUMAN_MICROBIOME_PROJECT_CONSORTIUM 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-14.
- HUURRE, A., KALLIOMAKI, M., RAUTAVA, S., RINNE, M., SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. 2008. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*, 93, 236-40.
- ISHIHAMA, A., SHIMADA, T. & YAMAZAKI, Y. 2016. Transcription profile of *Escherichia coli*: genomic SELEX search for regulatory targets of transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 44, 2058-74.
- JOFRE, M. R., RODRIGUEZ, L. M., VILLAGRA, N. A., HIDALGO, A. A., MORA, G. C. & FUENTES, J. A. 2014. RpoS integrates CRP, Fis, and PhoP signaling pathways to control *Salmonella* Typhi hlyE expression. *BMC Microbiol*, 14, 139.
- JOHANSSON, M. E., GUSTAFSSON, J. K., HOLMEN-LARSSON, J., JABBAR, K. S., XIA, L., XU, H., GHISHAN, F. K., CARVALHO, F. A., GEWIRTZ, A. T., SJOVALL, H. & HANSSON, G. C. 2014. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63, 281-91.
- JOHANSSON, M. E., JAKOBSSON, H. E., HOLMEN-LARSSON, J., SCHUTTE, A., ERMUND, A., RODRIGUEZ-PINEIRO, A. M., ARIKE, L., WISING, C., SVENSSON, F., BACKHED, F. & HANSSON, G. C. 2015. Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe*, 18, 582-92.
- JOLY, N., ENGL, C., JOVANOVIC, G., HUVET, M., TONI, T., SHENG, X., STUMPF, M. P. & BUCK, M. 2010. Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS Microbiol Rev*, 34, 797-827.
- JONES, S. A., GIBSON, T., MALTBY, R. C., CHOWDHURY, F. Z., STEWART, V., COHEN, P. S. & CONWAY, T. 2011. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun*, 79, 4218-26.
- JUMPERTZ, R., LE, D. S., TURNBAUGH, P. J., TRINIDAD, C., BOGARDUS, C., GORDON, J. I. & KRAKOFF, J. 2011. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, 94, 58-65.
- KAISER, P., DIARD, M., STECHER, B. & HARDT, W. D. 2012. The streptomycin mouse model for *Salmonella* diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's mucosal immune response. *Immunity*, 36, 56-66.
- KAMADA, N., CHEN, G. Y., INOHARA, N. & NUNEZ, G. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*, 14, 685-90.
- KHAN, C. M. 2014. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *Int Sch Res Notices*, 2014, 846049.
- KHAN, M. I., SOOFI, S. B., OCHIAI, R. L., KHAN, M. J., SAHITO, S. M., HABIB, M. A., PURI, M. K., VON SEIDLEIN, L., PARK, J. K., YOU, Y. A., ALI, M., NIZAMI, S. Q., ACOSTA, C. J., SACK, R. B., CLEMENS, J. D. & BHUTTA, Z. A. 2012. Epidemiology, clinical presentation, and patterns of drug resistance of *Salmonella* Typhi in Karachi, Pakistan. *J Infect Dev Ctries*, 6, 704-14.
- KIM, P. 2004. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 243-9.
- KING, N. D. & O'BRIAN, M. R. 2001. Evidence for direct interaction between enzyme I(Ntr) and aspartokinase to regulate bacterial oligopeptide transport. *J Biol Chem*, 276, 21311-6.
- KISS, T., MORGAN, E. & NAGY, G. 2007. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett*, 275, 153-9.
- KLUMPP, J. & FUCHS, T. M. 2007. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology*, 153, 1207-20.

- KNODLER, L. A., CELLI, J., HARDT, W. D., VALLANCE, B. A., YIP, C. & FINLAY, B. B. 2002. Salmonella effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol*, 43, 1089-103.
- KOCH, R. 1881. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. In: MEDIZIN, J. S. K. (ed.). Robert Koch-Institut.
- KOLB, A., BUSBY, S., BUC, H., GARGES, S. & ADHYA, S. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem*, 62, 749-95.
- KOO, B. M., YOON, M. J., LEE, C. R., NAM, T. W., CHOE, Y. J., JAFFE, H., PETERKOFISKY, A. & SEOK, Y. J. 2004. A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 279, 31613-21.
- KOROPATKIN, N. M., CAMERON, E. A. & MARTENS, E. C. 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 10, 323-35.
- KOSEK, M., BERN, C. & GUERRANT, R. L. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*, 81, 197-204.
- KRÄUTLER, B. 2005. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem Soc Trans*, 33, 806-10.
- KRÖGER, C., COLGAN, A., SRIKUMAR, S., HANDLER, K., SIVASANKARAN, S. K., HAMMARLOF, D. L., CANALS, R., GRISSOM, J. E., CONWAY, T., HOKAMP, K. & HINTON, J. C. 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe*, 14, 683-95.
- KRÖGER, C. & FUCHS, T. M. 2009. Characterization of the myo-inositol utilization island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 191, 545-54.
- KRUH, J., TICHONICKY, L. & DEFER, N. Effect of butyrate on gene expression. FALK SYMPOSIUM, 1994. KLUWER ACADEMIC PUBLICATION, 135-135.
- KUNDIG, W., GHOSH, S. & ROSEMAN, S. 1964. Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52, 1067-74.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAGKOUVARDOS, I., FISCHER, S., KUMAR, N. & CLAVEL, T. 2017. Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*.
- LAGKOUVARDOS, I., JOSEPH, D., KAPFHAMMER, M., GIRITLI, S., HORN, M., HALLER, D. & CLAVEL, T. 2016. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci Rep*, 6, 33721.
- LAGKOUVARDOS, I., KLARING, K., HEINZMANN, S. S., PLATZ, S., SCHOLZ, B., ENGEL, K. H., SCHMITT-KOPPLIN, P., HALLER, D., ROHN, S., SKURK, T. & CLAVEL, T. 2015. Gut metabolites and bacterial community networks during a pilot intervention study with flaxseeds in healthy adult men. *Mol Nutr Food Res*, 59, 1614-28.
- LANGDON, A., CROOK, N. & DANTAS, G. 2016. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med*, 8, 39.
- LARSEN, N., VOGENSEN, F. K., VAN DEN BERG, F. W., NIELSEN, D. S., ANDREASEN, A. S., PEDERSEN, B. K., AL-SOUD, W. A., SORENSEN, S. J., HANSEN, L. H. & JAKOBSEN, M. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 5, e9085.
- LATHEM, W. W., SCHROEDER, J. A., BELLOWES, L. E., RITZERT, J. T., KOO, J. T., PRICE, P. A., CAULFIELD, A. J. & GOLDMAN, W. E. 2014. Posttranscriptional regulation of the *Yersinia pestis* cyclic AMP receptor protein Crp and impact on virulence. *MBio*, 5, e01038-13.
- LAWSON, C. L., SWIGON, D., MURAKAMI, K. S., DARST, S. A., BERMAN, H. M. & EBRIGHT, R. H. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol*, 14, 10-20.
- LAYTON, A. N. & GALYOV, E. E. 2007. Salmonella-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*, 9, 1-17.
- LEE, Y. H., KIM, S., HELMANN, J. D., KIM, B. H. & PARK, Y. K. 2013. RaoN, a small RNA encoded within *Salmonella* pathogenicity island-11, confers resistance to macrophage-induced stress. *Microbiology*, 159, 1366-78.

- LENGELER, J. 1975a. Mutations affecting transport of the hexitols D-mannitol, D-glucitol, and galactitol in *Escherichia coli* K-12: isolation and mapping. *J Bacteriol*, 124, 26-38.
- LENGELER, J. 1975b. Nature and properties of hexitol transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 124, 39-47.
- LENGELER, J. 1977. Analysis of mutations affecting the dissimilation of galactitol (dulcitol) in *Escherichia coli* K 12. *Mol Gen Genet*, 152, 83-91.
- LEVIN, G. V. 2002. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *J Med Food*, 5, 23-36.
- LEVIN, G. V., ZEHNER, L. R., SAUNDERS, J. P. & BEADLE, J. R. 1995. Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics, and potential health benefits. *Am J Clin Nutr*, 62, 1161S-1168S.
- LEVY, G. N. & AMINOFF, D. 1980. Purification and properties of alpha-N-acetylgalactosaminidase from *Clostridium perfringens*. *J Biol Chem*, 255, 11737-42.
- LEWIS, D. H. 1984. *Storage Carbohydrates in Vascular Plants: Distribution, Physiology and Metabolism*, Cambridge University Press.
- LEY, R. E., BACKHED, F., TURNBAUGH, P., LOZUPONE, C. A., KNIGHT, R. D. & GORDON, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11070-5.
- LICHTMAN, J. S., FERREYRA, J. A., NG, K. M., SMITS, S. A., SONNENBURG, J. L. & ELIAS, J. E. 2016. Host-Microbiota Interactions in the Pathogenesis of Antibiotic-Associated Diseases. *Cell Rep*, 14, 1049-61.
- LIU, Z., CHEN, Z., GUO, H., HE, D., ZHAO, H., WANG, Z., ZHANG, W., LIAO, L., ZHANG, C. & NI, L. 2016. The modulatory effect of infusions of green tea, oolong tea, and black tea on gut microbiota in high-fat-induced obese mice. *Food Funct*.
- LOETSCHER, Y., WIESER, A., LENGEFELD, J., KAISER, P., SCHUBERT, S., HEIKENWALDER, M., HARDT, W. D. & STECHER, B. 2012. Salmonella transiently reside in luminal neutrophils in the inflamed gut. *PLoS One*, 7, e34812.
- LOPEZ-GARRIDO, J., PUERTA-FERNANDEZ, E., COTA, I. & CASADESUS, J. 2015. Virulence Gene Regulation by l-Arabinose in *Salmonella enterica*. *Genetics*, 200, 807-19.
- LU, Y., LEVIN, G. V. & DONNER, T. W. 2008. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. *Diabetes Obes Metab*, 10, 109-34.
- LUCKEY, T. D. 1972. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr*, 25, 1292-4.
- MAIER, L., VYAS, R., CORDOVA, C. D., LINDSAY, H., SCHMIDT, T. S., BRUGIROUX, S., PERIASWAMY, B., BAUER, R., STURM, A., SCHREIBER, F., VON MERING, C., ROBINSON, M. D., STECHER, B. & HARDT, W. D. 2013. Microbiota-derived hydrogen fuels *Salmonella typhimurium* invasion of the gut ecosystem. *Cell Host Microbe*, 14, 641-51.
- MAJOWICZ, S. E., MUSTO, J., SCALLAN, E., ANGULO, F. J., KIRK, M., O'BRIEN, S. J., JONES, T. F., FAZIL, A. & HOEKSTRA, R. M. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, 50, 882-9.
- MALOY, S. 1990. *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*, Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- MARINELI, F., TSOUICALAS, G., KARAMANOU, M. & ANDROUTSOS, G. 2013. Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever. *Ann Gastroenterol*, 26, 132-134.
- MARTENS, J. H., BARG, H., WARREN, M. J. & JAHN, D. 2002. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 275-85.
- MARTINEZ-JEHANNE, V., DU MERLE, L., BERNIER-FEBREAU, C., USEIN, C., GASSAMA-SOW, A., WANE, A. A., GOUALI, M., DAMIAN, M., AIDARA-KANE, A., GERMANI, Y., FONTANET, A., CODDEVILLE, B., GUERARDEL, Y. & LE BOUGUENEC, C. 2009. Role of deoxyribose catabolism in colonization of the murine intestine by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*, 77, 1442-50.
- MASTROENI, P. & GRANT, A. J. 2011. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Rev Mol Med*, 13, e12.
- MAZMANIAN, S. K., LIU, C. H., TZIANABOS, A. O. & KASPER, D. L. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 107-18.
- MAZURKIEWICZ, P., THOMAS, J., THOMPSON, J. A., LIU, M., ARBIBE, L., SANSONETTI, P. & HOLDEN, D. W. 2008. SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol*, 67, 1371-83.

- MCCLELLAND, M., SANDERSON, K. E., SPIETH, J., CLIFTON, S. W., LATREILLE, P., COURTNEY, L., PORWOLLIK, S., ALI, J., DANTE, M., DU, F., HOU, S., LAYMAN, D., LEONARD, S., NGUYEN, C., SCOTT, K., HOLMES, A., GREWAL, N., MULVANEY, E., RYAN, E., SUN, H., FLOREA, L., MILLER, W., STONEKING, T., NHAN, M., WATERSTON, R. & WILSON, R. K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413, 852-6.
- MCDONALD, N. D., LUBIN, J. B., CHOWDHURY, N. & BOYD, E. F. 2016. Host-Derived Sialic Acids Are an Important Nutrient Source Required for Optimal Bacterial Fitness In Vivo. *MBio*, 7, e02237-15.
- MCKENNEY, P. T. & PAMER, E. G. 2015. From Hype to Hope: The Gut Microbiota in Enteric Infectious Disease. *Cell*, 163, 1326-32.
- MEI, W., WANG, L., ZANG, Y., ZHENG, Z. & OUYANG, J. 2016. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus coagulans* NLO1 and its application for D-tagatose production. *BMC Biotechnol*, 16, 55.
- MENDOZA, M. R., OLANO, A. & VILLAMIEL, M. 2005. Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. *J Agric Food Chem*, 53, 2995-9.
- MILLER, M. A., SENTZ, J., RABAA, M. A. & MINTZ, E. D. 2008. Global epidemiology of infections due to *Shigella*, *Salmonella* serotype Typhi, and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect*, 136, 433-5.
- MILLS, D. M., BAJAJ, V. & LEE, C. A. 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol*, 15, 749-59.
- MOK, W. W., ORMAN, M. A. & BRYNILDSEN, M. P. 2015. Impacts of global transcriptional regulators on persister metabolism. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 2713-9.
- MORGAN, E., BOWEN, A. J., CARNELL, S. C., WALLIS, T. S. & STEVENS, M. P. 2007. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun*, 75, 1524-33.
- MORGAN, E., CAMPBELL, J. D., ROWE, S. C., BISPHAM, J., STEVENS, M. P., BOWEN, A. J., BARROW, P. A., MASKELL, D. J. & WALLIS, T. S. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, 54, 994-1010.
- MÜHLHARDT, C. 2009. *Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- MUNERA, D., HULTGREN, S. & FERNANDEZ, L. A. 2007. Recognition of the N-terminal lectin domain of FimH adhesin by the usher FimD is required for type 1 pilus biogenesis. *Mol Microbiol*, 64, 333-46.
- MURRAY, P. R. & MICROBIOLOGY, A. S. F. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington, DC, ASM Press.
- NEDIALKOVA, L. P., DENZLER, R., KOEPEL, M. B., DIEHL, M., RING, D., WILLE, T., GERLACH, R. G. & STECHER, B. 2014. Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of *Salmonella* serovar Typhimurium and *E. coli* in enterobacterial blooms. *PLoS Pathog*, 10, e1003844.
- NEUMAN, M. G. & NANAU, R. M. 2012. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res*, 160, 29-44.
- NG, K. M., FERREYRA, J. A., HIGGINBOTTOM, S. K., LYNCH, J. B., KASHYAP, P. C., GOPINATH, S., NAIDU, N., CHOUDHURY, B., WEIMER, B. C., MONACK, D. M. & SONNENBURG, J. L. 2013. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*, 502, 96-9.
- NICHOLSON, J. K., HOLMES, E., KINROSS, J., BURCELIN, R., GIBSON, G., JIA, W. & PETERSSON, S. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336, 1262-7.
- NICKERSON, K. P., HOMER, C. R., KESSLER, S. P., DIXON, L. J., KABI, A., GORDON, I. O., JOHNSON, E. E., DE LA MOTTE, C. A. & MCDONALD, C. 2014. The dietary polysaccharide maltodextrin promotes salmonella survival and mucosal colonization in mice. *PLoS One*, 9, e101789.
- NICKLAS, W., BANEUX, P., BOOT, R., DECELLE, T., DEENY, A. A., FUMANELLI, M., ILLGEN-WILCKE, B. & FELASA 2002. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 36, 20-42.

- NIELSEN, M. J., RASMUSSEN, M. R., ANDERSEN, C. B., NEXO, E. & MOESTRUP, S. K. 2012. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9, 345-54.
- NOBELMANN, B. & LENGELER, J. W. 1995. Sequence of the gat operon for galactitol utilization from a wild-type strain EC3132 of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta*, 1262, 69-72.
- NOBELMANN, B. & LENGELER, J. W. 1996. Molecular analysis of the gat genes from Escherichia coli and of their roles in galactitol transport and metabolism. *J Bacteriol*, 178, 6790-5.
- NOLAN, K. J., MCGEE, D. J., MITCHELL, H. M., KOLESNIKOW, T., HARRO, J. M., O'ROURKE, J., WILSON, J. E., DANON, S. J., MOSS, N. D., MOBLEY, H. L. & LEE, A. 2002. In vivo behavior of a Helicobacter pylori SS1 nixA mutant with reduced urease activity. *Infect Immun*, 70, 685-91.
- NOVERR, M. C. & HUFFNAGLE, G. B. 2005. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*, 35, 1511-20.
- NOWITZKI-GRIMM, S., BIESALSKI, H. K. & GRIMM, P. 2015. *Taschenatlas Ernährung*, Thieme.
- NUSS, A. M., HEROVEN, A. K., WALDMANN, B., REINKENSMEIER, J., JAREK, M., BECKSTETTE, M. & DERSCH, P. 2015. Transcriptomic profiling of Yersinia pseudotuberculosis reveals reprogramming of the Crp regulon by temperature and uncovers Crp as a master regulator of small RNAs. *PLoS Genet*, 11, e1005087.
- O'BRIEN, S. J. 2013. The "decline and fall" of nontyphoidal salmonella in the United kingdom. *Clin Infect Dis*, 56, 705-10.
- OHTANI, N., YOSHIMOTO, S. & HARA, E. 2014. Obesity and cancer: a gut microbial connection. *Cancer Res*, 74, 1885-9.
- OLD, D. C. 1972. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. *J Gen Microbiol*, 71, 149-57.
- PACHECO, A. R., CURTIS, M. M., RITCHIE, J. M., MUNERA, D., WALDOR, M. K., MOREIRA, C. G. & SPERANDIO, V. 2012. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature*, 492, 113-7.
- PARKAR, S. G., ROSENDALE, D., PATURI, G., HERATH, T. D., STOKLOSINSKI, H., PHIPPS, J. E., HEDDERLEY, D. & ANSELL, J. 2012. In vitro utilization of gold and green kiwifruit oligosaccharides by human gut microbial populations. *Plant Foods Hum Nutr*, 67, 200-7.
- PARKHILL, J., DOUGAN, G., JAMES, K. D., THOMSON, N. R., PICKARD, D., WAIN, J., CHURCHER, C., MUNGALL, K. L., BENTLEY, S. D., HOLDEN, M. T., SEBAIHA, M., BAKER, S., BASHAM, D., BROOKS, K., CHILLINGWORTH, T., CONNERTON, P., CRONIN, A., DAVIS, P., DAVIES, R. M., DOWD, L., WHITE, N., FARRAR, J., FELTWELL, T., HAMLIN, N., HAQUE, A., HIEN, T. T., HOLROYD, S., JAGELS, K., KROGH, A., LARSEN, T. S., LEATHER, S., MOULE, S., O'GAORA, P., PARRY, C., QUAIL, M., RUTHERFORD, K., SIMMONDS, M., SKELTON, J., STEVENS, K., WHITEHEAD, S. & BARRELL, B. G. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. *Nature*, 413, 848-52.
- PENDERS, J., THIJIS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P. A. & STOBBERINGH, E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118, 511-21.
- PEREZ-RUEDA, E. & COLLADO-VIDES, J. 2000. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res*, 28, 1838-47.
- PEREZ-RUEDA, E., GRALLA, J. D. & COLLADO-VIDES, J. 1998. Genomic position analyses and the transcription machinery. *J Mol Biol*, 275, 165-70.
- PETTY, N. K., FELTWELL, T., PICKARD, D., CLARE, S., TORIBIO, A. L., FOOKES, M., ROBERTS, K., MONSON, R., NAIR, S., KINGSLEY, R. A., BULGIN, R., WILES, S., GOULDING, D., KEANE, T., CORTON, C., LENNARD, N., HARRIS, D., WILLEY, D., RANCE, R., YU, L., CHOUDHARY, J. S., CHURCHER, C., QUAIL, M. A., PARKHILL, J., FRANKEL, G., DOUGAN, G., SALMOND, G. P. & THOMSON, N. R. 2011. *Citrobacter rodentium* is an unstable pathogen showing evidence of significant genomic flux. *PLoS Pathog*, 7, e1002018.
- PEZOA, D., BLONDEL, C. J., SILVA, C. A., YANG, H. J., ANDREWS-POLYMENIS, H., SANTIVIAGO, C. A. & CONTRERAS, I. 2014. Only one of the two type VI secretion systems encoded in the

- Salmonella enterica serotype Dublin genome is involved in colonization of the avian and murine hosts. *Vet Res*, 45, 2.
- PICKARD, D., WAIN, J., BAKER, S., LINE, A., CHOCHAN, S., FOOKES, M., BARRON, A., GAORA, P. O., CHABALGOITY, J. A., THANKY, N., SCHOLLES, C., THOMSON, N., QUAIL, M., PARKHILL, J. & DOUGAN, G. 2003. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding Salmonella enterica pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol*, 185, 5055-65.
- PONCET, S., MILOHANIC, E., MAZE, A., NAIT ABDALLAH, J., AKE, F., LARRIBE, M., DEGHMANE, A. E., TAHA, M. K., DOZOT, M., DE BOLLE, X., LETESSON, J. J. & DEUTSCHER, J. 2009. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol*, 16, 88-102.
- POSTMA, P. W., LENGELER, J. W. & JACOBSON, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57, 543-94.
- POWELL, B. S., COURT, D. L., INADA, T., NAKAMURA, Y., MICHOTEY, V., CUI, X., REIZER, A., SAIER, M. H., JR. & REIZER, J. 1995. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of Escherichia coli. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J Biol Chem*, 270, 4822-39.
- PRICE-CARTER, M., TINGEY, J., BOBIK, T. A. & ROTH, J. R. 2001. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of Salmonella enterica serovar typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J Bacteriol*, 183, 2463-75.
- PRIES, A., PRIEFERT, H., KRUGER, N. & STEINBUCHER, A. 1991. Identification and characterization of two Alcaligenes eutrophus gene loci relevant to the poly(beta-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to ptsH and ptsI of Escherichia coli. *J Bacteriol*, 173, 5843-53.
- PRONK, L. M. & SANDERSON, K. E. 2001. Intervening sequences in rrl genes and fragmentation of 23S rRNA in genera of the family Enterobacteriaceae. *J Bacteriol*, 183, 5782-7.
- PROUTY, A. M., BRODSKY, I. E., FALKOW, S. & GUNN, J. S. 2004a. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in Salmonella typhimurium. *Microbiology*, 150, 775-83.
- PROUTY, A. M., BRODSKY, I. E., MANOS, J., BELAS, R., FALKOW, S. & GUNN, J. S. 2004b. Transcriptional regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 41, 177-85.
- QIN, J., LI, Y., CAI, Z., LI, S., ZHU, J., ZHANG, F., LIANG, S., ZHANG, W., GUAN, Y., SHEN, D., PENG, Y., ZHANG, D., JIE, Z., WU, W., QIN, Y., XUE, W., LI, J., HAN, L., LU, D., WU, P., DAI, Y., SUN, X., LI, Z., TANG, A., ZHONG, S., LI, X., CHEN, W., XU, R., WANG, M., FENG, Q., GONG, M., YU, J., ZHANG, Y., ZHANG, M., HANSEN, T., SANCHEZ, G., RAES, J., FALONY, G., OKUDA, S., ALMEIDA, M., LECHATLIER, E., RENAULT, P., PONS, N., BATTO, J. M., ZHANG, Z., CHEN, H., YANG, R., ZHENG, W., YANG, H., WANG, J., EHRLICH, S. D., NIELSEN, R., PEDERSEN, O. & KRISTIANSEN, K. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490, 55-60.
- QUE, F., WU, S. & HUANG, R. 2013. Salmonella Pathogenicity Island 1(SPI-1) at Work. *Curr Microbiol*.
- QUE, J. U. & HENTGES, D. J. 1985. Effect of streptomycin administration on colonization resistance to Salmonella typhimurium in mice. *Infect Immun*, 48, 169-74.
- RAFFATELLU, M. & BÄUMLER, A. J. 2010. Salmonella's iron armor for battling the host and its microbiota. *Gut Microbes*, 1, 70-72.
- RAMPELLI, S., SCHNORR, S. L., CONSOLANDI, C., TURRONI, S., SEVERGNINI, M., PEANO, C., BRIGIDI, P., CRITTENDEN, A. N., HENRY, A. G. & CANDELA, M. 2015. Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Curr Biol*, 25, 1682-93.
- RAUSCH, P., BASIC, M., BATRA, A., BISCHOFF, S. C., BLAUT, M., CLAVEL, T., GLASNER, J., GOPALAKRISHNAN, S., GRASSL, G. A., GUNTHER, C., HALLER, D., HIROSE, M., IBRAHIM, S., LOH, G., MATTNER, J., NAGEL, S., PABST, O., SCHMIDT, F., SIEGMUND, B., STROWIG, T., VOLYNETS, V., WIRTZ, S., ZEISSIG, S., ZEISSIG, Y., BLEICH, A. & BAINES, J. F. 2016. Analysis of factors contributing to variation in the C57BL/6J fecal microbiota across German animal facilities. *Int J Med Microbiol*, 306, 343-55.

- RAVUSSIN, Y., KOREN, O., SPOR, A., LEDUC, C., GUTMAN, R., STOMBAUGH, J., KNIGHT, R., LEY, R. E. & LEIBEL, R. L. 2012. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity (Silver Spring)*, 20, 738-47.
- RAY, W. K. & LARSON, T. J. 2004. Application of AgaR repressor and dominant repressor variants for verification of a gene cluster involved in N-acetylgalactosamine metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 51, 813-26.
- RETAMAL, P., CASTILLO-RUIZ, M. & MORA, G. C. 2009. Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *PLoS One*, 4, e5551.
- REZNIKOFF, W. S. 1992. Catabolite gene activator protein activation of lac transcription. *J Bacteriol*, 174, 655-8.
- RICHARDSON, E. J., LIMAYE, B., INAMDAR, H., DATTA, A., MANJARI, K. S., PULLINGER, G. D., THOMSON, N. R., JOSHI, R. R., WATSON, M. & STEVENS, M. P. 2011. Genome sequences of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, Choleraesuis, Dublin, and Gallinarum strains of well-defined virulence in food-producing animals. *J Bacteriol*, 193, 3162-3.
- ROBBE, C., CAPON, C., CODDEVILLE, B. & MICHALSKI, J. C. 2004. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem J*, 384, 307-16.
- ROBERTSON, B. R., O'ROURKE, J. L., NEILAN, B. A., VANDAMME, P., ON, S. L., FOX, J. G. & LEE, A. 2005. *Mucispirillum schaedleri* gen. nov., sp. nov., a spiral-shaped bacterium colonizing the mucus layer of the gastrointestinal tract of laboratory rodents. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 1199-204.
- ROTGER, R. & CASADESUS, J. 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol*, 2, 177-84.
- 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. *Mol Microbiol*, 94, 700-12.
- RYCHLIK, I. & BARROW, P. A. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 1021-40.
- SAIER, M. H., HVORUP, R. N. & BARABOTE, R. D. 2005. Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators. *Biochem Soc Trans*, 33, 220-4.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor.
- SANA, T. G., FLAUGNATTI, N., LUGO, K. A., LAM, L. H., JACOBSON, A., BAYLOT, V., DURAND, E., JOURNET, L., CASCALES, E. & MONACK, D. M. 2016. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E5044-51.
- SANTOS, R. L., RAFFATELLU, M., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., TUKEL, C., TSOLIS, R. M. & BÄUMLER, A. J. 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol*, 17, 498-506.
- SAROJ, S. D., SHASHIDHAR, R., KARANI, M. & BANDEKAR, J. R. 2008. Distribution of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of *Salmonella*. *J Med Microbiol*, 57, 424-7.
- SCALLAN, E., MAJOWICZ, S. E., HALL, G., BANERJEE, A., BOWMAN, C. L., DALY, L., JONES, T., KIRK, M. D., FITZGERALD, M. & ANGULO, F. J. 2005. Prevalence of diarrhoea in the community in Australia, Canada, Ireland, and the United States. *Int J Epidemiol*, 34, 454-60.
- SCHMIDT, H. & HENSEL, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 17, 14-56.
- SCHNORR, S. L., CANDELA, M., RAMPPELLI, S., CENTANNI, M., CONSOLANDI, C., BASAGLIA, G., TURRONI, S., BIAGI, E., PEANO, C., SEVERGNINI, M., FIORI, J., GOTTI, R., DE BELLIS, G., LUISELLI, D., BRIGIDI, P., MABULLA, A., MARLOWE, F., HENRY, A. G. & CRITTENDEN, A. N. 2014. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun*, 5, 3654.
- SCHULTZ, M. 2008. Theobald Smith. *Emerg Infect Dis*, 14, 1940-1942.
- SCOTT, K. P., GRATZ, S. W., SHERIDAN, P. O., FLINT, H. J. & DUNCAN, S. H. 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res*, 69, 52-60.
- SEKIROV, I., RUSSELL, S. L., ANTUNES, L. C. & FINLAY, B. B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90, 859-904.

- SEKIROV, I., TAM, N. M., JOGOVA, M., ROBERTSON, M. L., LI, Y., LUPP, C. & FINLAY, B. B. 2008. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect Immun*, 76, 4726-36.
- SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*, 14, e1002533.
- SETH-SMITH, H. M. 2008. SPI-7: Salmonella's Vi-encoding Pathogenicity Island. *J Infect Dev Ctries*, 2, 267-71.
- SEVCIK, M., SEBKOVA, A., VOLF, J. & RYCHLIK, I. 2001. Transcription of *arcA* and *rpoS* during growth of *Salmonella typhimurium* under aerobic and microaerobic conditions. *Microbiology*, 147, 701-8.
- SHAH, D. H., LEE, M. J., PARK, J. H., LEE, J. H., EO, S. K., KWON, J. T. & CHAE, J. S. 2005. Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, 151, 3957-68.
- SHAKERI-GARAKANI, A., BRINKKOTTER, A., SCHMID, K., TURGUT, S. & LENGELER, J. W. 2004. The genes and enzymes for the catabolism of galactitol, D-tagatose, and related carbohydrates in *Klebsiella oxytoca* M5a1 and other enteric bacteria display convergent evolution. *Mol Genet Genomics*, 271, 717-28.
- SHEA, J. E., HENSEL, M., GLEESON, C. & HOLDEN, D. W. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2593-7.
- SHIMADA, T., FUJITA, N., YAMAMOTO, K. & ISHIHAMA, A. 2011. Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One*, 6, e20081.
- SHIN, K. C., SIM, D. H., SEO, M. J. & OH, D. K. 2016. Increased Production of Food-Grade d-Tagatose from d-Galactose by Permeabilized and Immobilized Cells of *Corynebacterium glutamicum*, a GRAS Host, Expressing d-Galactose Isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. *J Agric Food Chem*, 64, 8146-8153.
- SIAVOSHIAN, S., SEGAIN, J. P., KORNPORST, M., BONNET, C., CHERBUT, C., GALMICHE, J. P. & BLOTTIERE, H. M. 2000. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*, 46, 507-14.
- SIMON, R., PRIEFER, U. & PÜHLER, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotechnol*.
- SJOGREN, Y. M., JENMALM, M. C., BOTTCHER, M. F., BJORKSTEN, B. & SVERREMARK-EKSTROM, E. 2009. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin Exp Allergy*, 39, 518-26.
- SLEATOR, R. D. & HILL, C. 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 49-71.
- SLEIGH, J. D. & DUGUID, J. P. 1989. *Salmonella*. In: COLLEE, J. G., FRASER, A. G., MARMION, B. P. & SIMMONS, A. (eds.) *Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- SMITH, P. M., HOWITT, M. R., PANIKOV, N., MICHAUD, M., GALLINI, C. A., BOHLOOLY, Y. M., GLICKMAN, J. N. & GARRETT, W. S. 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341, 569-73.
- SONNENBURG, E. D., SMITS, S. A., TIKHONOV, M., HIGGINBOTTOM, S. K., WINGREEN, N. S. & SONNENBURG, J. L. 2016. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529, 212-5.
- SONNENBURG, E. D. & SONNENBURG, J. L. 2014. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab*, 20, 779-86.
- SRIKUMAR, S. & FUCHS, T. M. 2011. Ethanolamine utilization contributes to proliferation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in food and in nematodes. *Appl Environ Microbiol*, 77, 281-90.

- STAIB, L. & FUCHS, T. M. 2014. From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology*, 160, 1020-39.
- STAIB, L. & FUCHS, T. M. 2015. Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Front Microbiol*, 6, 1116.
- STARKE, M., RICHTER, M. & FUCHS, T. M. 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., BARTHEL, M., SCHLUMBERGER, M. C., HABERLI, L., RABSCH, W., KREMER, M. & HARDT, W. D. 2008. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol*, 10, 1166-80.
- STECHER, B., BERRY, D. & LOY, A. 2013a. Colonization resistance and microbial ecophysiology: using gnotobiotic mouse models and single-cell technology to explore the intestinal jungle. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 793-829.
- STECHER, B., CHAFFRON, S., KAPPELI, R., HAPFELMEIER, S., FREDRICH, S., WEBER, T. C., KIRUNDI, J., SUAR, M., MCCOY, K. D., VON MERING, C., MACPHERSON, A. J. & HARDT, W. D. 2010. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog*, 6, e1000711.
- STECHER, B., DENZLER, R., MAIER, L., BERNET, F., SANDERS, M. J., PICKARD, D. J., BARTHEL, M., WESTENDORF, A. M., KROGFELT, K. A., WALKER, A. W., ACKERMANN, M., DOBRINDT, U., THOMSON, N. R. & HARDT, W. D. 2012. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1269-74.
- STECHER, B. & HARDT, W. D. 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol*, 14, 82-91.
- STECHER, B., MACPHERSON, A. J., HAPFELMEIER, S., KREMER, M., STALLMACH, T. & HARDT, W. D. 2005. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun*, 73, 3228-41.
- STECHER, B., MAIER, L. & HARDT, W. D. 2013b. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol*, 11, 277-84.
- STECHER, B., ROBBIANI, R., WALKER, A. W., WESTENDORF, A. M., BARTHEL, M., KREMER, M., CHAFFRON, S., MACPHERSON, A. J., BUER, J., PARKHILL, J., DOUGAN, G., VON MERING, C. & HARDT, W. D. 2007. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5, 2177-89.
- STEEB, B., CLAUDI, B., BURTON, N. A., TIENZ, P., SCHMIDT, A., FARHAN, H., MAZE, A. & BUMANN, D. 2013. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. *PLoS Pathog*, 9, e1003301.
- STELTER, C., KAPPELI, R., KONIG, C., KRAH, A., HARDT, W. D., STECHER, B. & BUMANN, D. 2011. *Salmonella*-induced mucosal lectin RegIIIbeta kills competing gut microbiota. *PLoS One*, 6, e20749.
- STOEBEL, D. M., FREE, A. & DORMAN, C. J. 2008. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology*, 154, 2533-45.
- SU, L. H. & CHIU, C. H. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*, 30, 210-9.
- SUAR, M., JANTSCH, J., HAPFELMEIER, S., KREMER, M., STALLMACH, T., BARROW, P. A. & HARDT, W. D. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infect Immun*, 74, 632-44.
- TEN BRUGGENCATE, S. J., SNEL, J., SCHOTERMAN, M. H., ERTMANN, E., VAN DER MEULEN, E., SCHONEWILLE, A. & BOVEE-ODENHOVEN, I. M. 2011. Efficacy of various dietary calcium salts to improve intestinal resistance to *Salmonella* infection in rats. *Br J Nutr*, 105, 489-95.
- THERIOT, C. M., KOENIGSKNECHT, M. J., CARLSON, P. E., JR., HATTON, G. E., NELSON, A. M., LI, B., HUFFNAGLE, G. B., J, Z. L. & YOUNG, V. B. 2014. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun*, 5, 3114.

- THIENNIMITR, P., WINTER, S. E., WINTER, M. G., XAVIER, M. N., TOLSTIKOV, V., HUSEBY, D. L., STERZENBACH, T., TSOLIS, R. M., ROTH, J. R. & BÄUMLER, A. J. 2011. Intestinal inflammation allows Salmonella to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 17480-5.
- TIGHE, M. K., SAVAGE, R., VRBOVA, L., TOOLAN, M., WHITFIELD, Y., VARGA, C., LEE, B., ALLEN, V., MAKI, A., WALTON, R., JOHNSON, C., DHAR, B., AHMED, R., CROWCROFT, N. S. & MIDDLETON, D. 2012. The epidemiology of travel-related Salmonella Enteritidis in Ontario, Canada, 2010-2011. *BMC Public Health*, 12, 310.
- TINDALL, B. J., GRIMONT, P. A., GARRITY, G. M. & EUZEBY, J. P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 521-4.
- TOLEDO-ARANA, A., DUSSURGET, O., NIKITAS, G., SESTO, N., GUET-REVILLET, H., BALESTRINO, D., LOH, E., GRIPENLAND, J., TIENSUU, T., VAITKEVICIUS, K., BARTHELEMY, M., VERGASSOLA, M., NAHORI, M. A., SOUBIGOU, G., REGNAULT, B., COPPEE, J. Y., LECUIT, M., JOHANSSON, J. & COSSART, P. 2009. The Listeria transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 459, 950-6.
- TOMLIJENOVIC-BERUBE, A. M., HENRIKSBO, B., PORWOLLIK, S., COOPER, C. A., TUINEMA, B. R., MCCLELLAND, M. & COOMBES, B. K. 2013. Mapping and regulation of genes within Salmonella pathogenicity island 12 that contribute to in vivo fitness of Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 81, 2394-404.
- TOPPING, D. L. & CLIFTON, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*, 81, 1031-64.
- TRACY, B. S., EDWARDS, K. K. & EISENSTARK, A. 2002. Carbon and nitrogen substrate utilization by archival Salmonella typhimurium LT2 cells. *BMC Evol Biol*, 2, 14.
- TURNBAUGH, P. J., BACKHED, F., FULTON, L. & GORDON, J. I. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3, 213-23.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. & GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-31.
- TURNBAUGH, P. J., RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 1, 6ra14.
- TURRONI, S., FIORI, J., RAMPPELLI, S., SCHNORR, S. L., CONSOLANDI, C., BARONE, M., BIAGI, E., FANELLI, F., MEZZULLO, M., CRITTENDEN, A. N., HENRY, A. G., BRIGIDI, P. & CANDELA, M. 2016. Fecal metabolome of the Hadza hunter-gatherers: a host-microbiome integrative view. *Sci Rep*, 6, 32826.
- UBEDA, C., BUCCI, V., CABALLERO, S., DJUKOVIC, A., TOUSSAINT, N. C., EQUINDA, M., LIPUMA, L., LING, L., GOBOURNE, A., NO, D., TAUR, Y., JENQ, R. R., VAN DEN BRINK, M. R., XAVIER, J. B. & PAMER, E. G. 2013. Intestinal microbiota containing Barnesiella species cures vancomycin-resistant Enterococcus faecium colonization. *Infect Immun*, 81, 965-73.
- VAISHNAVA, S., YAMAMOTO, M., SEVERSON, K. M., RUHN, K. A., YU, X., KOREN, O., LEY, R., WAKELAND, E. K. & HOOPER, L. V. 2011. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, 334, 255-8.
- VALENTIN-HANSEN, P., HOJRUP, P. & SHORT, S. 1985. The primary structure of the DeoR repressor from Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res*, 13, 5927-36.
- VAN DEN ABEELE, P., BELZER, C., GOOSSENS, M., KLEEREBEZEM, M., DE VOS, W. M., THAS, O., DE WEIRDT, R., KERCKHOF, F. M. & VAN DE WIELE, T. 2013. Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J*, 7, 949-61.
- VAN DER WAAIJ, D., BERGHUIS-DE VRIES, J. M. & LEKKERKERK, L.-V. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)*, 69, 405-11.
- VELASQUEZ, J. C., HIDALGO, A. A., VILLAGRA, N., SANTIVIAGO, C. A., MORA, G. C. & FUENTES, J. A. 2016. SPI-9 of Salmonella enterica serovar Typhi is constituted by an operon positively

- regulated by RpoS and contributes to adherence to epithelial cells in culture. *Microbiology*, 162, 1367-78.
- VERNIKOS, G. S. & PARKHILL, J. 2006. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. *Bioinformatics*, 22, 2196-203.
- VIDENSKA, P., FALDYNOVA, M., JURICOVA, H., BABAK, V., SISAK, F., HAVLICKOVA, H. & RYCHLIK, I. 2013. Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin. *BMC Vet Res*, 9, 30.
- VONHIPPEL, P. H. & WONG, K. Y. 1964. Neutral Salts: The Generality of Their Effects on the Stability of Macromolecular Conformations. *Science*, 145, 577-80.
- WALLRODT, I., JELSBAK, L., THOMSEN, L. E., BRIX, L., LEMIRE, S., GAUTIER, L., NIELSEN, D. S., JOVANOVIC, G., BUCK, M. & OLSEN, J. E. 2014. Removal of the phage-shock protein PspB causes reduction of virulence in Salmonella enterica serovar Typhimurium independently of NRAMP1. *J Med Microbiol*, 63, 788-95.
- WATERMAN, S. R. & SMALL, P. L. 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3882-6.
- WEENING, E. H., BARKER, J. D., LAARAKKER, M. C., HUMPHRIES, A. D., TSOLIS, R. M. & BÄUMLER, A. J. 2005. The Salmonella enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun*, 73, 3358-66.
- WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C. & WIEBE, W. J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6578-83.
- WINKLER, M. E. 1979. Ribosomal ribonucleic acid isolated from Salmonella typhimurium: absence of the intact 23S species. *J Bacteriol*, 139, 842-9.
- WINTER, S. E. & BÄUMLER, A. J. 2011. A breathtaking feat: to compete with the gut microbiota, Salmonella drives its host to provide a respiratory electron acceptor. *Gut Microbes*, 2, 58-60.
- WINTER, S. E., THIENNIMITR, P., WINTER, M. G., BUTLER, B. P., HUSEBY, D. L., CRAWFORD, R. W., RUSSELL, J. M., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., TSOLIS, R. M., ROTH, J. R. & BÄUMLER, A. J. 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. *Nature*, 467, 426-9.
- WLODARSKA, M., WILLING, B., KEENEY, K. M., MENENDEZ, A., BERGSTROM, K. S., GILL, N., RUSSELL, S. L., VALLANCE, B. A. & FINLAY, B. B. 2011. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated Citrobacter rodentium-induced colitis. *Infect Immun*, 79, 1536-45.
- WOLFF, J. B. & KAPLAN, N. O. 1956. Hexitol metabolism in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 71, 557-64.
- WONG, J. M., DE SOUZA, R., KENDALL, C. W., EMAM, A. & JENKINS, D. J. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 40, 235-43.
- WONG, K. K., MCCLELLAND, M., STILLWELL, L. C., SISK, E. C., THURSTON, S. J. & SAFFER, J. D. 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a Salmonella pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of Salmonella enterica serovar typhimurium LT2. *Infect Immun*, 66, 3365-71.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2013. *Salmonella (non-typhoidal)* [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
- WRAY, C. & WRAY, A. 2000. *Salmonella in Domestic Animals*, CABI Pub.
- XU, J., BJURSELL, M. K., HIMROD, J., DENG, S., CARMICHAEL, L. K., CHIANG, H. C., HOOPER, L. V. & GORDON, J. I. 2003. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*, 299, 2074-6.
- YATSUNENKO, T., REY, F. E., MANARY, M. J., TREHAN, I., DOMINGUEZ-BELLO, M. G., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., BALDASSANO, R. N., ANOKHIN, A. P., HEATH, A. C., WARNER, B., REEDER, J., KUCZYNSKI, J., CAPORASO, J. G., LOZUPONE, C. A., LAUBER, C., CLEMENTE, J. C., KNIGHTS, D., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222-7.

- YEBRA, M. J., ZUNIGA, M., BEAUFILS, S., PEREZ-MARTINEZ, G., DEUTSCHER, J. & MONEDERO, V. 2007. Identification of a gene cluster enabling *Lactobacillus casei* BL23 to utilize myo-inositol. *Appl Environ Microbiol*, 73, 3850-8.
- ZHANG, C., ZHANG, M., PANG, X., ZHAO, Y., WANG, L. & ZHAO, L. 2012. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J*, 6, 1848-57.
- ZHANG, H., LUO, Q., GAO, H. & FENG, Y. 2015. A new regulatory mechanism for bacterial lipoic acid synthesis. *Microbiologyopen*.
- ZHENG, D., CONSTANTINIDOU, C., HOBMAN, J. L. & MINCHIN, S. D. 2004. Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res*, 32, 5874-93.
- ZHU, Y., CONG, W., SHEN, L., WEI, H., WANG, Y., WANG, L., RUAN, K., WU, F. & FENG, Y. 2014. Fecal metabonomic study of a polysaccharide, MDG-1 from *Ophiopogon japonicus* on diabetic mice based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC TOF/MS). *Mol Biosyst*, 10, 304-12.

6 Anhang

Tabelle A 1: Übersicht der in der Arbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Adonitol	$C_5H_{12}O_5$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Agar Nr. 1		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Agarose (LE)		BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, Maine, USA
Alizarinengelb G	$C_{13}H_8N_3NaO_5$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Anilinblau	$C_6H_5NH_2$	Merck KGaA, Darmstadt, D
L-(+)-Arabinose	$C_6H_{10}O_5$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
D-(+)-Arabitol	$C_5H_{12}O_5$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Bacillo® AF		BODE Chemie GmbH, Hamburg, D
Borsäure	H_3BO_3	Merck KGaA, Darmstadt, D
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	$C_{15}H_{15}N_2O_4BrClP$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Merck KGaA, Darmstadt, D
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Merck-Rühl
Chloroform	$CHCl_3$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
N,N-Dimethylformamid (DMF)	C_3H_7NO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	$(C_2H_2OHSH)_2$	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Essigsäure (100 %, Eisessig)	CH_3COOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Ethanol	C_2H_6O	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum (FCS)		Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Formaldehyd 37%	CH_2O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
D-(-)-Fructose	$C_6H_{12}O_6$	Merck KGaA, Darmstadt, D
D-(+)-Glucose-Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \times H_2O$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Galactitol (Dulcitol, Galaktit)	$C_6H_{14}O_6$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
D-(+)-Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Gallensalze		Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Glutaraldehyd	$C_5H_8O_2$	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glycerin 99,5% p.a. wasserfrei	$C_3H_8O_3$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Hefeextrakt		Merck KGaA, Darmstadt, D
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
i-Erythritol	$C_4H_{10}O_4$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Imidazol	$C_3H_4N_2$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	$MgCl_2 \times 7 H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, D
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Methanol	CH_3OH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
2-Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Merck KGaA, Darmstadt, D
Milchpulver		Oxoid - Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumcholat (Hydrat)	$C_{24}H_{39}NaO_5 \times H_2O$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

diNatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	NaOH	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
p-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_6$	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
2-Propanol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Rinderserumalbumin (BSA)		GE Healthcare GmbH, Solingen, D
RNA-Stabilisierungs-Reagenz		Qiagen GmbH, Hilden, D
Roti-Quant (5x)		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Salmonellen-Shigella-Agar		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure	HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
SDS (Natrium-Dodecyl-sulfat)	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Sterillium®		BODE Chemie GmbH, Hamburg, D
D-(-)-Tagatose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	$(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Tetrazoliumviolett	$\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClN}_4$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Trichloressigsäure (TCA)	$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Triton X-100		Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Trizol		Invitrogen - Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Trypton (aus Casein)		Oxoid - Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Tween 20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Xylitol	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle A 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte und Verbrauchsmittel

Geräte	Hersteller
AEG Gefrierschrank (-20 °C)	Electrolux Hausgeräte GmbH, Markenvertrieb AEG, Nürnberg, D
Äktapurifizier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D
BD Plastipak™ Spritzen mit BD Luer-Lok™-Ansatz (30 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Bioscreen-Mikrotiterplatte Honey Comb®	Bioscreen C MBR, Helsinki, Finnland
Blotting-Apparatur	Biometra GmbH, Göttingen, D
BRAND®-Präzisions-Dispenser-Tips	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, D
Brutschränke - U30; U50; BE600	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
BS48 Sicherheitswerkbank und Wechselstation	Tecniplast S.p.A, Buguggiate (VA), Italien
Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
DS36 Einstreuabwurfstation	Tecniplast S.p.A, Buguggiate (VA), Italien
Duran®-Laborflaschen (50 ml, 250 ml, 500 ml, 1l)	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, D
Einmalküvetten (1,5 ml halbmikro, PS)	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
Einmal-Reaktionsgefäß (1,5 und 2 ml)	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, D
Elektroporationsgerät Gene Pulser TM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Elektroporationsküvetten 2 mm	Peqlab -Life Science; VWR International GmbH, Darmstadt, D
Falconständer	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Che
FastPrep®-24 Instrument	MP Biomedicals, CA, USA
Feindosierungsspritze Omnifix®-F (0,01 -1 ml)	B. Braun Meslungen AG, Melsungen, D
Fraktionierer-950	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D
French Pressure Cell press	SLM Instruments, Illinois, USA
Gefrierschrank (-80 °C) Heraeus	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Gelelektrophoresesystem (25, 50 und 100 ml Gele)	Peqlab -Life Science; VWR International GmbH, Darmstadt, D
IVC-Käfige	Tecniplast S.p.A, Buguggiate (VA), Italien
Kühlschrank - FKS500-20	Liebherr-International GmbH, Biberach an der Riß, D
Kühlzentrifuge Fresco 17	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Küvettenständer	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
Latex-Handschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt, D
MACS® MultiStand mit MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS® Separation Columns LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS® SmartStrainer Filter (30, 70 100 µm)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Magnetrührer Ikamag Reo	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, D
Mäusehäuschen	Tecniplast S.p.A, Buguggiate (VA), Italien
Mehrfachdispenser	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, D
Micro-Schraubröhren 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

Mikrotiterkamm fü Gele	Peqlab -Life Science; VWR International GmbH, Darmstadt, D
Mikrotiterplatte, weiß (96 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Mikrowelle	Siemens
Mikrozentrifuge - Centrifuge 5415D	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, D
Millex-GP, 0.22 µm Filter, steril	Merck KGaA, Darmstadt, D
NucleoSpin® RNA - RNA Isolierung	Macherey-Nagel, Düren, D
Objektträger für Mikroskope	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Laude Königshofen, D
Ohrzange	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
PCR-Box / -Rack	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
PCR-Gefäß	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
PCR-Gerät - Aviso Primus	AVISO GmbH Mechatronic System, Jena, D
PCR-Gerät - Primus 25	Peqlab -Life Science; VWR International GmbH, Darmstadt, D
PCR-Gerät - UNO II	Biometra GmbH, Göttingen, D
Petrischalen (rund)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Pipetten SL-Pette Premium Autoclavable - 0.1 – 2 µl; 2 – 20 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl	SL-Pette® Süd-Laborbedarf, Gauting, D
Pipettenspitzen (verschiedene Volumina)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pipettierhilfe accu-jet® Pro	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, D
Plattenleser Wallac Victor ³	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, CT, USA
Präparierbesteck	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Rotilabo®-mini-centrifuge	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, D
Schlundsonde (20 Gauge, 30 mm)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Sicherheits-Bunsenbrenner Schütt Gasi Smart Flow	Biovendis Ltd., Mannheim, D
Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply) EPS 500/400	Tecniplast S.p.A, Buguggiate (VA), Italien
Spannungsquelle (Epectrophoresis Power Supply) Consort EV243	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Spectrophotometer 7315 - Jenway	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Stabpipetten (1, 5, 10, 25 und 50 ml)	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, United Kingdom
Stericup-Filter und Steritop-Filter	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe, D
Sterilbank - LaminAir ^R HB2448	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D
Thermoblock TB2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Trinkflaschen	Biometra GmbH, Göttingen, D
UV solo TS Imaging System	Tecniplast S.p.A, Buguggiate (VA), Italien
Vakuumpumpe	Biometra GmbH, Göttingen, D
Vernichtungsbeutel	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D
Vortexer - Vortex-Genie® 2	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen, D
Waage - LC4200	Scientific Industries, New York, USA
	Sartorius AG, Göttingen, D

Wasseraufbereitungssystem (Elix)	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D
Wasseraufbereitungssystem (Milli-Q)	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D
Wipptisch Rocker	Labortechnik Fröbel GmbH, Kempten, D
Xenogen In Vivo Imaging Systems (IVIS)	Xenogen Corporation, Alameda, Kalifornien, USA
Zentrifugationsröhrchen (25 und 50 ml)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe, D
Zentrifuge 3K30	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
<i>Zirconia Beads</i> mit 1 mm Durchmesser	BioSpec, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle A 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Reference
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	<i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$, $\Phi80lacZ$ (<i>del</i>)M15, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara\text{-}leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galk</i> , <i>rpsL</i> (<i>Sm^R</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
DH5 α	F- $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA\text{-}argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rK⁻</i> , <i>mK⁺</i>) <i>phoA supE44</i> $\lambda\text{-} thi\text{-}1$ <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
SM10 $\lambda\text{-}pir$	F-, <i>Km^R</i> , <i>Tra^R</i> , $\lambda thi\text{-}1$, <i>thr\text{-}1</i> , <i>leuB6</i> , <i>recA1</i> , <i>tonA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>supE44</i> , [<i>RP4\text{-}2(Tc::Mu)</i>], (<i>Muc⁺</i>) $\lambda\text{-}$	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
S17.1 $\lambda\text{-}pir$	$\lambda\text{-}pir$ lysogen of S17.1 (<i>Tp^R Sm^R thi pro hsdR\text{-}M⁺ recA RP4::2\text{-}Tc::Mu\text{-}Km::Tn7</i>)	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>Citrobacter rodentium</i>	Wildtyp-Stamm CDC1843-73	Weihenstephaner Sammlung (WSS): WS4383
<i>Salmonella bongori</i>		
NCTC 12419	Wildtyp-Stamm	WSS: WS2872
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	Wildtyp-Stamm	WSS: WS2749
<i>Salmonella enterica</i> serovar Newport	Wildtyp-Stamm	WSS: WS2681
<i>Salmonella enterica</i> serovar 4,[5],12:i-	Wildtyp-Stamm	RKI, Berlin, D
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028	Wildtyp-Stamm	Institut Pasteur, Paris, Frankreich

Salmonella enterica serovar Typhimurium ST4/74

ST4/74 WT	Wildtyp-Stamm	(Richardson <i>et al.</i> , 2011)
Δ STM3782:: <i>kanR</i>	Austausch des Gens STM3782 mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ STM3782	in-frame Deletion des Gens STM3782	diese Arbeit
Δ STM3785:: <i>kanR</i>	Austausch des Gens STM3785 mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ STM3785	in-frame Deletion des Gens STM3785	diese Arbeit
Δ SPI3(III):: <i>kanR</i>	Austausch des Genbereichs SPI3(III) mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ SPI3(III)	in-frame Deletion des Genbereichs SPI3(III)	diese Arbeit
Δ <i>dacB</i> :: <i>kanR</i>	Austausch des Gens <i>dacB</i> mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ <i>dacB</i>	in-frame Deletion des Gens <i>dacB</i>	diese Arbeit
Δ <i>virK</i> :: <i>kanR</i>	Austausch des Gens <i>virK</i> mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ <i>virK</i>	in-frame Deletion des Gens <i>virK</i>	diese Arbeit
Δ <i>gatOp</i> :: <i>kanR</i>	Austausch des Genbereichs <i>gatY - gatR</i> mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ <i>gatOp</i>	in-frame Deletion des Genbereichs <i>gatY - gatR</i>	diese Arbeit
Δ <i>gatR</i> :: <i>kanR</i>	Austausch des Gens <i>gatR</i> mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ <i>gatR</i>	in-frame Deletion des Gens <i>gatR</i>	diese Arbeit
Δ STM3254:: <i>kanR</i>	Austausch des Gens STM3254 mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ STM3254	in-frame Deletion des Gens STM3254	diese Arbeit
Δ STM3255:: <i>kanR</i>	Austausch des Gens STM3255 mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ STM3255	in-frame Deletion des Gens STM3255	diese Arbeit
Δ <i>gatC</i> :: <i>kanR</i>	Austausch des Gens <i>gatC</i> mit <i>kan^R</i>	diese Arbeit
Δ <i>gatC</i>	in-frame Deletion des Gens <i>gatC</i>	diese Arbeit
P_{gatR} :: <i>gfp</i>	chromosomale Fusion von <i>gfp</i> mit dem Promotor P_{gatR} mit Hilfe von pUTs- P_{gatR} :: <i>gfp</i> über homologe Rekombination	diese Arbeit
P_{gatR} :: <i>lux</i>	chromosomale Fusion von <i>luxCDABE</i> mit dem Promotor P_{gatR} mit Hilfe von pUTs- P_{gatR} :: <i>luxCDABE</i> über homologe Rekombination	diese Arbeit
P_{gatY} :: <i>gfp</i>	chromosomale Fusion von <i>gfp</i> mit dem Promotor P_{gatY} mit Hilfe von pUTs- P_{gatY} :: <i>gfp</i> über homologe Rekombination	diese Arbeit
P_{gatY} :: <i>lux</i>	chromosomale Fusion von <i>luxCDABE</i> mit dem Promotor P_{gatY} mit Hilfe von pUTs- P_{gatY} :: <i>luxCDABE</i> über	diese Arbeit

	homologe Rekombination	
$P_{STM3255}::gfp$	chromosomale Fusion von <i>gfp</i> mit dem Promotor $P_{STM3255}$ mit Hilfe von pUTs- $P_{STM3255}::gfp$ über homologe Rekombination	diese Arbeit
$P_{STM3255}::lux$	chromosomale Fusion von <i>luxCDABE</i> mit dem Promotor $P_{STM3255}$ mit Hilfe von pUTs- $P_{STM3255}::luxCDABE$ über homologe Rekombination	diese Arbeit
$P_{gatZ}::gfp$	chromosomale Fusion von <i>gfp</i> mit dem Promotor $P_{STM3257}$ mit Hilfe von pUTs- $P_{gatZ}::gfp$ über homologe Rekombination	diese Arbeit
$P_{gatZ}::lux$	chromosomale Fusion von <i>luxCDABE</i> mit dem Promotor P_{gatZ} mit Hilfe von pUTs- $P_{STM3257}::luxCDABE$ über homologe Rekombination	diese Arbeit
$P_{argS}::gfp$	chromosomale Fusion von <i>gfp</i> mit dem Promotor P_{argS} mit Hilfe von pUTs- $P_{argS}::gfp$ über homologe Rekombination	diese Arbeit
$P_{rpsM}::gfp$	chromosomale Fusion von <i>gfp</i> mit dem Promotor P_{rpsM} mit Hilfe von pUTs- $P_{rpsM}::gfp$ über homologe Rekombination	diese Arbeit
$\Delta araA::kanR$	Austausch des Gens <i>araA</i> mit kan^R	diese Arbeit
$\Delta araA$	in-frame Deletion des Gens <i>araA</i>	diese Arbeit
$\Delta araC::kanR$	Austausch des Gens <i>araC</i> mit kan^R	diese Arbeit
$\Delta araC$	in-frame Deletion des Gens <i>araC</i>	diese Arbeit
$\Delta gatR \Delta araA::kanR$	in-frame Deletion des Gens <i>gatR</i> und Austausch des Gens <i>araA</i> mit kan^R	diese Arbeit
$\Delta gatR \Delta araA$	in-frame Deletion des Gens <i>gatR</i> und <i>araA</i>	diese Arbeit
$\Delta invA::kanR$	Austausch des Gens <i>invA</i> mit kan^R	diese Arbeit
$\Delta invA$	in-frame Deletion des Gens <i>invA</i>	diese Arbeit
$\Delta crp::kanR$	Austausch des Gens <i>crp</i> mit kan^R	diese Arbeit
Δcrp	in-frame Deletion des Gens <i>crp</i>	diese Arbeit
$\Delta gatR-HTH::kanR$	Deletion des Bereichs von <i>gatR</i> , der für die DNA-Bindedomäne kodiert; mit kan^R	diese Arbeit
$\Delta gatR-HTH$	Deletion des Bereichs von <i>gatR</i> , der für die DNA-Bindedomäne kodiert;	diese Arbeit
$\Delta gatR-DeoR::kanR$	Deletion des Bereichs von <i>gatR</i> , der für die Substrat-Bindedomäne kodiert; mit kan^R	diese Arbeit
$\Delta gatR-DeoR$	Deletion des Bereichs von <i>gatR</i> , der für die Substrat-Bindedomäne kodiert; mit kan^R	diese Arbeit

Tabelle A 4: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmide	Genotyp / relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pBR322	Klonierungsvektor; Amp ^R , Tet ^R	(Balbas <i>et al.</i> , 1986)
pBR322-STM3785	Konstrukt für STM3785 Produktion, STM3785 wurde mit Hilfe von <i>PstI</i> kloniert	Diese Arbeit
pBR322- <i>gatR</i>	Konstrukt für GatR-Produktion, <i>gatR</i> wurde mit Hilfe von <i>ScaI</i> und <i>PstI</i> kloniert	Diese Arbeit
pBR322-STM3254	Konstrukt für STM3254-Produktion, STM3254 wurde mit Hilfe von <i>PstI</i> kloniert	Diese Arbeit
pBR322-STM3255	Konstrukt für STM3255-Produktion, STM3255 wurde mit Hilfe von <i>PvuI</i> und <i>PstI</i> kloniert	Diese Arbeit
pBR322- <i>gatC</i>	Konstrukt für GatC-Produktion, <i>gatC</i> wurde mit Hilfe von <i>PvuI</i> und <i>PstI</i> kloniert	Diese Arbeit
pUTs- <i>gfp</i>	Austausch der <i>luxCDABE</i> -Kassette in pUTs- <i>lux</i> (CmR) gegen <i>gfp</i> aus pPROBE-NT mit <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i>	(Starke <i>et al.</i> , 2013)
pUTs-P _{<i>gatY</i>} :: <i>gfp</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>gatY</i> (ca. 300 bp) vor <i>gfp</i> (mit <i>NotI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{STM3255} :: <i>gfp</i>	Klonierung des Fragments <i>upstream</i> von STM3255 (ca. 300 bp) vor <i>gfp</i> (mit <i>NotI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{<i>gatZ</i>} :: <i>gfp</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>gatZ</i> (ca. 300 bp) vor <i>gfp</i> (mit <i>NotI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{<i>gatR</i>} :: <i>gfp</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>gatR</i> (ca. 300 bp) vor <i>gfp</i> (mit <i>NotI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{<i>argS</i>} :: <i>gfp</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>argS</i> (ca. 300 bp) vor <i>gfp</i> (mit <i>KpnI</i>)	Kloniert von J. Hellinckx (TU München, D)
pUTs-P _{<i>rpsM</i>} :: <i>gfp</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>rpsM</i> (ca. 300 bp)	Kloniert von J. Hellinckx (TU München, D)

	vor <i>gfp</i> (mit <i>KpnI</i>)	München, D)
pUTs-lux	Suizidvektor, Transposase-negatives Derivat von pUT mini-Tn5luxCDABE Km2, Austausch von KmR gegen CmR aus pKRG9	(Starke <i>et al.</i> , 2013)
pUTs-P _{<i>gatY</i>} :: <i>lux</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>gatY</i> (ca. 300 bp) vor <i>luxCDABE</i> (mit <i>XmaI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{<i>gatZ</i>} :: <i>lux</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>gatZ</i> (ca. 300 bp) vor <i>luxCDABE</i> (mit <i>XmaI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{<i>gatR</i>} :: <i>lux</i>	Klonierung des Promotor-Fragments von <i>gatR</i> (ca. 300 bp) vor <i>luxCDABE</i> (mit <i>SacI</i> und <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pKD4	<i>pir</i> -abhängig, <i>kan</i> ^R , FRT-Erkennungsschnittstellen	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	Temperatur-sensitive Replikation (<i>repA101(ts)</i>), λRed Rekombinase (<i>araBp-gam-bet-exo</i>), <i>oriR101</i> , <i>amp</i> ^R , <i>araC</i> ; GenBank: AY048746	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	FLP-Rekombinase-Plasmid, <i>Cm</i> ^R , <i>Amp</i> ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pBAD-Myc/His	Expressionsvektor; C-terminaler Polyhistidin- sowie <i>myc</i> Epitop-Tag, <i>araBAD</i> Promotor, <i>araC</i> , pBR322 <i>origin</i>	Invitrogen
pBAD-Myc/His- <i>gatR</i>	Konstrukt für GatR-Produktion, <i>gatR</i> wurde mit Hilfe von <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> kloniert, <i>Amp</i> ^R ; C-terminaler His6-Tag	Diese Arbeit
pBAD-His	Expressionsvektor; N-terminaler Polyhistidin- sowie AntiExpress-Tag, <i>araBAD</i> Promotor, <i>araC</i> , pBR322 <i>origin</i>	Invitrogen
pBAD-His- <i>gatR</i>	Konstrukt für GatR-Produktion, <i>gatR</i> wurde mit Hilfe von <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> kloniert; <i>Amp</i> ^R ; N-terminaler His6-Tag	Diese Arbeit
pBAD- <i>reiD</i>	Konstrukt für ReiD-Produktion, <i>reiD</i> wurde mit Hilfe von <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> kloniert; <i>Amp</i> ^R	(Rothhardt <i>et al.</i> , 2014)
pBAD- <i>crp</i>	Konstrukt für CRP-Produktion, <i>crp</i> wurde mit Hilfe von <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> kloniert; <i>Tet</i> ^R	(Brokatzky, 2015)

Tabelle A 5: in der Arbeit verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Modifikation	Target
Deletionsmutanten der SPI3(III) Region			
SL1344_3745_fwd	CAACTTCCTGCGCTGTTTGACGGGAATTGCACTAT ACTGACTCACCAAAG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTT</u> C	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	SL1344_3745/ STM3779
SL1344_3748_fwd	GTGCCAATGTCAATGACAAGCGCTGCGTGGAAT CAGGCATAGACCGTTC <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCT</u> TC	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	SL1344_3748/ STM3782
SL1344_3748_rev	ATAAGAGGTCGGATATGAATGATATAGCACATAC TCTCTATACCGTTGTG <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	SL1344_3748/ STM3782
SL1344_3751_fwd	GAATATCCTGCATAGATTCTCTTTGCTAGTCAGG CATCCAGGCGCTGTAG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTT</u> C	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	SL1344_3751/ STM3785
SL1344_3751_rev	TTTAGGCGCGCACCATGAAAACATTGAGTAAAAG TTCACACATCCCCTG <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	SL1344_3751/ STM3785
Verifizierung der Deletionsmutanten der SPI3(III) Region			
SPI3_III_fwd	CGGGCTAAAGGTGCTGGTATG		STM3779-85
SPI3_III_rev	CTGTGACTCCTTGCCATACC		STM3779-85
STM3782_fwd	CTGAAGCCACCAGTTCAG		STM3782
STM3782_rev	CATTACCGGAGTAGGTGAAG		STM3782
STM3785_fwd	GTGGAATAGCGACGCCTAC		STM3785
Komplementierung der Deletionsmutanten der SPI3(III) Region			
SPI3III_PstI_fwd	GATC <u>CTGCAG</u> CGGGCTAAAGGTGCTGGTATG	PstI	STM3779-85
SPI3III_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> CTGTGACTCCTTGCCATACC	PstI	STM3779-85
3782_PstI_fwd	GATC <u>CTGCAG</u> CTGAAGCCACCAGTTCAG	PstI	STM3782
3782_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> CATTACCGGAGTAGGTGAAG	PstI	STM3782
3785_PstI_fwd	GATC <u>CTGCAG</u> GTGGAATAGCGACGCCTAC	PstI	STM3785
Deletionsmutanten der Region gatY - gatR			
Gat_op_Del_fwd	CTTTAATTTGAAAAGTTATAAACGGAGACCACTAT GTTCAATTATTTCCAG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatY - gatR</i>
Gat_op_Del_rev	TAACCGACTCCTTTTTAGACGATCATTAAATCCAC GCCTGTTTTGCTAA <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatY - gatR/ gatR</i>
GatR_Del_fwd	AACTAGTTACAGTTAATTATCAGGCAAATCAATAT GAACTCATTGAGCG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTT</u> C	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatR</i>
STM3254_Del_fwd	GCGGCTGTGAAGGGCAACTGTGAGGAATCGCCT GTGATCTACACGCTAAC <u>GTGTAGGCTGGAGCTGC</u> TTC	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	STM3254
STM3254_Del_rev	TATTGTAATTTAACCTACAGCTTTCTGACGTGGAT TTGCGAAAGTAAGGT <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	STM3254
STM3255_Del_fwd	GCTGTAGGTTAAATTACAATATAAGGTCTGCTTAT GAAAAAGATCATTGC <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTT</u> C	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	STM3255
STM3255_Del_rev	TAAAAATATCGTGTTACAGAGCTGCATTCTGACC TCCAGCCTTTGCTAC <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	STM3255
GatC_Del_fwd	AAATTCTGTCCATTCTCATGGGGTAACGTATGTTT AGCGAAATAATGCG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatC</i>
GatC_Del_rev	TTGCTCCCTAAAATTAAGAGGCGATTTGACTTTG CTGTAGCGCCGTGGC <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatC</i>
gatR_Del-DR_fwd	GGAAGTCATCTGGCGGAAGGCGACAATCAGGAA GTCATTCTGGAAGATCG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGC</u> TTC	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatR-DeoR</i>

gatR_Del_HTH_rev	GCAGCCGCCTGGGCAATCCGCTTTTTTCGGATCGCT GGCGAGTTGATACCG <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>gatR-HTH</i>
------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------	-----------------

Komplementierung der Deletionsmutanten der Region *gatY* - *gatR*

Gat_Op_PstI_fwd	GATC <u>CTGCAG</u> GTGTGGCAATGATCGTTAC	PstI	<i>gatY</i> - <i>gatR</i>
Gat_Op_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> CTTTCCCTTCGGGCTTACTCTC	PstI	<i>gatY</i> - <i>gatR</i>
STM3254_PvuI_fwd	GATC <u>CGATCG</u> CCCCGCACTATATGCAACC	PvuI	STM3254
STM3254_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> GTATGCGCAATACCGGTAG	PstI	STM3254
STM3255_PvuI_fwd	GATC <u>CGATCG</u> CAGGAGCTGATGTCGCAAG	PvuI	STM3255
STM3255_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> TTTATCGAGGGCGCTCATCGCTG	PstI	STM3255
GatC_PvuI_fwd	GATC <u>CGATCG</u> CGTGGGTATTGAAGCATTAC	PvuI	<i>gatC</i>
GatC_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> CATAACATTCTCCAGGAAGG	PstI	<i>gatC</i>
GatR_ScaI_fwd	GATC <u>AGTACT</u> CTGATGGTACGAGCCAGCAAC	ScaI	<i>gatR</i>
GatR_PstI_rev	GATC <u>CTGCAG</u> CTGATGGTACGAGCCAGCAAC	PstI	<i>gatR</i>

RT-PCR der Region *gatY* - *gatR*

3254_inner_fwd	GTCAATCGCACTCACCACAC		STM3254
3254_inner_rev	TTGGCCTAGTCCGGCAGAAC		STM3254
gatY_inner_fwd	CGTGCCAGCCTTTAACATCC		<i>gatY</i>
gatY_inner_rev	TGCCCTTCACAGCCGCAAAC		<i>gatY</i>
3255_inner_fwd	TCAACCTGCTGATCTGGTAG		STM3255
3255_inner_rev	TCCAGCCTTTGCTACAGGAG		STM3255
3256_inner_fwd	TATCTGCGGCTGGCAATACC		STM3256
3256_inner_rev	TGGCTGCATGACTTCTGGTG		STM3256
3257_inner_fwd	CTGGGCATCTGTTCAGTTTG		<i>gatZ</i>
3257_inner_rev	CGTGCAACCGAAGCGATAAG		<i>gatZ</i>
gatA_inner_fwd	CATTGACTCGAGCCAACAG		<i>gatA</i>
gatA_inner_rev	ACTGCTCAGGCTCAAGGATG		<i>gatA</i>
gatB_inner_fwd	AGTAATTGTGGCCTGTGGCG		<i>gatB</i>
gatB_inner_rev	ATGCTTCAATACCCACGCCG		<i>gatB</i>
gatC_inner_fwd	TCCTCGACTTAGGCCAACG		<i>gatC</i>
gatC_inner_rev	TTGACTTTGCTGTAGCGCCG		<i>gatC</i>
gatD_inner_fwd	TTATTCACGCTGAGGGAGAC		<i>gatD</i>
gatD_inner_rev	AGCGCTTTGACTGCTTCTGC		<i>gatD</i>
gatR_inner_fwd	GTGCTGGTGATGGACCTTTC		<i>gatR</i>
gatR_inner_rev	TCTTGTCCATCGGCAATACC		<i>gatR</i>
GatY-54_fwd	GAGCGACTGGCAGAAATACG		<i>gatY'</i> - 3254'
GatY-54_rev	TTAATCCGCGTGGGTTCTTC		<i>gatY'</i> - 3254'
3254-55_fwd	CGCCAACGGTTGATTTGGTG		3254' - 3255'
3254-55_rev	ATCCGCCGCAATAATGACTC		3254' - 3255'
3255-56_fwd	GATCCTTTGCGTGTATCCC		3255' - 3256'
3255-56_rev	ATACGCGGTATTGCCGTCAC		3255' - 3256'
3256-57_fwd	AACCTGATGCGAGTGGTGTG		3256' - <i>gatZ'</i>
3256-57_rev	ATCCCACTTCTGAGCAATG		3256' - <i>gatZ'</i>
3257-gatA_fwd	CACCCGCGTATTCGTCAAAG		<i>gatZ'</i> - <i>gatA'</i>
3257-gatA_rev	CCGGCTTATCTGGACGAATC		<i>gatZ'</i> - <i>gatA'</i>
gatA-B_fwd	CCGCTGTTTAGTGAGCTAC		<i>gatA'</i> - <i>gatB'</i>
gatA-B_rev	GACGGGAATATTGCCAAAGG		<i>gatA'</i> - <i>gatB'</i>
gatB-C_fwd	GAGCTCGACTTAGTGCAATG		<i>gatB'</i> - <i>gatC'</i>
gatB-C_rev	GGCCAGCCGACGTCAATAAC		<i>gatB'</i> - <i>gatC'</i>
gatC-D_fwd	ACCCAAGTGGCTGCCAATGC		<i>gatC'</i> - <i>gatD'</i>
gatC-D_rev	GCCGTAGGATTCAACGTAGC		<i>gatC'</i> - <i>gatD'</i>
gatD-R_fwd	CCAGGAGAAGAATGGGAAAC		<i>gatD'</i> - <i>gatR'</i>
gatD-R_rev	CGAGTTGATACCGATCTTCC		<i>gatD'</i> - <i>gatR'</i>

Herstellung der pUTs-Konstrukte der Region *gatY* - *gatR*

PgatY_NotI_fwd	GATC <u>CGGGCCG</u> CAAGTTATCCCGTGCTTTAAC	NotI	P _{gatY}
PgatY_KpnI_rev	GATC <u>GGTACC</u> GGATGTTAAAGGCTGGCAGC	KpnI	P _{gatY}

PgatY_Sacl_fwd	GATC <u>GAGCTC</u> CGCTTCGTCGGGAAGTTATC	Sacl	P _{gatY}
PgatY_Xmal_rev	GATC <u>CCCGGG</u> TAAAGGCTGGCACGGCATAG	Xmal	P _{gatY}
P3257_NotI_fwd_neu	GATC <u>GCGGCCGC</u> AAGATGCACAGCAGGCACTAC	NotI	P _{gatZ}
P3257_KpnI_rev	GATC <u>GGTACC</u> TCTCTGCTTTATGACGAGC	KpnI	P _{gatZ}
P3257_Sacl_fwd	GATC <u>GAGCTC</u> AAGATGCACAGCAGGCACTAC	Sacl	P _{gatZ}
P3257_Xmal_rev	GATC <u>CCCGGG</u> TCTCTGCTTTATGACGAGC	Xmal	P _{gatZ}
PgatR_NotI_fwd	GATC <u>GCGGCCGC</u> AGTTGGATGAACTACTCCG	NotI	P _{gatR}
PgatR_KpnI_rev	GATC <u>GGTACC</u> GAAAGGTCCATCACCAGCAC	KpnI	P _{gatR}
PgatR_KpnI_fwd	GATC <u>GGTACC</u> TCTCGGCAGTTGGATGAAC	KpnI	P _{gatR}
PgatR_Xmal_rev	GATC <u>CCCGGG</u> GAAAGGTCCATCACCAGCAC	Xmal	P _{gatR}

Überexpressionsvektoren

GatR_N_fwd_XhoI	GATC <u>CTCGAG</u> ATGAACTCATTTGAGCGAAG	XhoI	gatR
GatR_N_rev_HindIII	GATC <u>AAGCTT</u> AGCAACGCATAACCGACTCC	HindIII	gatR
GatR_C_fwd_XhoI	GATC <u>CTCGAG</u> TATGAACTCATTTGAGCGAAG	XhoI	gatR
GatR_C_rev_HindIII	GATC <u>AAGCTT</u> GACGATCATTAATTCCACGC	HindIII	gatR

EMSA

PgatY_bs_fwd	CACCGAATGCTCAATGG	P _{gatY}
PgatY_bs_rev	TAAAGGCTGGCACGGCATAG	P _{gatY}
P54_bs_rev	CGCGCTATTAAGTGTTAGCGTG	STM3254'
P55_bs_rev	GGCTTCTTCAGCCATAAATGTATGC	STM3255'
P56_bs_rev	TATCGAGGCGCTCATCGCTG	STM3256'
P57_bs_fwd	CCACCAGAAGTCATGCAGCCAAAG	P _{gatZ}
P57_bs_rev	CAGATGCCAGATGTTCTCC	P _{gatZ}
PgatA_bs_rev	TCTCTTTGCCAATGTGCGCC	gatA'
PgatB_bs_rev	CGCCGTCCATATAGGTTTCG	gatB'
PgatC_bs_rev	CCAAGCTTCATCCAGCAG	gatC'
PgatD_bs_rev	TCTCCCTCAGCGTGAATAAC	gatD'
PgatR_bs_rev	CGCTGCCTTGCATTAATC	P _{gatR}

Fragmente für SPR

PgatY_SPR-1_rev	ACATGATTGTGATCATCAAC	P _{gatY}
PgatY_SPR-2_fwd	ATTATCCTGCTTTTGTGTTG	P _{gatY}
PgatY_SPR-2_rev	TTTACTGGAAATAATGAAC	P _{gatY}
PgatY_SPR-3_fwd	ATGATCGTTACATTACTTTC	P _{gatY}
P57_SPR-1_rev	AAATGTAAGGTAACGAAATG	P _{gatZ}
P57_SPR-2_fwd	ATTACACACCATTTTCGTTAC	P _{gatZ}
P57_SPR-2_rev	CGAGCAATTATTTCTTTCAC	P _{gatZ}
P57_SPR-3_fwd	TTTCGCAACTTTCATTTATC	P _{gatZ}
PgatR_SPR-1_fwd	CCTGTTGGCTGAAAAACGTC	P _{gatR}
PgatR_SPR-1_rev	GGAAATGTGAGCCAGCGCAG	P _{gatR}
PgatR_SPR-2_fwd	CATGCAGGGCAAATTTTAC	P _{gatR}
PgatR_SPR-2_rev	AGTTCATATTGATTTGCCTG	P _{gatR}
PgatR_SPR-3_fwd	GCTGGCTCACATTTCTTTC	P _{gatR}
P57_SPR-2_fwd_bt	ATTACACACCATTTTCGTTAC	biotinyliert
PgR_SPR-2_fwd_bt	CATGCAGGGCAAATTTTAC	biotinyliert
PgY_SPR-2_fwd_bt	ATTATCCTGCTTTTGTGTTG	biotinyliert

Eingrenzung der GatR-Bindungsstelle

PgatY_1-1_fwd	CACTTTTCTTTCATTTAAG	P _{gatY}
PgatY_2-2_rev	AGTAATGTAACGATCATTGC	P _{gatY}
PgatY_2-4_fwd	CTTTAATTTTCGAAAG	P _{gatY}
PgatY_3-3_rev	CTTTCGAAATTAAG	P _{gatY}
PgatZ_2-1_rev	AAATGAAAGTTTCGAAAGG	P _{gatZ}
PgatZ_2-3_fwd	CAACATTACGAAAGCC	P _{gatZ}
PgatZ_3-2_rev	ATAGGCTTTCGTAATGTTG	P _{gatZ}
PgatR_-35-10_fwd	CGAAATTTAGCGTTCACC	P _{gatR}

PgatR_-35-10_rev	GCCTGATAATTAAGTGTAAAC		P _{gatR}
PgatR_1-1_fwd	TCAACTTTCCTGATGGTACG		P _{gatR}
PgatR_3-2_rev	CGAAGGATTGCGAAAGGTG		P _{gatR}
PgatR_1-2_rev	GGTGAACGCTAAATTTCCG		P _{gatR}
weitere Deletionen und deren Verifizierung			
AraA_Del_fwd	GCAATCCTGACTCATTAAGGACACGACAATGACGATT TTTGATAATTATG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>araA</i>
AraA_Del_rev	CAATCCGTTTCACCAATTAACGTTTGAACCCGTAATAC ACCTCGTTCAG <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>araA</i>
AraC_Del_fwd	CATCGGGGGGTAGAGAAATCATGGCTGAAACGCAAA ATGATCCGCTATTG <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>araC</i>
AraC_Del_rev	CTTTGTGGACACATCATTCACTTTTTATTACATCCGG CCCTGAACTCGC <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>araC</i>
AraA_fwd	GATGGCGCTTCGCTTATC		<i>araA</i>
AraA_rev	AGCTTTACCGCCGCTACCAGCAG		<i>araA</i>
AraC_fwd	TGTGGACATTCCAGCCATAG		<i>araC</i>
AraC_rev	GCAGGGATTCTGCTTACC		<i>araC</i>
Crp_Del_fwd	CTGGAGACAGCTTATAACAGAGGATAACCGCGCATG GTGCTTGGCAAACC <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	20 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>crp</i>
Crp_Del_rev	CCATTCTGACGGAATTAACGGGTGCCGTAGACGACG ATGGTCTTGCCATG <u>CATATGAATATCCTCCTTA</u>	19 Nukleotide, Homolog zu pKD4	<i>crp</i>
Crp_fwd	GCATGTATGCAGAGGACATC		<i>crp</i>
Crp_rev	ACCAGCGTTTGCCGTAGTGC		<i>crp</i>

Tabelle A 6: Referenzen zu Pathogenitätsinseln SPI-11 bis SPI-23

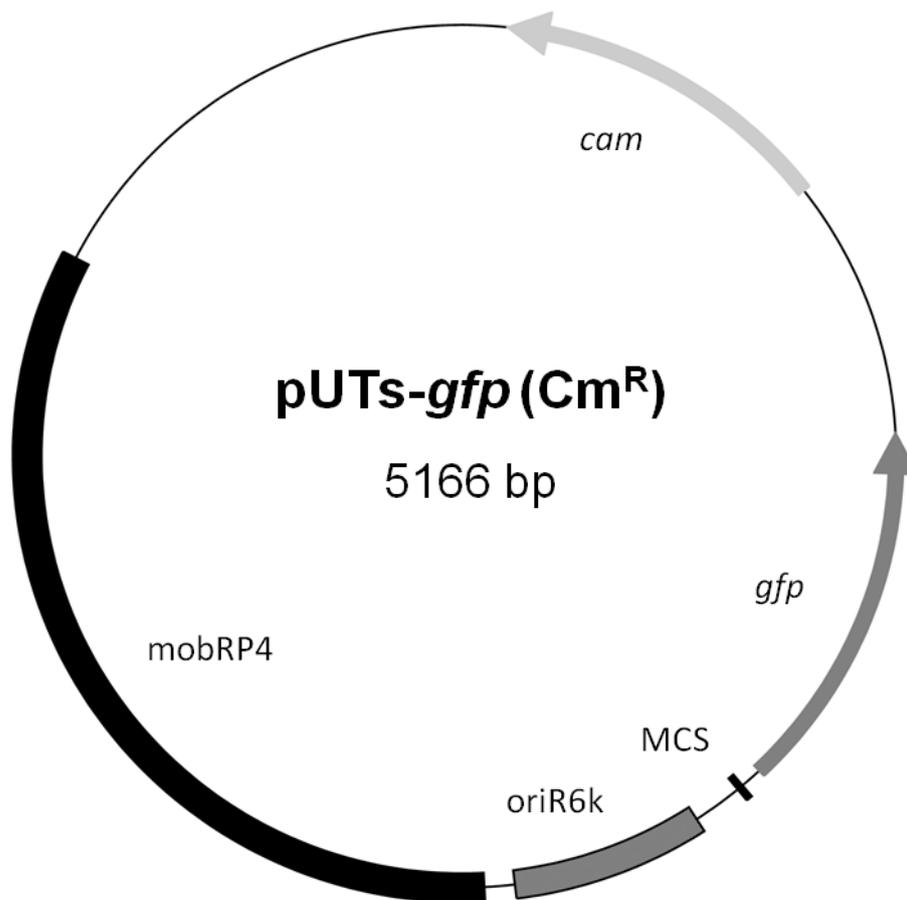
Pathogenitätsinsel	Referenz
SPI-11	(Lee <i>et al.</i> , 2013)
SPI-12	(Tomljenovic-Berube <i>et al.</i> , 2013)
SPI-13	(Shah <i>et al.</i> , 2005, Elder <i>et al.</i> , 2016)
SPI-14	(Shah <i>et al.</i> , 2005)
SPI-15	(Vernikos and Parkhill, 2006)
SPI-16	(Vernikos and Parkhill, 2006, Bogomolnaya <i>et al.</i> , 2008)
SPI-17	(Vernikos and Parkhill, 2006)
SPI-18	(Jofre <i>et al.</i> , 2014)
SPI-19	(Blondel <i>et al.</i> , 2009, Blondel <i>et al.</i> , 2013, Pezoa <i>et al.</i> , 2014)
SPI-20	(Pezoa <i>et al.</i> , 2014, Blondel <i>et al.</i> , 2009)
SPI-21	(Blondel <i>et al.</i> , 2009, Pezoa <i>et al.</i> , 2014)
SPI-22	(Pezoa <i>et al.</i> , 2014)
SPI-23	(Hayward <i>et al.</i> , 2014)

Tabelle A 7: Fitness Scores der im Genbereich *gatY-gatR* mutierten Stämme *in vivo*. Die Werte des *Fitness Scores* liegen im Bereich zwischen -15 und +15 und sind für die Tiermodelle Maus, Huhn, Schwein und Rind angegeben. Eine Attenuation der Mutante in der Kolonisierung lag vor, wenn der Wert < 0 war. Aufgelistet sind signifikante (p -Wert < 0,05) *Fitness Scores* einzelner Mutanten. Gene für die kein signifikanter *Fitness Score* berechnet werden konnte, sind nicht gezeigt. Lag die Attenuation der einzelnen Mutante ≤ -3 , so sind die Felder rot markiert, liegt der Wert zwischen -3 und -1, so sind die Felder gelb hinterlegt.

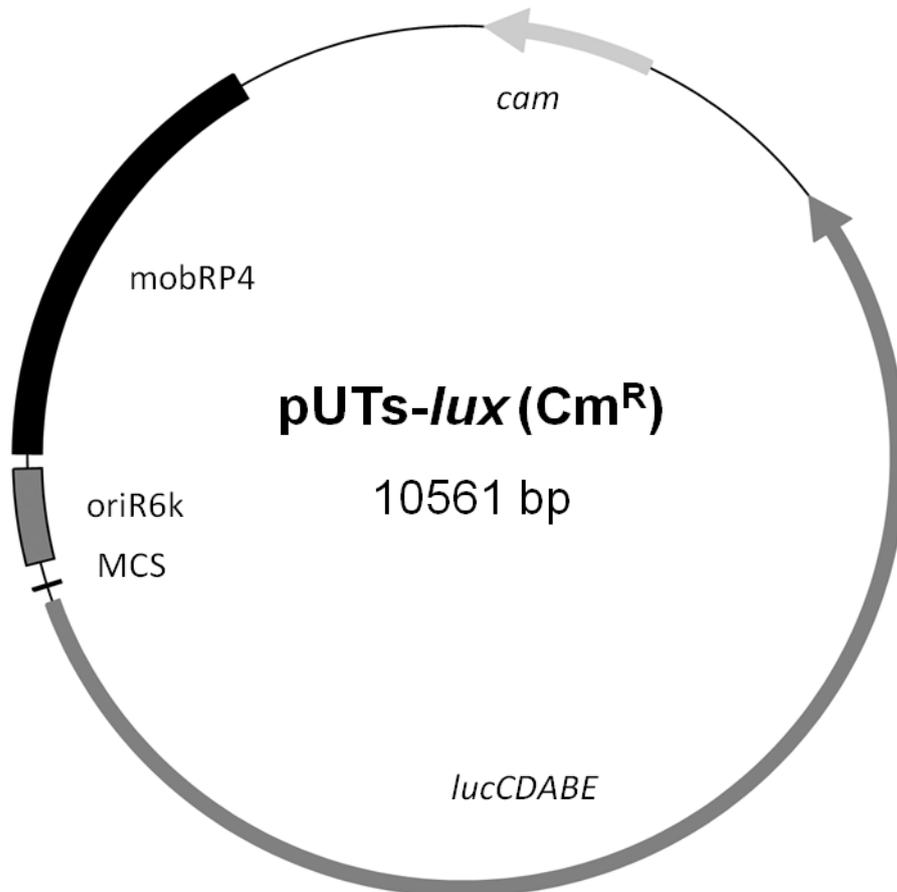
ST4/74	<i>Fitness Score</i> Maus	<i>Fitness Score</i> Huhn	<i>Fitness Score</i> Schwein	<i>Fitness Score</i> Kalb
<i>gatY</i>	-0,15	-0,01		-0,34
	-0,07	1,04		1,20
	0,07	0,75		0,41
	0,49	-5,05	-15	
STM3254	0,97	-1,36	-0,37	-0,5
	0,43	-4,26	-15	-15
	0,42	-2,78	-15	-15
	0,67			
	-1,59			
0,06				
STM3255	0,10	-6,22	-15	-15
	-0,02	-2,79	-15	-7,61
	-0,50	-0,28	-0,02	0,03
	0,19	0,57	-0,002	1,75
	-0,54			
<i>gatR</i>	-1,38	-8,82	-4,87	-5,25
		-5,51	-1,60	
		-8,52	-1,18	

Tabelle A 8: Fitness Scores der im Genbereich STM3779–3785 mutierten Stämmen *in vivo*. Die Werte der *Fitness Scores* liegen im Bereich von -15 bis +15. Eine Attenuation der Mutante bei der Kolonisierung lag vor, wenn der Wert < 0 war. Aufgelistet sind signifikante (p -Wert < 0,05) *Fitness Scores* von attenuierten Mutanten. Mit X gekennzeichnet sind die Fälle, in denen im speziellen Tiermodell keine Mutante für das Gen vorhanden war. Leere Felder deuten darauf hin, dass zwar Transposon-Mutanten vorhanden waren, diese jedoch keine signifikante Attenuation aufwiesen. Lag die Attenuation der einzelnen Mutante < -5, so sind die Felder rot markiert, liegt der Wert zwischen -5 und -1, so sind die Felder gelb hinterlegt

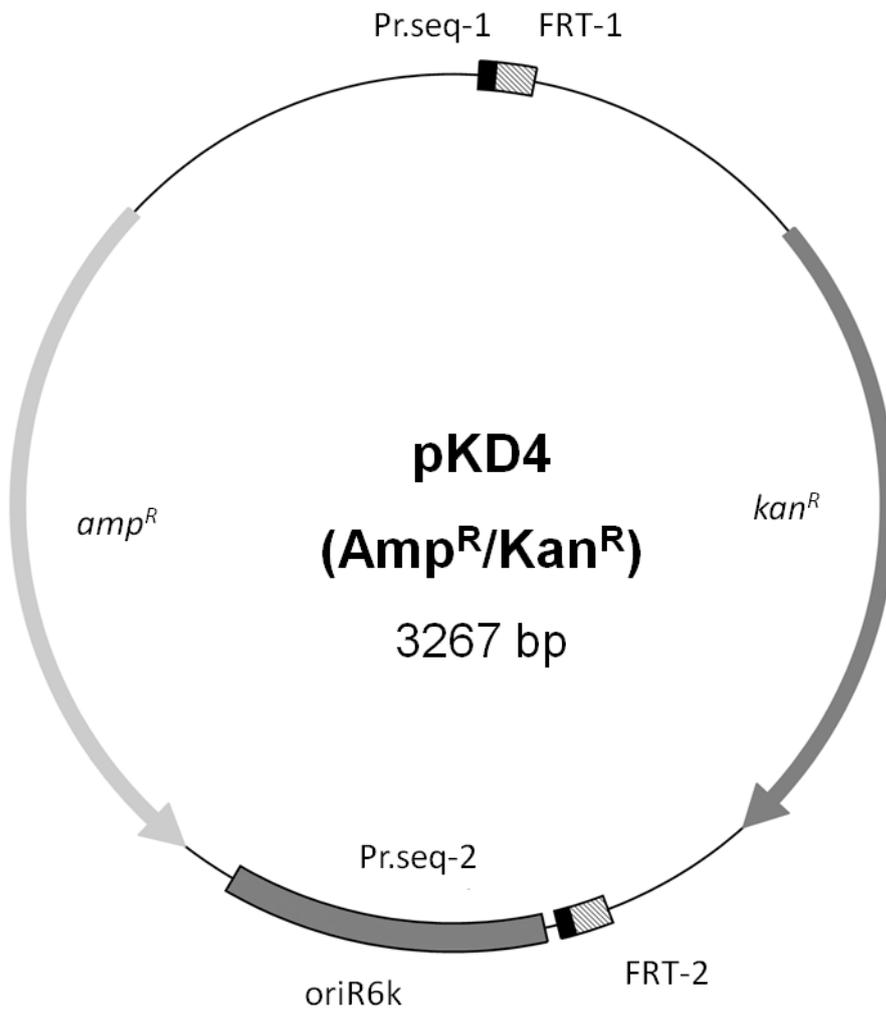
Genbezeichnung	<i>Fitness score</i>	<i>Fitness Score</i>	<i>Fitness Score</i>	<i>Fitness Score</i>
	Maus	Huhn	Schwein	Kalb
STM3779				
STM3780		-9,87	-15	-15
		-15	-15	-15
STM3781		-5,57		-1,47
		-6,41		-1,44
		-2,79		-1,83
		-2,58		
STM3782	-2,08	-5,46	-15	-15
		-4,72	-15	-6,17
		-15	-5,58	-15
		-9,40	-15	-15
		-6,49	-3,18	-2,37
			-7,04	-15
STM3783		X	X	X
STM3784		-6,93	-15	-8,82
		-4,01	-15	-15
		-5,03	-15	-8,70
		-4,02	-5,81	
STM3785		-15		-15

Abbildung A 1: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pUTs-*gfp* (Cm^R)

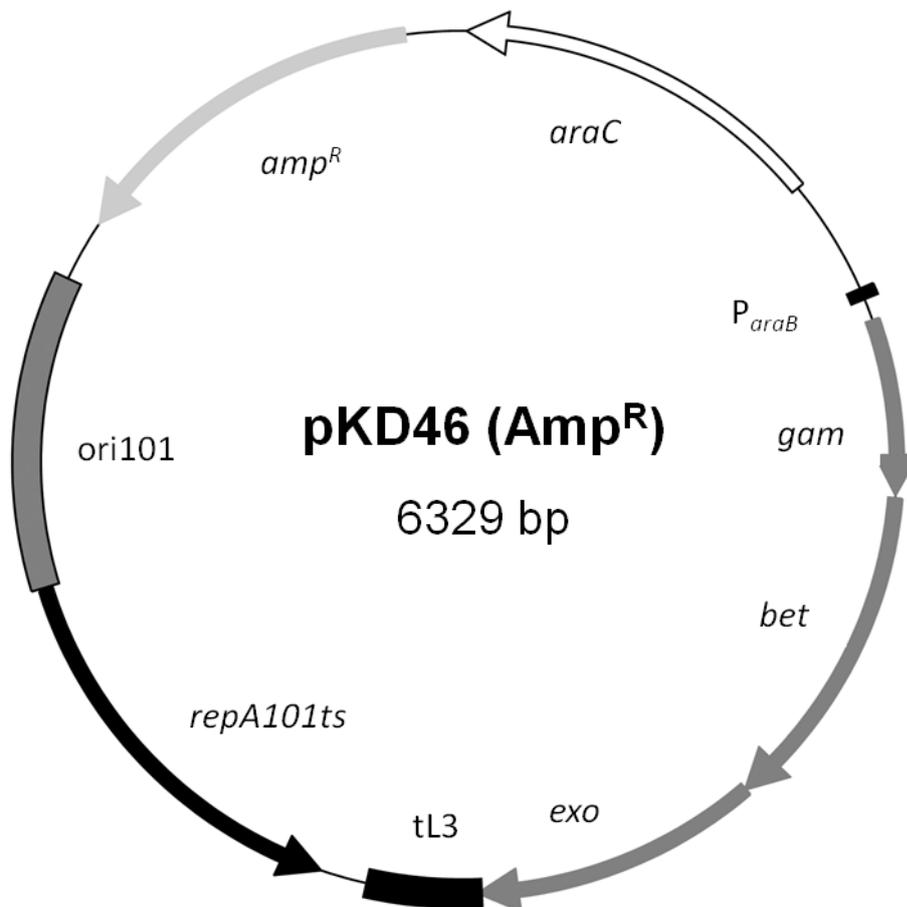
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>cam</i>	746	87	Chloramphenicol-Resistenzgen
<i>gfp</i>	1963	1247	Promotorloses <i>gfp</i> -Gen
MCS	2017	2005	<i>multiple cloning site</i>
oriR6k	2482	2113	R6k-Replikationsursprung
mobRP4	4267	2540	Mobilitätsregion

Abbildung A 2: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pUTs-*lux* (Cm^R)

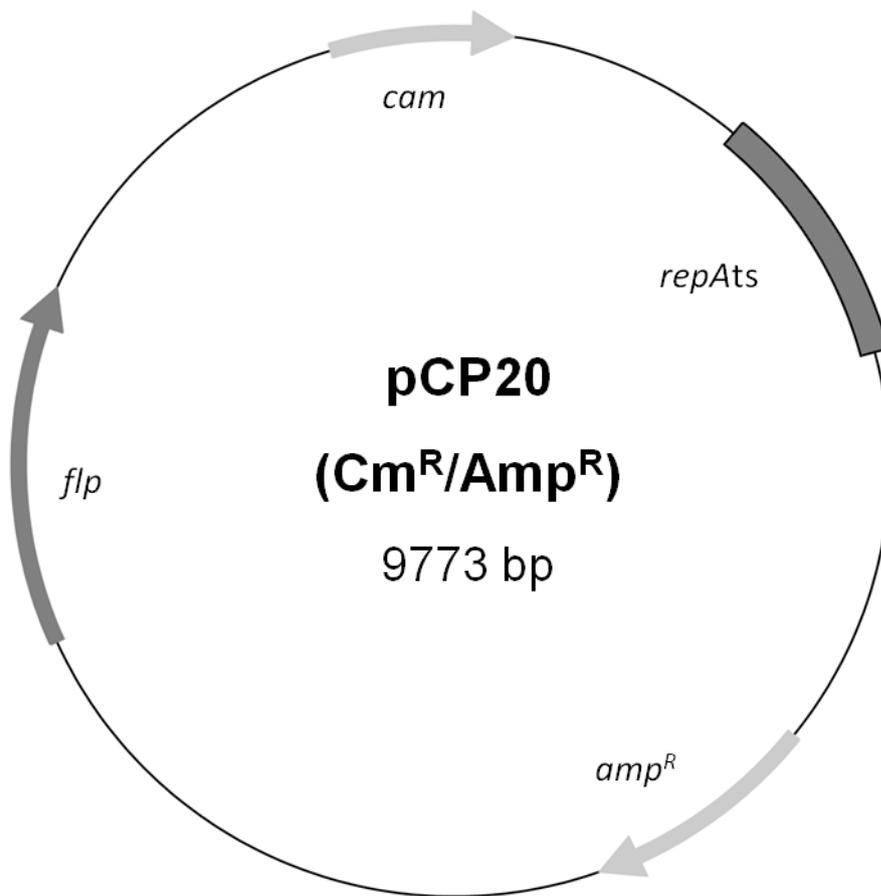
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>cam</i>	746	87	Chloramphenicol-Resistenzgen
<i>luxCDABE</i>	7346	1549	Promotorloses Luciferase-Operon
MCS	7418	7408	<i>multiple cloning site</i>
oriR6k	7877	7508	R6k-Replikationsursprung
mobRP4	9662	7935	Mobilitätsregion

Abbildung A 3: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pKD4 (Amp^R/Kan^R)

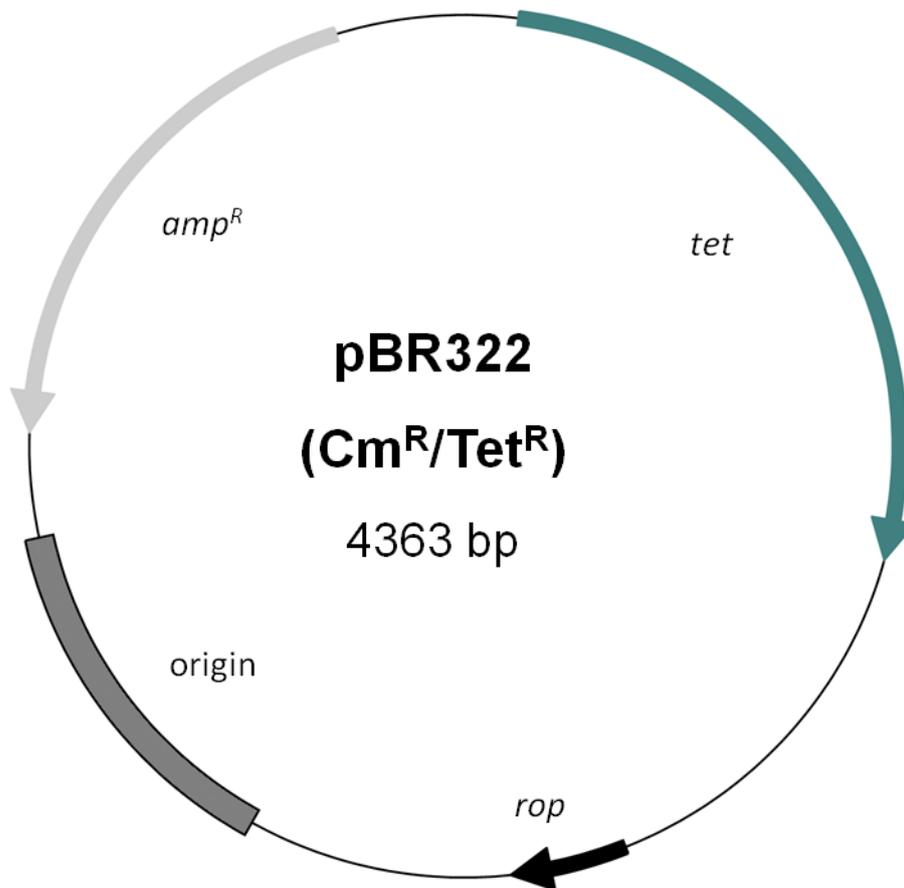
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
Pr.seq-1	31	50	Sequenz für PCR-Primer
FRT-1	98	51	FRT-Bindungsstelle
<i>kan^R</i>	459	1253	Kanamycin-Resistenzgen
FRT-2	1489	1444	FRT-Bindungsstelle
Pr.seq-2	1507	1489	Sequenz für PCR-Primer
oriR6k	1523	1909	Replikationsursprung
<i>amp^R</i>	2839	1979	Ampicillin-Resistenzgen

Abbildung A 4: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pKD46 (Amp^R)

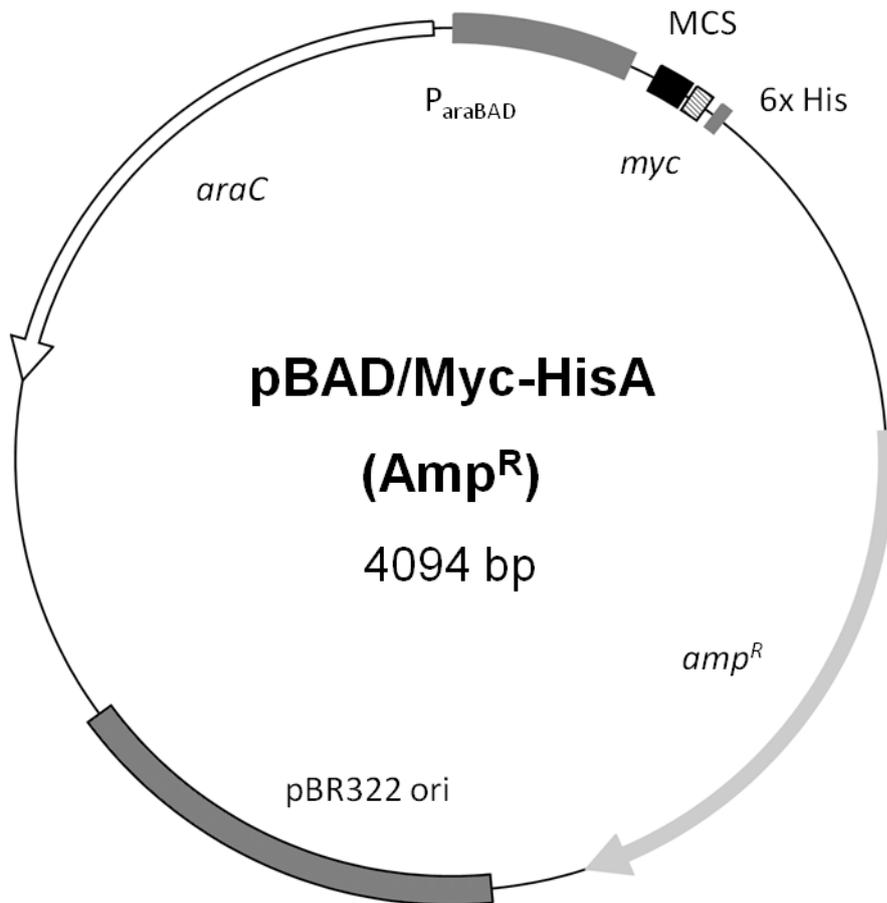
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>araC</i>	889	11	<i>araC</i> -Gen
P _{araB}	1165	1192	Arabinose-abh. Promotor
<i>gam</i>	1244	1660	Red-Rekombinase-Gen
<i>bet</i>	1666	2451	Red-Rekombinase-Gen
<i>exo</i>	2448	3128	Red-Rekombinase-Gen
tL3	3118	3387	Terminator
<i>rep101ts</i>	4446	3496	Kodiert für ein Temperatur-sensitives Plasmidreplikations-Protein
oriR101	4450	5190	Replikationsursprung
<i>amp^R</i>	6198	5338	Ampicillin-Resistenzgen

Abbildung A 5: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pCP20 (Cm^R/Amp^R)

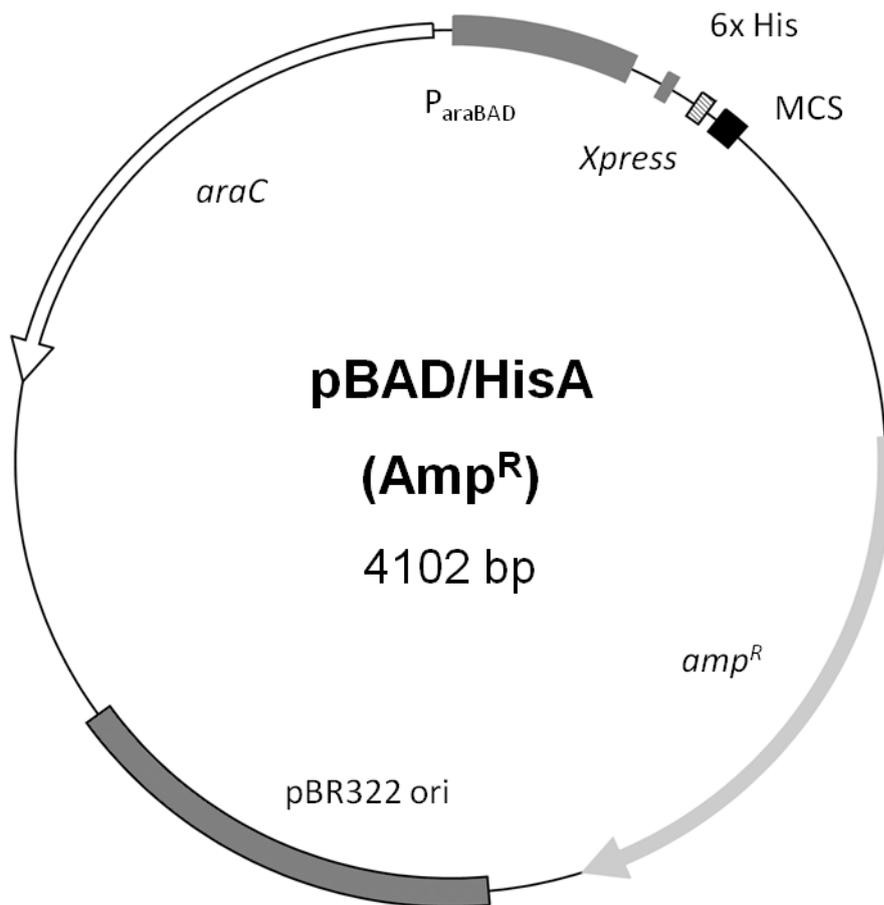
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>repAts</i>	1083	2033	Temperatur-sensitiver Replikationsursprung
<i>amp^R</i>	3496	4356	Ampicillin-Resistenzgen
<i>flp</i>	6673	7987	FLP-Rekombinase-kodierendes Gen
<i>cam</i>	9326	212	Chloramphenicol-Resistenzgen

Abbildung A 6: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pBR322 (Cm^R/Tet^R)

Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>tet</i>	86	1276	Tetrazyklin-Resistenzgen
<i>rop</i>	1918	2108	<i>rop</i> -Gen
origin	3124	2536	Replikationsursprung
<i>amp^R</i>	4155	3295	Ampicillin-Resistenzgen

Abbildung A 7: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pBAD/Myc-HisA (Amp^R)

Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
P _{araBAD}	4	276	<i>araBAD</i> Promotorregion
MCS	317	370	<i>multiple cloning site</i>
<i>myc</i>	377	406	<i>myc</i> -Epitop
6x His	422	439	C-terminaler Polyhistitin-Tag
<i>amp^R</i>	981	1841	Ampicillin-Resistenzgen
pBR322 ori	1986	2659	Replikationsursprung
<i>araC</i>	4068	3190	<i>araC</i> -Gen

Abbildung A 8: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pBAD/HisA (Amp^R)

Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
P _{araBAD}	4	276	<i>araBAD</i> Promotorregion
6x His	331	348	N-terminaler Polyhistitin-Tag
<i>Xpress</i>	388	411	<i>Xpress</i> -Epitop
MCS	430	470	<i>multiple cloning site</i>
<i>amp^R</i>	989	1849	Ampicillin-Resistenzgen
pBR322 ori	1994	2667	Replikationsursprung
<i>araC</i>	4076	3198	<i>araC</i> -Gen

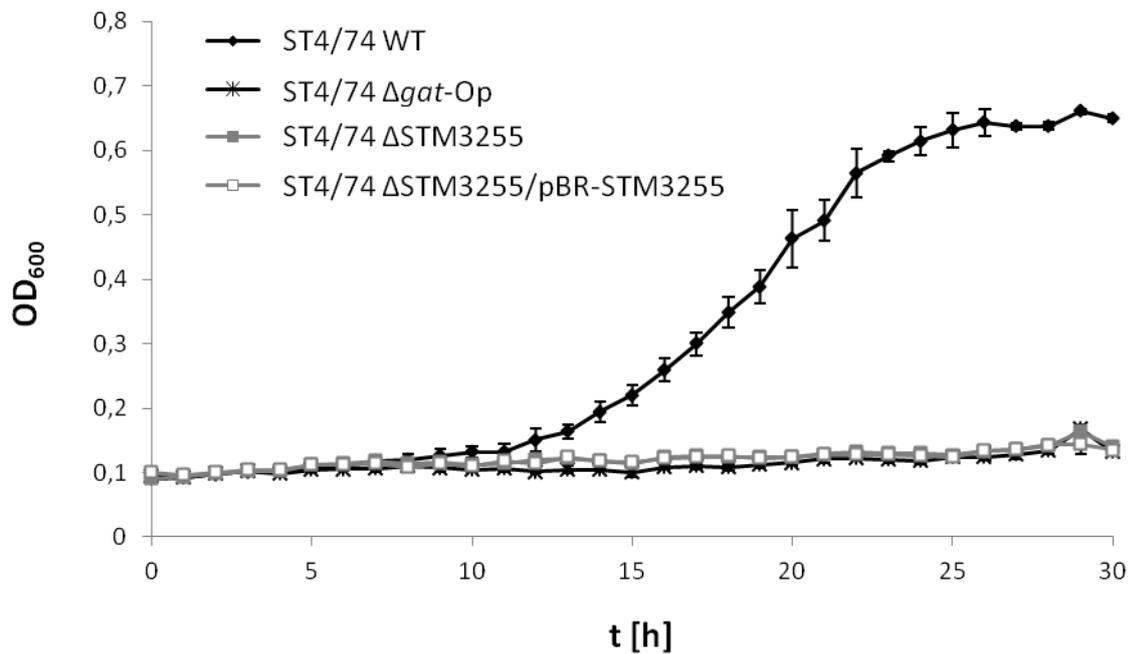


Abbildung A 9: Wachstumskurve verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9-Medium mit 1% Galaktitol. Minimalmedium mit Galaktitol (1%) als einzige Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Deletions- und Komplementationsmutanten von *S. Typhimurium* ST4/74 angeimpft und daraufhin die OD_{600} stündlich über insgesamt 30 h bestimmt. Getestete Stämme waren *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp (schwarze Linie mit Rauten), Δgat -Op (schwarze Linie mit Sternen), $\Delta STM3255$ (graue Linie mit Vierecken) und $\Delta STM3255/pBR$ -STM3255 (graue Linie mit weiß-gefüllten Vierecken).

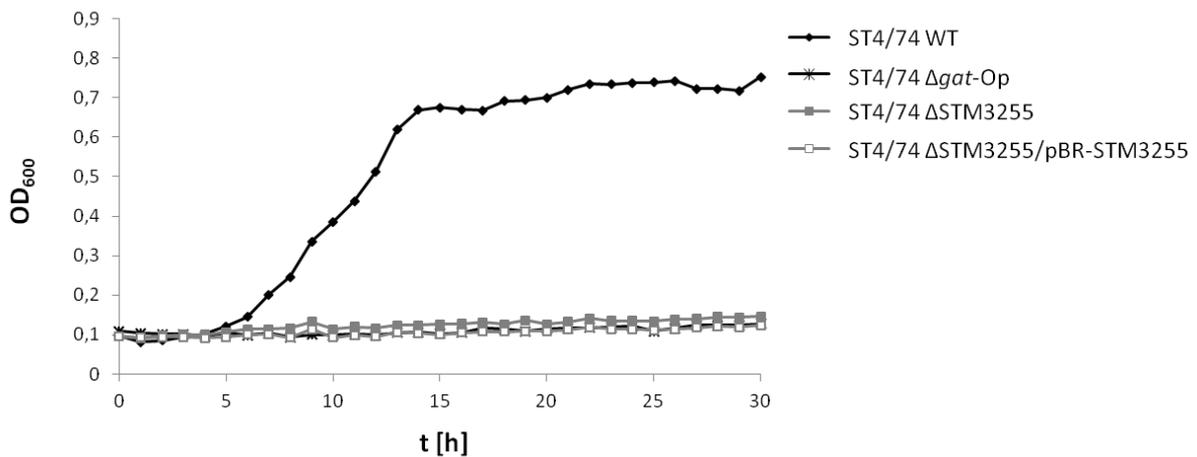


Abbildung A 10: Wachstumskurve verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9-Medium mit 1% Tagatose. Minimalmedium mit D-Tagatose (1%) als einzige Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Deletions- und Komplementationsmutanten von *S. Typhimurium* ST4/74 angeimpft und daraufhin die OD_{600} stündlich über insgesamt 30 h bestimmt. Getestete Stämme waren *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp (schwarze Linie mit Rauten), Δgat -Op (schwarze Linie mit Sternen), $\Delta STM3255$ (graue Linie mit Vierecken) und $\Delta STM3255/pBR$ -STM3255 (graue Linie mit weiß-gefüllten Vierecken).

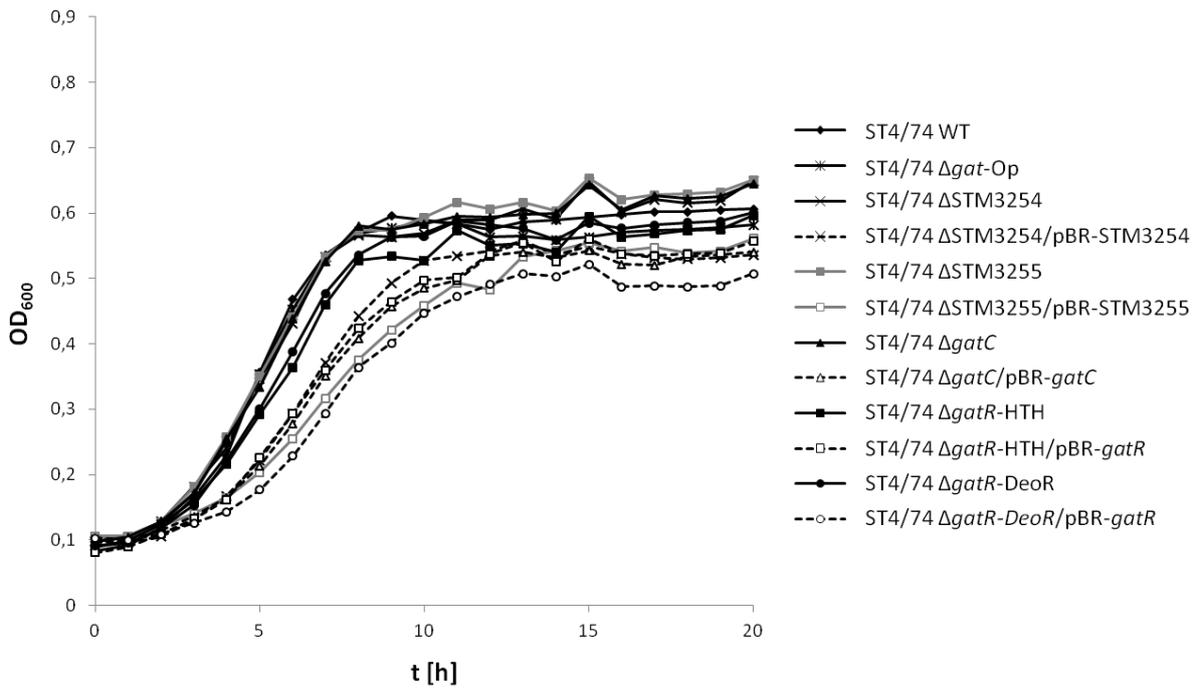


Abbildung A 11: Wachstumskurve verschiedener ST4/74-Deletionsmutanten in M9+ 1 % Glucose. Minimalmedium mit Glucose (1 %) als einzige Kohlenstoffquelle wurde 1:100 mit verschiedenen Deletions- und Komplementationsmutanten von *S. Typhimurium* ST4/74 angeimpft und daraufhin die OD_{600} stündlich über insgesamt 20 h bestimmt. Getestete Stämme waren *S. Typhimurium* ST4/74 Wildtyp (schwarze Linie mit Rauten), Δgat -Op (schwarze Linie mit Markierungssternen), $\Delta STM3254$ (durchgezogene Linie mit Sternen), $\Delta STM3254$ /pBR-STM3254 (gestrichelte Linie mit Sternen), $\Delta STM3255$ (graue Linie mit Vierecken), $\Delta STM3255$ /pBR-STM3255 (graue Linie mit weiß-gefüllten Vierecken), $\Delta gatC$ (durchgezogene Linie mit schwarzen Dreiecken), $\Delta gatC$ /pBR- $gatC$ (gestrichelte Linie mit weißen Dreiecken), $\Delta gatR$ -HTH (durchgezogene Linie mit schwarzen Vierecken), $\Delta gatR$ -HTH/pBR- $gatR$ (gestrichelte Linie mit weißen Vierecken), $\Delta gatR$ -DeoR (durchgezogene Linie mit schwarzen Kreisen) und $\Delta gatR$ -DeoR/pBR- $gatR$ (gestrichelte Linie mit weißen Kreisen).

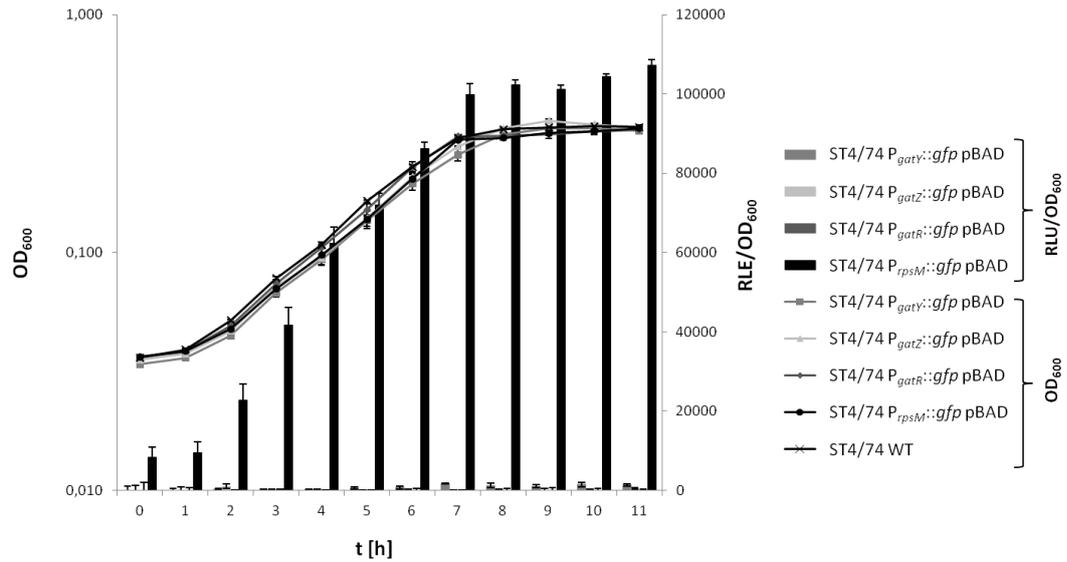


Abbildung A 12: gfp-basierte Promotoraktivität von P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} in M9 mit Glucose (Fluoreszenz). Aufgezeichnet ist die Fluoreszenzaktivität der einzelnen Promotoren in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD_{600} . Abgezogen ist die Grundfluoreszenz des Wildtyp-Stammes ST4/74 (nicht gezeigt). Gemessen wurde die RLU/OD_{600} stündlich über insgesamt 11 h für die Stämme ST4/74 $P_{gatY}::gfp$ (grauer Balken), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ (hellgrauer Balken) und ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ (dunkelgrauer Balken). Als Positivkontrolle diente der Stamm ST4/74 $P_{rpsM}::gfp$ (schwarzer Balken). Parallel dazu ist die optische Dichte (OD_{600}) der jeweiligen Stämme aufgetragen: ST4/74 $P_{gatY}::gfp$ (graue Linie mit Vierecken), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ (hellgraue Linie mit Dreiecken), ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ (dunkelgraue Linie mit Rauten), ST4/74 $P_{rpsM}::gfp$ (schwarze Linie mit Kreisen) und ST4/74 Wildtyp (Linie mit Kreuzen).

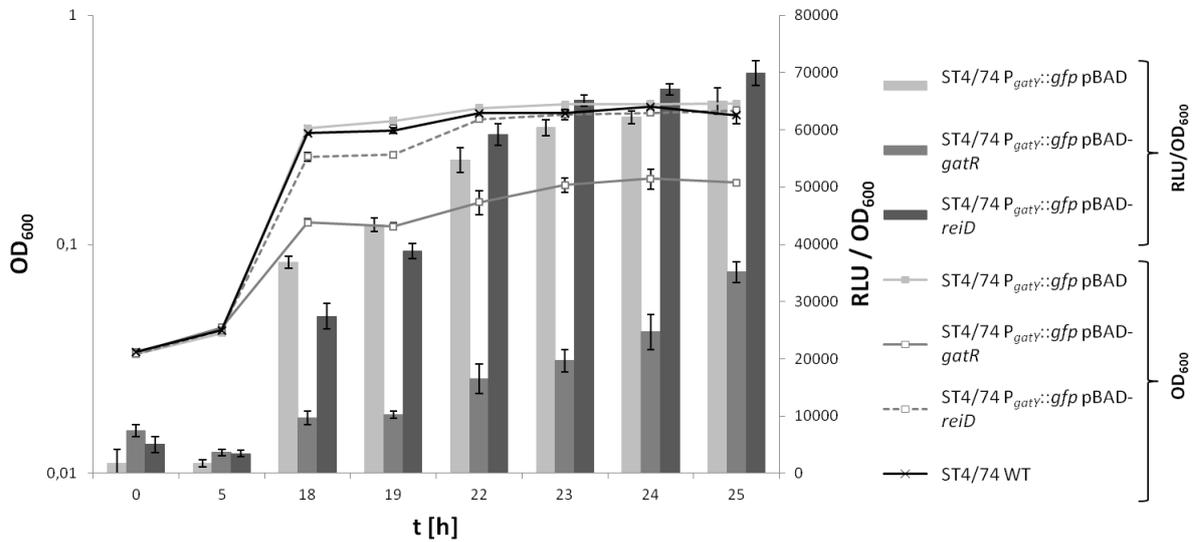


Abbildung A 13: Promotoraktivität von P_{gatY} in M9-Medium mit Galaktitol (Fluoreszenz) in Abhängigkeit der Proteine GatR bzw. ReID. Dargestellt ist die Fluoreszenzaktivität des Promotors $P_{gatY}::gfp$ in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD_{600} . Abgezogen ist die Grundfluoreszenz des Wildtyp-Stammes ST4/74 (nicht gezeigt). Gemessen wurde die RLU/OD_{600} zu Beginn ($t=0$ h), nach Zugabe von Arabinose ($t=5$ h) und nach 18 h stündlich für die Stämme ST4/74 $P_{gatY}::gfp/pBAD$ (hellgrauer Balken), ST4/74 $P_{gatY}::gfp/pBAD-gatR$ (grauer Balken) und ST4/74 $P_{gatY}::gfp/pBAD-reiD$ (dunkelgrauer Balken). Parallel dazu ist die optische Dichte (OD_{600}) von den jeweiligen Stämmen aufgetragen: ST4/74 $P_{gatY}::gfp/pBAD$ (Linie mit Vierecken), ST4/74 $P_{gatY}::gfp/pBAD-gatR$ (Linie mit weißen Vierecken), ST4/74 $P_{gatY}::gfp/pBAD-reiD$ (gestrichelte Linie mit weißen Vierecken) und ST4/74 Wildtyp (Linie mit Kreuzen).

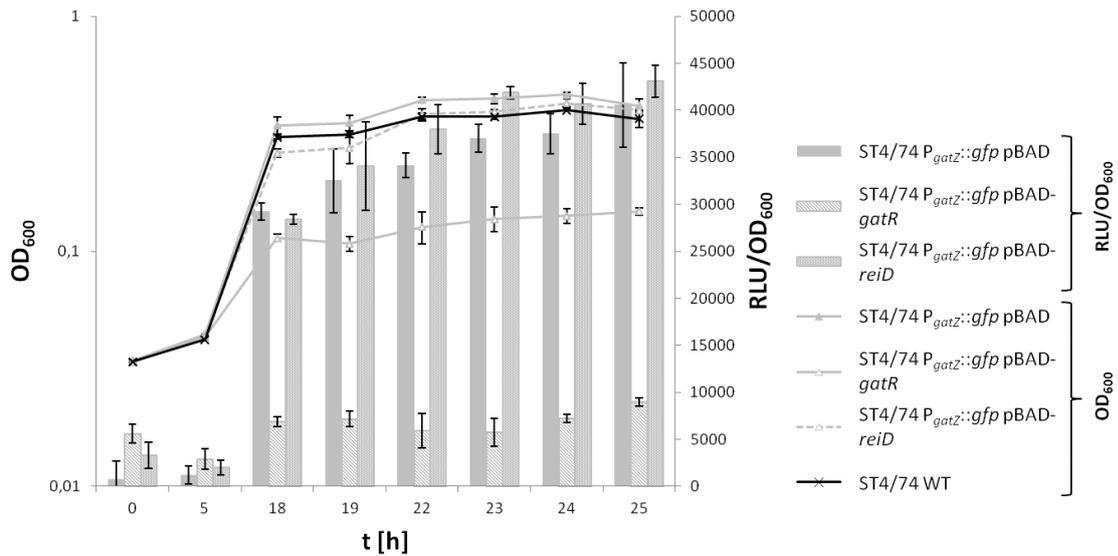


Abbildung A 14: Promotoraktivität von P_{gatZ} in M9-Medium mit Galaktitol (Fluoreszenz) in Abhängigkeit der Proteine GatR bzw. ReiD. Dargestellt ist die Fluoreszenzaktivität des Promotors $P_{gatZ}::gfp$ in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD_{600} . Abgezogen ist die Grundfluoreszenz des Wildtyp-Stammes ST4/74 (nicht gezeigt). Gemessen wurde die RLU/OD_{600} zu Beginn ($t=0$ h), nach Zugabe von Arabinose ($t=5$ h) und nach 18 h stündlich für die Stämme ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ /pBAD (hellgrauer Balken), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ /pBAD-*gatR* (gestreifter Balken) und ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ /pBAD-*reiD* (gepunkteter Balken). Parallel dazu ist die optische Dichte (OD_{600}) von den jeweiligen Stämmen aufgetragen: ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ /pBAD (Linie mit Dreiecken), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ /pBAD-*gatR* (Linie mit weißen Dreiecken), ST4/74 $P_{gatZ}::gfp$ /pBAD-*reiD* (gestrichelte Linie mit weißen Dreiecken) und ST4/74 Wildtyp (Linie mit Kreuzen).

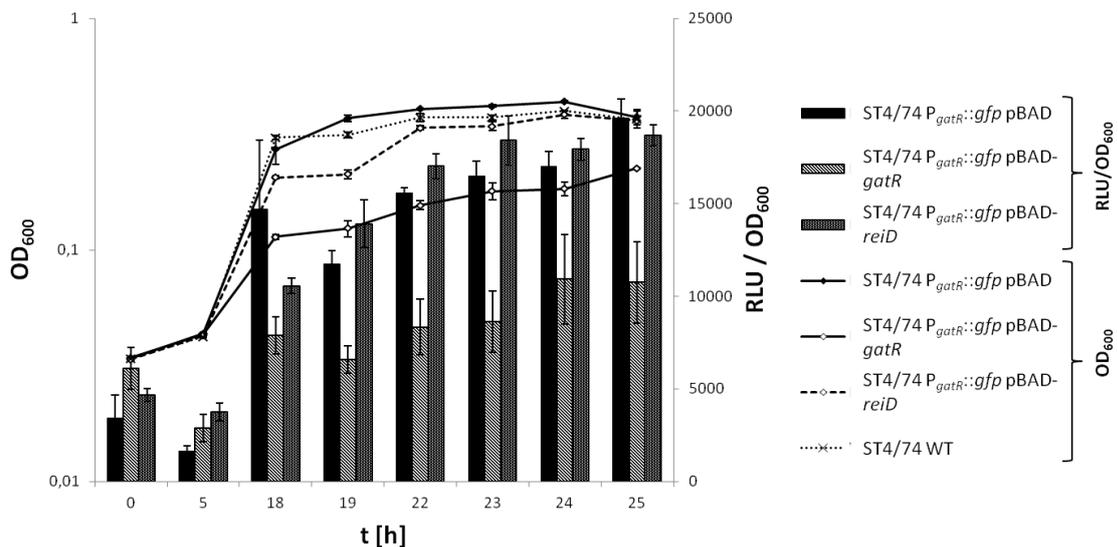


Abbildung A 15: Promotoraktivität von P_{gatR} in M9-Medium mit Galaktitol (Fluoreszenz) in Abhängigkeit der Proteine GatR bzw. ReiD. Dargestellt ist die Fluoreszenzaktivität des Promotors $P_{gatR}::gfp$ in relativen Lichteinheiten (*relative light unit* = RLU) pro OD_{600} . Abgezogen ist die Grundfluoreszenz des Wildtyp-Stammes ST4/74 (nicht gezeigt). Gemessen wurde die RLU/OD_{600} zu Beginn ($t=0$ h), nach Zugabe von Arabinose ($t=5$ h) und nach 18 h stündlich für die Stämme ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ /pBAD (schwarzer Balken), ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ /pBAD-*gatR* (gestreifter Balken) und ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ /pBAD-*reiD* (gepunkteter Balken). Parallel dazu ist die optische Dichte (OD_{600}) von den jeweiligen Stämmen aufgetragen: ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ /pBAD (Linie mit Rauten), ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ /pBAD-*gatR* (Linie mit weißen Rauten), ST4/74 $P_{gatR}::gfp$ /pBAD-*reiD* (gestrichelte Linie mit weißen Rauten) und ST4/74 Wildtyp (Linie mit Kreuzen).

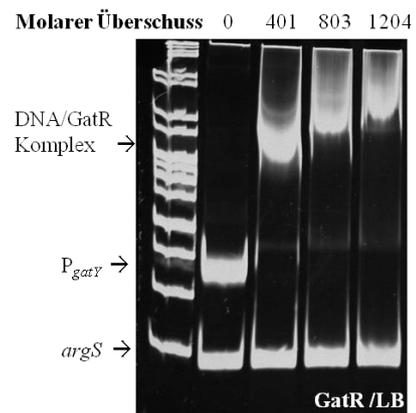
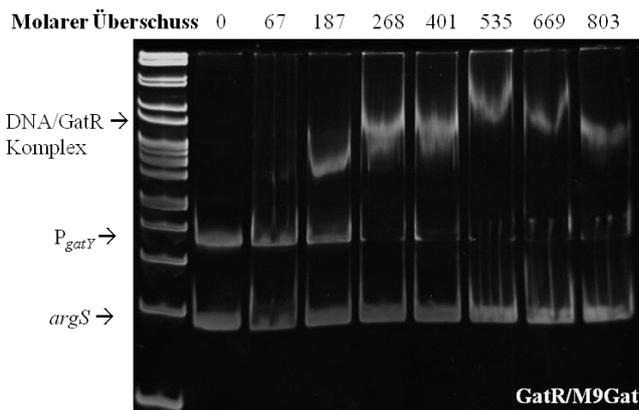
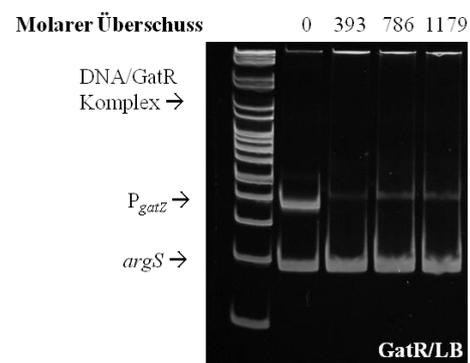
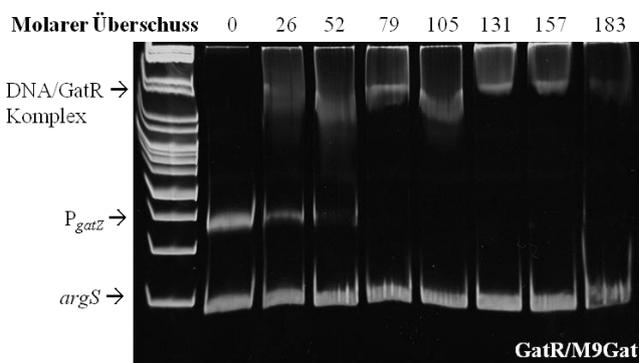
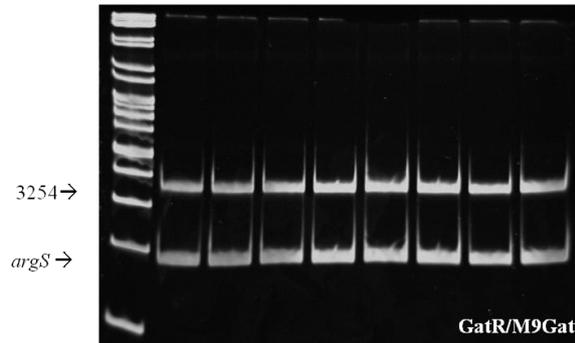
P_{gatY}**P_{gatZ}**

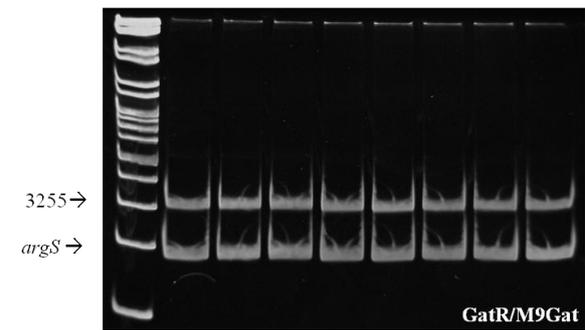
Abbildung A 16: Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an die Promotoren P_{gatY}, P_{gatZ} und P_{gatR}. Dargestellt sind vier EMSAs, bei der jeweils die Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an zwei verschiedenen DNA-Fragmenten getestet wurde. Aufgetragen sind jeweils der molare Überschuss (Protein zu DNA-Menge) und der Marker (links). Als Negativkontrolle diente das DNA-Fragment *argS*, (keine Bindung von GatR). Getestet wurden die DNA-Fragmente P_{gatY} (oben) und P_{gatZ} (unten). Das Protein wurde dabei entweder in M9 mit Galaktitol (links) oder in LB (rechts) überexprimiert. Bei Bindung des Proteins GatR an das jeweilige DNA-Fragment bildet sich ein DNA/GatR-Komplex.

300 bp stromaufwärts von STM3254

Molarer
Überschuss 0 70 197 281 422 562 703 844

**300 bp stromaufwärts von STM3255**

Molarer
Überschuss 0 26 53 79 105 131 158 184

**300 bp stromaufwärts von STM3256**

Molarer
Überschuss 0 27 53 80 107 133 160 186

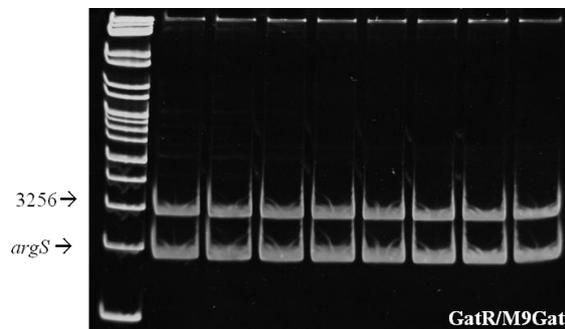
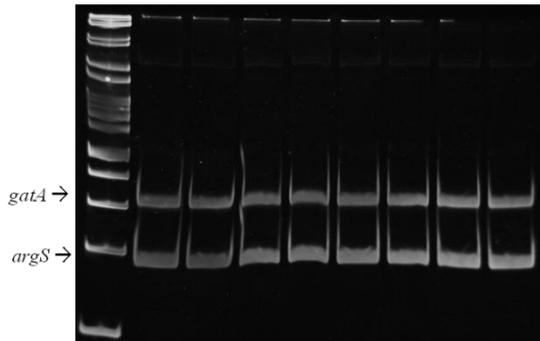


Abbildung A 17: Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an die 300 bp stromaufwärtsliegenden Bereiche von STM3254, STM3255 und STM3256. Dargestellt sind drei EMSAs, bei der jeweils die Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an drei verschiedenen DNA-Fragmenten getestet wurde. Aufgetragen sind jeweils der molare Überschuss (Protein zu DNA-Menge) und der Marker (links). Als Negativkontrolle diente das DNA-Fragment *argS*, (keine Bindung von GatR). Getestet wurden 300 bp stromaufwärtsliegender DNA-Bereiche der Gene STM3254, STM3255 und STM3256. Das Protein wurde dabei in M9 mit Galaktitol überexprimiert. Es erfolgte keine Bindung des Proteins GatR an die DNA-Fragmente.

300 bp stromaufwärts von *gatA*

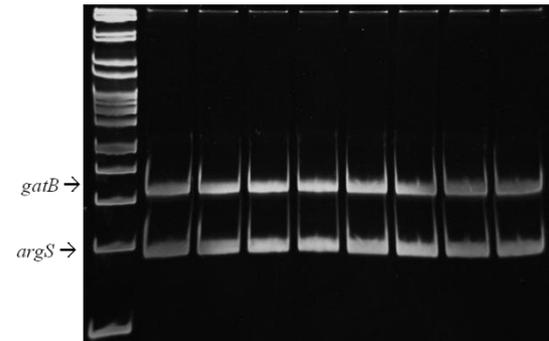
Molarer
Überschuss

	0	26	52	78	105	131	157	183
<i>gatA</i> →								
<i>argS</i> →								

**300 bp stromaufwärts von *gatB***

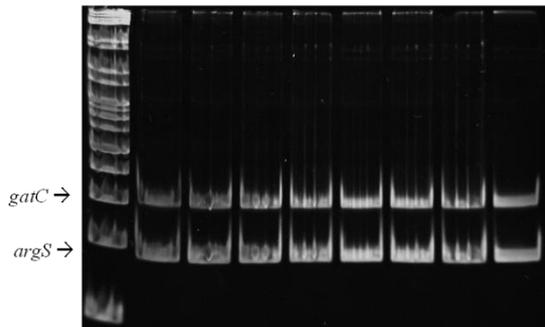
Molarer
Überschuss

	0	27	53	80	107	133	160	187
<i>gatB</i> →								
<i>argS</i> →								

**300 bp stromaufwärts von *gatC***

Molarer
Überschuss

	0	26	51	77	102	128	153	179
<i>gatC</i> →								
<i>argS</i> →								

**300 bp stromaufwärts von *gatD***

Molarer
Überschuss

	0	27	55	82	110	137	165	192
<i>gatD</i> →								
<i>argS</i> →								

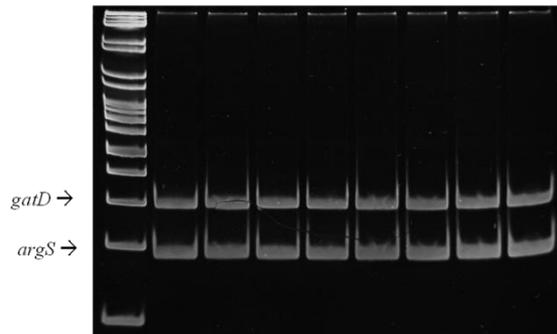


Abbildung A 18: Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an die 300 bp stromaufwärtsliegenden Bereiche von *gatA*, *gatB*, *gatC* und *gatD*. Dargestellt sind vier EMSAs, bei der jeweils die Bindungsfähigkeit des GatR-Proteins an vier verschiedenen DNA-Fragmenten getestet wurde. Aufgetragen sind jeweils der molare Überschuss (Protein zu DNA-Menge) und der Marker (links). Als Negativkontrolle diente das DNA-Fragment *argS*, (keine Bindung von GatR). Getestet wurden 300 bp stromaufwärtsliegender DNA-Bereiche der Gene *gatA*, *gatB*, *gatC* und *gatD*. Das Protein wurde dabei in M9 mit Galaktitol überexprimiert. Es erfolgte keine Bindung des Proteins GatR an die DNA-Fragmente.

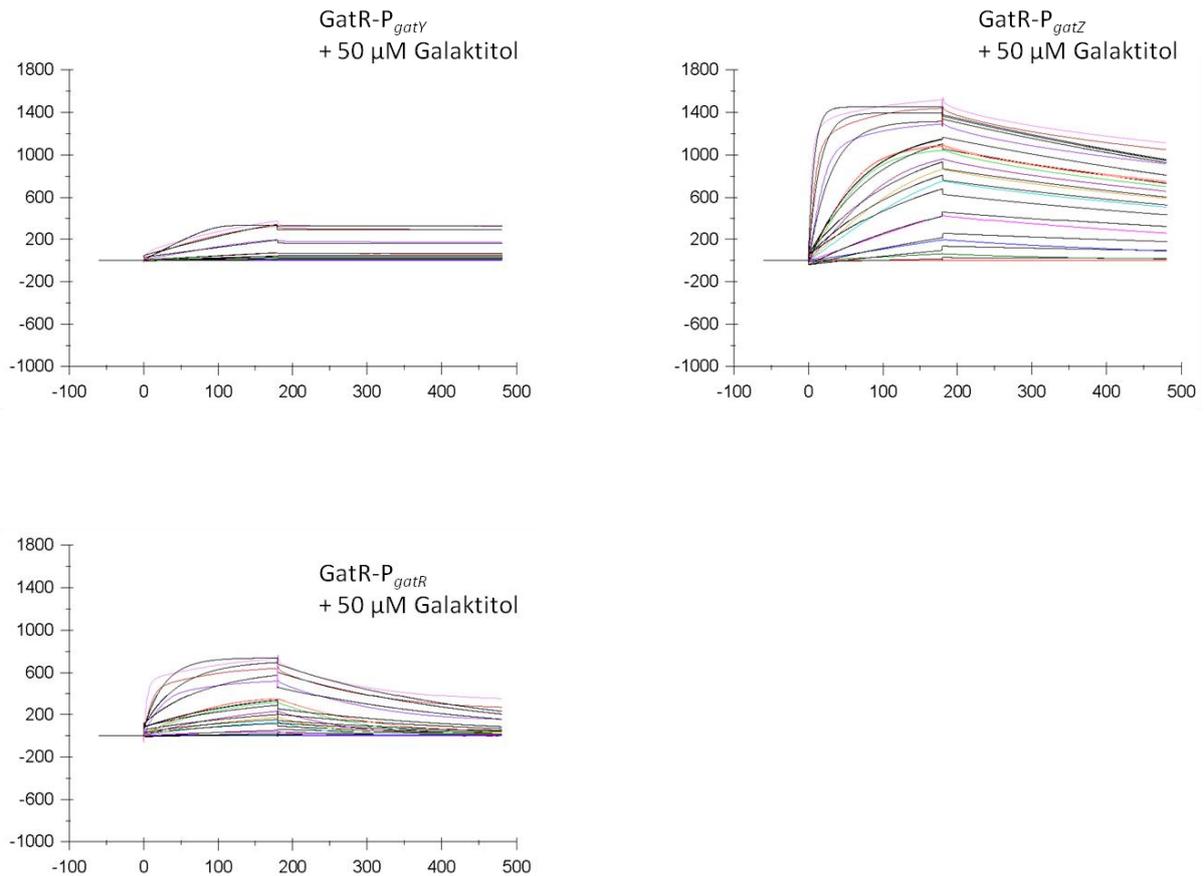


Abbildung A 19: Quantifizierung der DNA-Bindungsfähigkeit von GatR mit 50 μM Galaktitol mittels SPR-Spektroskopie. Die biotinmarkierten DNA-Fragmente P_{gatY} , P_{gatZ} und P_{gatR} wurden auf einem Streptavidin-haltigen Sensorchip befestigt. Anschließend wurde aufgereinigtes GatR-Protein mit 50 μM Galaktitol über den Chip mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ und bei 25 $^{\circ}\text{C}$ (in folgenden Konzentrationen: 0 nM, 0,5 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 2mal 50 nM, 125 nM, 250 nM und 500 nM für GatR; und 0 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 2mal 100 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM für CRP) geführt. Die Kontaktzeit (Assoziation) betrug dabei 180 s, gefolgt von einer 300 s langen Dissoziationsphase.

Tabelle A 9: Die 190 getesteten Substrate auf ihre Verstoffwechselbarkeit durch *S. Typhimurium* (Firma BIOLOG)

Substrat	Substrat	Substrat
1. 1,2-Propanediol	64. L-Methionine	127 Glycerol
2. 2,3-Butanediol	65. L-Ornithine	128 Glycine
3. 2,3-Butanone	66. L-Phenylalanine	129 Glycogen
4. 2-Aminoethanol	67. L-Proline	130 Glycolic Acid
5. 2-Deoxy Adenosine	68. L-Pyroglutamic Acid	131 Glycyl-L-Aspartic Acid
6. 2-Deoxy-DRibose	69. L-Rhamnose	132 Glycyl-L-Glutamic Acid
7. 2-Hydroxy Benzoic Acid	70. L-Serine	133 Glycyl-L-Proline
8. Arabinose	71. L-Sorbose	134 Glyoxylic Acid
9. 3-Hydroxy 2-Butanone	72. L-Tartaric Acid	135 Hydroxy-L-Proline
10. 3-Methyl Glucose	73. L-Threonine	136 l-Erythritol
11. 4-Hydroxy Benzoic Acid	74. L-Valine	137 Inosine
12. 5-Keto-D-Gluconic Acid	75. Malonic Acid	138 Inulin
13. Acetamide	76. Maltitol	139 Itaconic Acid

14. Acetic Acid	77. Maltose	140. Lactitol
15. Acetoacetic Acid	78. Maltotriose	141. Lactulose
16. Adenosine	79. Mannan	142. L-Alaninamide
17. Adonitol	80. Melibionnic Acid	143. L-Alanine
18. α -Keto-Valeric Acid	81. Methyl Pyruvate	144. L-Alanyl-Glycine
19. α -Methyl-DGlucoside	82. m-Hydroxy-Phenyl Acetic Acid	145. Laminarin
20. Amygdalin	83. M-Inositol	146. L-Arabinose
21. Arbutin	84. Mono Methyl Succinate	147. L-Arabitol
22. Bromo Succinic Acid	85. M-Tartaric Acid	148. L-Arginine
23. Butyric Acid	86. Mucic Acid	149. L-Asparagine
24. Capric Acid	87. N-Acetyl-DGalactosamine	150. L-Aspartic Acid
25. Caproic Acid	88. N-Acetyl-DGlucosamine	151. Pyruvic Acid
26. Chondroitin Sulfate C	89. N-Acetyl-D-Glucosaminitol	152. Quinic Acid
27. Citraconic Acid	90. N-Acetyl-Lglutamic Acid	153. Salicin
28. Citramalic Acid	91. N-Acetyl-Neuraminic Acid	154. Sebacic Acid
29. Citric Acid	92. N-Acetyl- β -DMannosamine	155. Sec-Butylamine
30. D,L-Carnitine	93. Oxalic Acid	156. Sedoheptulosan
31. D,L-Malic Acid	94. Oxalomalic Acid	157. Sorbic Acid
32. D,L- α -Glycerol-Phosphate	95. Palatinose	158. Stachyose
33. D.L-Octopamine	96. Pectin	159. Succinamic Acid
34. D-Alanine	97. Phenylethylamine	160. Succinic Acid
35. D-Arabinose	98. p-Hydroxy-Phenyl Acetic Acid	161. Sucrose
36. D-Arabitol	99. Propionic Acid	162. Thymidine
37. D-Aspartic Acid	100. Putrescine	163. Tricarballic Acid
38. D-Cellobiose	101. D-Glucuronic acid	164. Turanose
39. Dextrin	102. Dihydroxy Acetone	165. Tween 20
40. D-Fructose	103. D-Lactic Acid Methyl Ester	166. Tween 40
41. D-Fructose-6-Phosphate	104. D-Malic Acid	167. Tween 80
42. D-Fucose	105. D-Mannitol	168. Tyramine
43. D-Galactonic Acid- γ -Lactone	106. D-Mannose	169. Uridine
44. D-Galactose	107. D-Melezitose	170. Xylitol
45. D-Galacturonic Acid	108. D-Melibiose	171. α -Cyclodextrin
46. D-Gluconic Acid	109. D-Psicose	172. α -D-Glucose
47. D-Glucosamine	110. D-Raffinose	173. α -D-Lactose
48. D-Glucosaminic Acid	111. D-Ribono-1,4-Lactone	174. α -Hydroxy Butyric Acid α -Hydroxy Glutaric
49. D-Glucose-1-Phosphate	112. D-Ribose	175. Acid- γ -Lactone
50. D-Glucose-6-Phosphate	113. D-Saccharic Acid	176. α -Keto-Butyric Acid
51. L-Fucose	114. D-Serine	177. α -Keto-Glutaric Acid α -Methyl-D-
52. L-Galactonic Acid- γ -Lactone	115. D-Sorbitol	178. Galactoside
53. L-Glucose	116. D-Tagatose	179. α -Methyl-DMannoside
54. L-Glutamic Acid	117. D-Tartaric Acid	180. β -Cyclodextrin
55. L-Glutamine	118. D-Threonine	181. β -D-Allose
56. L-Histidine	119. D-Trehalose	182. β -Hydroxy Butyric Acid
57. L-Homoserine	120. Dulcitol	183. β -Methyl-DGalactoside
58. L-Isoleucine	121. D-Xylose	184. β -Methyl-D-Glucoside
59. L-Lactic Acid	122. Formic Acid	185. β -Methyl-D-Glucuronic

60. L-Leucine	123. Fumaric Acid	186. β -Methyl-DXyloside
61. L-Lysine	124. Gelatin	187. γ -Amino Butyric Acid
62. L-Lyxose	125. Gentiobiose	188. γ -Cyclodextrin
63. L-Malic Acid	126. Glucuronamide	189. γ -Hydroxy Butyric Acid
		190. δ -Amino Valeric Acid

Tabelle A 10: Vergleich der Stoffwechselfähigkeit von *S. Typhimurium* LT2 und ST4/74. Ein Vergleich zwischen *S. Typhimurium* LT2 und ST4/74 (aerob und anaerob), welche der insgesamt 190 verschiedenen Substrate (BIOLOG-Platten) metabolisiert werden können. „1“: Stoffwechselfähigkeit des Substrats findet statt; „0,5“ schwache Stoffwechselfähigkeit findet statt; „0“: keine Stoffwechselfähigkeit findet statt. Die Daten von dem Stamm LT2 wurden aus der Publikation (Tracy *et al.*, 2002) verwendet.

Substrate	LT2 Biolog	ST4/74 aerob	ST4/74 anaerob
Succinic Acid	1	1	0
L-Aspartic Acid	1	1	0
L-Proline	1	1	0
D-Alanine	1	1	0
Glycerol	1	1	0
D,L- α -Glycerol-Phosphate	1	1	0
L-Lactic Acid	1	1	0
D-Mannitol	1	0,5	1
L-Glutamic Acid	1	1	0
D,L-Malic Acid	1	1	0
Tween 20	1	0,5	0
L-Rhamnose	1	0	1
Acetic Acid	1	0,5	0
α -D-Glucose	1	0,5	1
L-Asparagine	1	1	0
D-Aspartic Acid	1	0,5	0
Tween 40	1	1	0
L-Glutamine	1	0,5	0
Tween 80	1	1	0
Glycyl-L-AsparticAcid	1	1	0
Citric Acid	1	1	0
Fumaric Acid	1	1	0
Bromo SuccinicAcid	1	1	0
Propionic Acid	1	1	0
Glycyl-LGlutamicAcid	1	1	0
TricarballicAcid	1	0,5	0
L-Threonine	1	0,5	0
L-Alanine	1	0,5	0
L-Alanyl-Glycine	1	1	0
Mono MethylSuccinate	1	1	0
L-Malic Acid	1	1	0
Glycyl-L-Proline	1	1	0

P-HydroxyPhenyl AceticAcid	1	1	0
M-HydroxyPhenyl AceticAcid	1	1	0
Tyramine	1	1	0
Glucuronamide	0,5	1	0
D-Raffinose	0	1	0
5-Keto-DGluconicAcid	0,5	0,5	0
D-Lactic AcidMethyl Ester	0,5	0,5	0
Melibionic Acid	1	1	0,5
Succinamic Acid	0	0,5	0
L-Alaninamide	0	0,5	0
L-Arginine	0	0,5	0
Glycine	0	0,5	0
L-Histidine	0	0,5	0
L-Ornithine	0	0	1
D,L-Carnitine	0	0	0,5

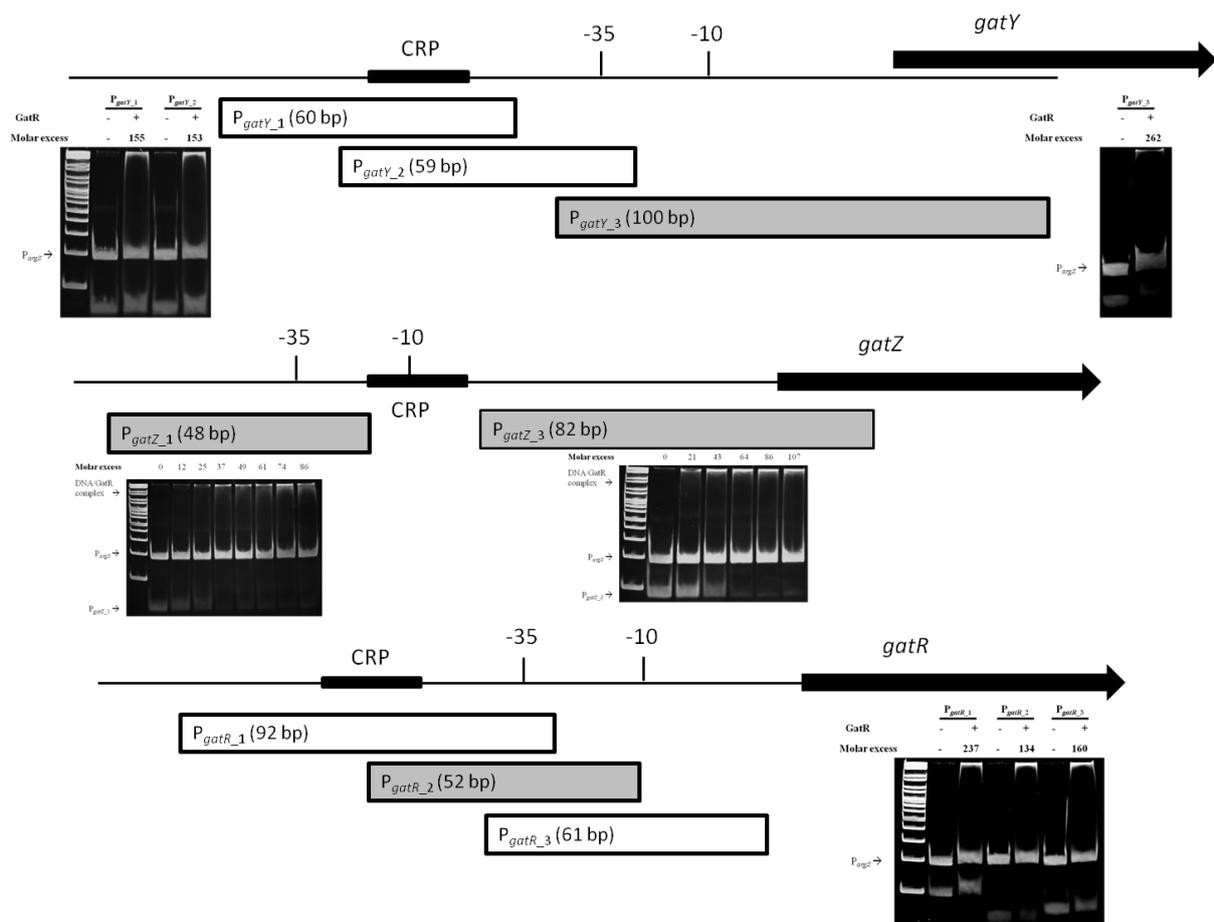


Abbildung A 20: Lokalisierung der GatR-Zielsequenz. Überexprimiertes GatR-His6-Protein wurde aus dem Stamm ST4/74 *ΔaraA* aufgereinigt und mit den Fragmenten P_{gatX_X} inkubiert. Putative -35- und -10-Regionen sind auf den drei Promotorbereiche der Gene *gatY*, *gatZ* und *gatR* aufgetragen. cAMP-CRP-Bindungsstellen sind als schwarze Box angedeutet. Fragmente, die von GatR gebunden wurden, sind grau unterlegt. Weiße Fragmente wurden nicht von GatR gebunden.

6.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei allen bedanken, die Anteil am Gelingen der Arbeit genommen haben.

Zuerst möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem sehr interessanten Thema zu arbeiten und mich dabei in meiner fachlichen und persönlichen Weiterentwicklung als Wissenschaftlerin immer unterstützt hat. Ich bedanke mich für die Anleitung und alle Hilfe im Rahmen meiner Doktorarbeit, sowie für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Vielen Dank auch für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die mir dabei großzügig gewährte Handlungsfreiheit.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dirk Haller, Leiter des Lehrstuhls für Ernährung und Immunologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, für die schnelle und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenso danke ich auch Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer dafür, dass ich meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl Mikrobielle Ökologie, Department für Grundlagen der Biowissenschaften, Wissenschaftszentrum Weihenstephan anfertigen durfte und er den Prüfungsvorsitz übernommen hat.

Ein großer Dank geht auch an Angela Felsl und Patrick Schiwiek, die mich im Labor immer tatkräftig unterstützt haben und mir auch in besonders stressigen Phasen immer hilfreich zur Seite standen.

Ganz speziell möchte ich mich auch bei allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der AG Fuchs bedanken: Jessica Hellinckx, Tanja Kern, Johannes Rothhardt, Jakob Schardt, Katharina Springer und Lena Staib. Danke für alle die witzigen Momente und (nicht-) wissenschaftlichen Diskussionen, die mir geholfen haben, Herausforderungen erfolgreich zu meistern. Es war eine sehr schöne Zeit mit euch allen!

Ein weiteres großes Dankeschön geht an alle Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Ökologie. Danke für die motivierenden Worte, Ideen, Anregungen und die interessante Zeit mit euch am Institut. Dieser Dank geht auch an „meine Studenten“ Josephine Maaz, Franziska Zörndlein, Lisa Kreutzer und Katja Fritschle.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitgliedern der PhD-Graduate School „Microbe-Host Interaction“, den Tierpflegern des Kleintierforschungszentrums und meinen Kooperationspartnern PD Dr. Ralf Heermann und Dr. Thomas Clavel bedanken, die mir jederzeit mit Rat zur Seite standen.

Ganz besonders danke ich auch Maria-Elisabeth Böhm und Lea Fellner für die gemeinsame Zeit, die wir während und außerhalb der Arbeit miteinander verbracht haben.

Von tiefstem Herzen danke ich Marcel, meinen Schwestern Daniela, Serena und Friederike, sowie meinen Eltern Eugen und Sigrid Nolle für ihre unermüdliche Unterstützung und die vielen aufmunternden und aufbauenden Gespräche. Ihr habt mir die Kraft und Ausdauer gegeben, diese Doktorarbeit erfolgreich zu meistern. Danke, ihr seid immer ein wichtiger Teil meines Lebens!

6.2 Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Lehrstuhles für Mikrobielle Ökologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Nolle N., Fels A., Heermann H, Fuchs T.M. *Genetic characterization of the galactitol utilization pathway of Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Journal of Bacteriology (angenommen)

Nolle N., Clavel T., Fuchs T.M. *Influence of host diet on transcriptome of S. Typhimurium and bacterial community in mouse gut.* (in Vorbereitung)

Tagungsbeiträge

Nolle, N. *Genetic characterization of the galactitol utilization pathway of the zoonotic Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Vortrag auf der Konferenz der DVG Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie in Jena (31.08-02.09.2016)

Nolle N., Clavel T., Fuchs T.M. *Influence of host diet on the proliferation and the transcriptome of intestinally replicating Salmonella Typhimurium.* Poster auf dem Symposium „Innate Immunity in Host-Pathogen Interactions“ in Heidelberg (26.-29.06.2016)

6.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Fakultät, dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel

***Salmonella* Typhimurium-Infektion: Ernährungsabhängiges Transkriptom und Charakterisierung eines Galaktitol-spezifischen Aufnahmesystems**

Im Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Department für Grundlagen der Biowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt haben

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich einverstanden.

Mörfelden-Walldorf, den

.....

Nicoletta Nolle