

**Anpassung von *Salmonella* spp. an neue Wirte
durch horizontalen Transfer translozierter
Effektorproteine**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Susanne Miroid-Mei
aus Saarlouis

Juli, 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller
 2. Gutachter: Prof. Dr. B. Averhoff
- Sondergutachter: Prof. Dr. R. Haas

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 2001

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Miold, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E. & Hardt, W. D. (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 9845-50.

Rudolph, M. G., Weise, C., Miold, S., Hillenbrand, B., Bader, B., Wittinghofer, A. & Hardt, W. D. (1999). Biochemical Analysis of SopE from *Salmonella typhimurium*, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for EhoGTPases. *J. Biol. Chem.* 274, 30501-9.

Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S. & Hardt, W. D. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol. Microbiol.* 36, 1206-21.

Prager, R., Miold, S., Tietze, E., Strutz, U., Knüppel, B., Rabsch, W., Hardt, W. D. & Tschäpe, H. (2000). Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Int. J. med. Microbiol.* 290, 605-617.

Miold, S., Ehrbar, K., Weissmüller, A., Prager, R., Tschäpe, H., Rüssmann, H. & Hardt, W. D. (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including SPI1, SPI5 and *sopE2*. *J. Bacteriol.* 183, 2348-2358.

Zhang, S., Santos, R. L., Tsolis, R. M., Miold, S., Hardt, W.-D., Adams, L. G. & Bäuml, A. J. (2001). Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. zur Publikation eingereicht.

Miold, S., Rabsch, W., Tschäpe, H. & W. D. Hardt (2001). Integration of SopE Φ into the *attL*-site of a cryptic prophage enhances virulence of *Salmonella typhimurium* ATCC14028s. Manuskript in Vorbereitung.

Miold, S., Rabsch, W., Tschäpe, H. & W. D. Hardt (2001). Transfer of the *Salmonella* Type III effector *sopE* between unrelated phage families. *J. Mol. Biol.* 312, 7-16.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Taxonomie der Gattung <i>Salmonella</i>	1
1.2	<i>Salmonella</i> -Referenzstammsammlungen	2
1.3	Wirtsspezifität von <i>Salmonella</i> spp.....	2
1.4	Virulenzfaktoren	3
1.5	Evolution enteropathogener <i>Salmonella</i> spp.	4
1.6	Allgemeine Definition von Pathogenitätsinseln	7
1.7	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel 1 (SPI1).....	8
1.8	Evolution der Pathogenität und Anpassung von <i>Salmonella</i> spp. an neue Wirte	14
2	ZIEL DIESER ARBEIT	17
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Bakterienstämme und Plasmide	19
3.2	Enzyme, besondere Chemikalien und Puffer	22
3.3	Mikrobiologische Methoden.....	22
3.4	Molekulargenetische Methoden	24
3.5	Biochemische Standardmethoden.....	28
3.6	Immunologische Methoden	28
3.7	Bioinformatische Methoden	29
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Evolution des Effektorprotein-Repertoires von <i>Salmonella</i> spp.	31
4.2	Phylogenetische Analyse von <i>sopB</i> , <i>sopD</i> und <i>sopE2</i>	40
4.3	Epidemiologie von <i>Salmonella</i> spp. und das Auftreten von <i>sopE</i>	42
4.4	SopE ist in Typhimurium im Genom eines Prophagen der P2-Familie kodiert ..	45
4.5	Horizontaler Transfer von <i>sopE</i> durch lysogene Konversion mit SopE Φ	50

4.6	Analyse der SopE Φ -Integrationsstelle	56
4.7	Vergleiche von SopE Φ mit dem SopE Φ -verwandten Prophagen in Typhi.....	60
4.8	Einfluß der lysogenen Konversion mit SopE Φ auf die Virulenz von <i>Salmonella</i> spp.....	61
4.9	SopE kodierende Sequenzen bilden 3 Gruppen hoher Sequenzähnlichkeit.....	65
4.10	Rolle der homologen Rekombination beim Transfer von <i>sopE</i> zwischen nicht-verwandten Bakteriophagen	69
5	DISKUSSION	75
5.1	Evolution der Wirtszellinvasivität von <i>Salmonella</i> spp.....	75
5.2	Das Konzept der Pathogenitätsinsel und der „Selfish“-Operontheorie.....	78
5.3	Horizontaler Transfer von <i>sopE</i> durch lysogene Konversion mit SopE Φ	79
5.4	Lysogene Konversion mit SopE Φ moduliert die Virulenz von <i>Salmonella</i> -Stämmen.....	79
5.5	Charakterisierung der SopE Φ -Integrationsstelle.....	81
5.6	Der SopE Φ -ähnliche Bakteriophage SopE Φ -Ty in Typhi.....	81
5.7	Transfer von <i>sopE</i> zwischen verschiedenen Bakteriophagenfamilien	82
5.8	Rolle der Phagen für die Evolution der pathogenen Eigenschaften von <i>Salmonella</i> spp.....	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	ANHANG	97
9.1	Verteilung der Gene der SPI1-abhängig translozierten Proteine in <i>Salmonella</i> spp.....	97
9.2	Analyse der λ -ähnlichen Sequenzen, die <i>sopE</i> in Gallinarum, Hadar und Enteritidis flankieren	98
9.3	Die <i>Salmonella</i> -Referenzstammsammlung C	99
10	DANKSAGUNG	101
11	LEBENS LAUF	103

1 Einleitung

1.1 Taxonomie der Gattung *Salmonella*

Salmonella spp. wurde erstmals 1880 von Eberth beschrieben und 1884 von Gaffky kultiviert (Burrows, 1959). Bereits sehr früh wurde entdeckt, daß *Salmonella* spp. eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenstrukturen (Lipopolysaccharid / „O“-Antigene und flagelläre „H“-Antigene) aufweisen und daß sich Antiseren, die gegen diese Oberflächenkomponenten gerichtet sind, für Agglutinationsuntersuchungen zur Unterscheidung vieler Stämme eignen. Ein Sortiment spezifischer Antiseren wurden von Kauffmann und White zusammengestellt, das die Unterscheidung von mehr als 2000 Stämmen („Serovare“) erlaubt (Kauffmann White Schema; Popoff *et al.*, 1992; Popoff und Le Minor, 1992). Für diese Serovare wurde eine binomiale Nomenklatur eingeführt (z.B. *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*), als handele es sich um getrennte Spezies. Diese Auffassung ist nach heutigem Erkenntnisstand zwar nicht mehr haltbar, doch wird aus praktischen Überlegungen diese binomiale Nomenklatur auch heute noch häufig angewendet.

Die Serotypisierung ist auch heute noch für die mikrobiologische Diagnostik und die epidemiologische Überwachung von großem praktischen Nutzen. Sie stellt jedoch keine Methode dar, um die phylogenetische Verwandtschaft zwischen verschiedenen Stämmen der Gattung *Salmonella* darzustellen. Erst in jüngerer Zeit wurden Versuche unternommen, phylogenetisch begründete Klassifizierungsschemata einzuführen. Dabei wurden DNS-Hybridisierungsanalysen, Multilocus-Enzymelektrophorese (MLEE) und Biotypisierungen eingesetzt (Crosa *et al.*, 1973; Ewing, 1986, Le Minor *et al.*, 1986; Reeves *et al.*, 1989; Boyd *et al.*, 1996). Aufgrund der Ergebnisse dieser molekularen Analysen wurde die Gattung *Salmonella* in die zwei Spezies *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica* unterteilt. Die Spezies *Salmonella enterica* unterteilt sich in 7 weitere Subspezies, die als I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII bezeichnet werden (Abbildung 1). Die Stämme einer *S. enterica*-Subspezies werden weiterhin anhand ihres Agglutinationsmusters (s.o.) in verschiedene Serovare unterteilt. Das Serovar wird dabei nicht klein und kursiv, sondern groß und in Normalschrift angegeben, um deutlich zu machen, daß es sich nicht um eine Spezies, sondern um eine Stamm- bzw. Isolatbezeichnung handelt. Nach dieser mittlerweile allgemein akzeptierten Nomenklatur wird der klassische Laborstamm „*Salmonella typhimurium* LT2“ als „*Salmonella enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium LT2“ bezeichnet. Vereinfachend kann dieser Stamm nach dieser Nomenklatur auch Typhimurium LT2 bezeichnet werden. Diese Nomenklatur wird von *Salmonella*-Referenzzentren der Weltgesundheitsorganisation verwendet und liegt auch der vorliegenden Arbeit zu Grunde. Die Beibehaltung des taxonomisch ungenau definierten Begriffs des „Serovar“ bei dieser Nomenklatur ist dadurch zu erklären, daß (aus noch ungeklärten Gründen) Isolate eines Serovar häufig die selbe Wirtsspezifität haben oder sehr ähnliche Krankheitssymptome hervorrufen.

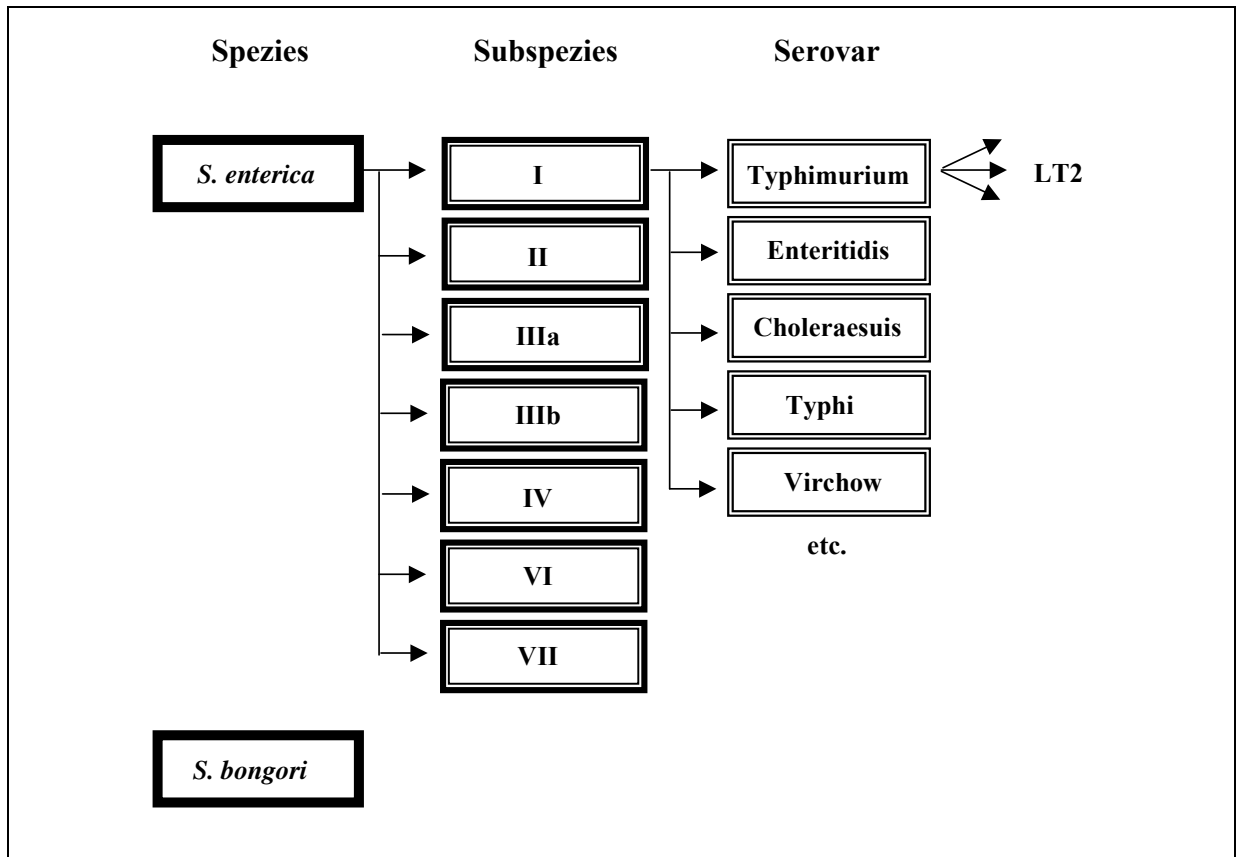


Abbildung 1: Taxonomie von *Salmonella* spp.. Dargestellt ist die heute gültige Einordnung der Gattung *Salmonella* in Spezies, Subspezies, Serovare und Stämme.

1.2 *Salmonella*-Referenzstammsammlungen

Im Labor von Prof. R. K. Selander wurden drei *Salmonella*-Referenzstammsammlungen zusammengestellt, die jeweils eine repräsentative Auswahl unterschiedlicher taxonomischer Klassen der Spezies *S. bongori* und *S. enterica* darstellen. Die *Salmonella*-Referenzstammsammlung A (SARA) setzt sich aus 72 Isolaten der *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare Typhimurium, Saintpaul, Heidelberg, Paratyphi B, Java und München zusammen (Beltran *et al.*, 1991). Die SARB-Sammlung besteht aus 72 Isolaten, die zu 37 verschiedenen Serovaren der *S. enterica*-Subspezies-I gehören (Boyd *et al.*, 1993), und die SARC-Sammlung setzt sich jeweils aus zwei Stämmen der *S. enterica* Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI, VII und aus zwei *S. bongori*-Stämmen zusammen (Boyd *et al.*, 1996, Kapitel 9.3). Die phylogentische Verwandtschaft der Stämme der SARA-, SARB- und SARC-Referenzstammsammlungen wurde durch Multilocus-Enzymelektrophorese (MLEE) von Haushaltsproteinen ermittelt (Beltran *et al.*, 1991; Boyd *et al.*, 1993; Boyd *et al.*, 1996).

1.3 Wirtsspezifität von *Salmonella* spp.

Mehr als 90 % der Salmonellosen bei Warmblütern werden von Stämmen der *S. enterica*-Subspezies-I verursacht. Salmonellosen gehören zu den drei häufigsten registrierten lebensmittelbedingten bakteriellen Darmerkrankungen. In Deutschland werden jährlich ungefähr 100.000 *Salmonella*-Fälle gemeldet, wobei die Dunkelziffer aller Infektionen wesentlich höher liegt (Tschäpe, 2000). Bei Menschen tritt jeweils nur eine sehr kleine Zahl von Stämmen (sogenannte Epidemiestämme) auf. Stämme der *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare Enteritidis

und Typhimurium verursachen dabei heutzutage ca. 80 % aller humanen Salmonellosen (Gericke *et al.*, 1999).

Bestimmte Serovare, wie beispielsweise *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhi-Stämme, sind an einen speziellen Wirt adaptiert und können nur systemische Infektionen im Menschen und in Schimpansen auslösen (Miller *et al.*, 1995; Kingsley und Bäumler, 2000). Andere *S. enterica*-Serovare zeigen ein breiteres Wirtsspektrum. Zu dieser Gruppe zählt *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium, das in einer Vielzahl von warmblütigen Wirbeltieren, wie Rindern, Schafen, Pferden oder auch beim Menschen Gastroenteritiden (Durchfallerkrankungen) verursacht (Kingsley und Bäumler, 2000).

Der Krankheitsverlauf der Salmonellose wird aber auch von der Spezies des infizierten Wirtes bestimmt. *S. enterica*-Subspezies-I Serovar-Typhimurium ruft beispielsweise im Menschen und in Kälbern milde bis akute Enterocolitis hervor. Die Symptomatik beschränkt sich meistens auf eine lokale Darmentzündung; eine Bakteriämie ist eine seltene Komplikation und tritt nur in 1-8 % der Fälle auf. Bei einer murinen Typhimurium-Salmonellose kommt es hingegen zur systemischen Infektion. Die infizierten Mäuse erliegen im allgemeinen nach 5-6 Tagen einem septischen Schock (Tsolis *et al.*, 1999c). Die molekularen Mechanismen, welche der Wirtsspezifität und den unterschiedlichen Virulenzeigenschaften der einzelnen *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare zugrunde liegen, sind noch weitgehend unbekannt.

1.4 Virulenzfaktoren

Die meisten Untersuchungen an Virulenzfaktoren von *S. enterica* sind am Modell der murinen Typhimurium-Salmonellose durchgeführt worden (Tsolis *et al.*, 1999c). Es wird im allgemeinen angenommen, daß die Ergebnisse dieser Untersuchungen auf die humane Typhus-Infektion übertragbar sind. Für die Analyse von Virulenzfaktoren, welche für humane *Salmonella*-Gastroenteritiden eine Rolle spielen, ist erst vor kurzem ein Rindermodell entwickelt worden (Tsolis *et al.*, 1999c; Wallis und Galyov, 2000).

Generell werden folgende Klassen an Virulenzfaktoren unterschieden:

„Bona fide“ Faktoren:

Dies sind Virulenzfaktoren, die in verwandten, apathogenen Bakterien nicht vorkommen. Manche dieser Faktoren wirken in der frühen Infektionsphase. Zu diesen Faktoren gehören die fimbriellen Adhäsine, die im *lpf*-Operon kodiert sind (Bäumler *et al.*, 1996) und die Adhäsion von *Salmonella* spp. an Darmzellen ermöglichen. Weiterhin werden die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel-1 (SPI1) und die dazugehörigen Effektoren zu dieser Virulenzfaktorklasse gezählt (Galan, 1999; Wallis und Galyov, 2000). Andere „bona fide“-Faktoren ermöglichen die Vermehrung der Bakterien in phagozytischen Zellen. Hierzu zählen das *Salmonella*-Virulenzplasmid mit dem *spv*-Operon (Gulig *et al.*, 1998) und die Gene der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel-2 (SPI2; Shea *et al.*, 1996; Hensel, 2000). Diesen „bona fide“-Virulenzfaktoren ist gemein, daß ihre Wirkung auf spezifische Wechselwirkungen mit bestimmten Strukturen des Wirtsorganismus beruht. Häufig handelt es sich hierbei um hochspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Virulenzfaktoren, die Haushaltsfunktionen besitzen:

Diese Gengruppe kodiert Funktionen, welche beispielsweise für die Resistenz gegenüber Abwehrmechanismen des Wirtes wie z.B. oxidativen Prozessen, für die Synthese von Lipopolysaccharid (LPS) und für die Aufnahme bzw. Herstellung von Nährstoffen unbedingt benötigt werden (Germanier und Furer, 1971; Stocker *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1991; Bäumler *et al.*, 1994). Diese Faktoren können auch bei apathogenen Bakterien gefunden werden, spie-

len dort aber keine virulenzvermittelnde Rolle. Sie ergänzen die „bona fide“-Virulenzfaktoren, indem sie das allgemeine Überleben im Wirt ermöglichen und zur Resistenz gegen unspezifische Abwehrmechanismen des Wirtes beitragen.

Regulatoren als Virulenzfaktoren:

Die Expression der „bona fide“-Virulenzgene und der Haushaltsgene muß exakt kontrolliert werden. Folgende Regulatorgene sind daran beteiligt: *cya/crp*, *phoPQ*, *hilA*, *rpoS*, *sirA* und *slyA* (Fields *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1992; Bajaj *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1996; Garcia Vescovi *et al.*, 1996; Buchmeier *et al.*, 1997). Inaktivierung jedes einzelnen dieser Regulatorgene führt zur dramatischen Verringerung der Virulenz. So überleben beispielsweise Kälber, die mit einer *hilA*-Mutante infiziert wurden, wohingegen alle mit dem Wildtypstamm infizierten Tiere sterben (Tsolis *et al.*, 1999b). Genauso ist die mittlere letale Dosis (LD₅₀) von *phoP*- bzw. *phoQ*-*Salmonella*-Mutanten bei intraperitonealer Inokulation in Balb/c-Mäuse ungefähr 5-fach höher im Vergleich zum Wildtyp (Miller *et al.*, 1989). Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, daß selbst kleine Verschiebungen in den Expressionsraten der Virulenzfaktoren die Überlebensfähigkeit des Bakteriums im Wirt stark herabsetzen.

1.5 Evolution enteropathogener *Salmonella* spp.

Bakterien besiedeln eine Vielzahl von Lebensräumen. Auch die Haut und der Gastrointestinaltrakt von Tieren sind permanent mit Bakterien besiedelt. Die meisten besiedelnden Bakterien rufen keine Infektion hervor. Solche Bakterien werden als Kommensalen bezeichnet. Als pathogene Bakterien bezeichnet man solche, die Krankheitszustände im besiedelten Wirt auslösen können. Beide bakteriellen Lebensformen, ob als Kommensale oder als Pathogen, erfordern in gleicher Weise die Anpassung an die spezielle Nische im Wirtstier. Bei der Besiedlung des Darms sind beispielsweise Adhäsine der Darmoberfläche, Resistenz gegen Detergenzien der Gallensekrete (Cholsäuren) oder die Anpassung an das anaerobe Milieu von Bedeutung. Es wird angenommen, daß sich die pathogenen Enterobacteriaceae von einem gemeinsamen kommensalen Vorfahren ableiten, der Teil der Darmflora war. Die Entwicklung hin zu einem pathogenen Enterobakterium erfolgte durch den Erwerb zusätzlicher Virulenzvermittelnder Eigenschaften. Neue Faktoren bzw. Virulenzfaktoren können auf unterschiedliche Art und Weise erworben werden.

1.5.1 Mutationen

Sukzessive Punktmutationen können zur Modifizierung bzw. Optimierung eines bereits vorhandenen Proteins beitragen. Dieser Mechanismus ermöglicht im Gegensatz zum horizontalen Gentransfer zunächst nur graduelle Änderungen und ist wenig geeignet, die schnelle Entstehung neuer Epidemiklone, wie z.B. bei *Salmonella* spp., zu erklären.

1.5.2 Horizontaler Gentransfer

Unter horizontalem Gentransfer wird die asexuelle Übertragung von Genen zwischen Organismen verstanden. Bei Prokaryonten ist diese Form der einzige Weg des Genaustausches und findet sowohl innerartlich als auch über Artgrenzen hinweg statt. Ein wichtiges Kennzeichen horizontal transferierter Gene ist die unterschiedliche Häufigkeit der genutzten Kodons sowie der G+C-Gehalt des transferierten Gensegments, der sich oft von dem des Genoms des Empfängers unterscheidet (Ochman *et al.*, 2000). Bei Genomvergleichen stellt man bei horizontal transferierten Genen häufig eine Ähnlichkeit zu einer Region aus einem nichtverwandten Bakterium fest (Ochman *et al.*, 2000). Außerdem ist das transferierte Genstück phylogenetisch oftmals asymmetrisch in einer Bakterienpopulation verteilt. Dabei ist das horizontal erworbene DNS-Fragment nicht in sämtlichen nahe verwandten Stämmen einer Spezies vor-

handen, und phylogenetische Stammbäume, die anhand der DNS-Sequenz der horizontal erworbenen Fragmente erstellt werden, unterscheiden sich in ihrer Topologie von den Stammbäumen, die die phylogenetische Verwandtschaft der entsprechenden Bakterienstämme beschreiben (Ochman *et al.*, 2000). Weitere Kennzeichen des horizontalen Gentransfers sind Reste mobiler genetischer Elemente (z. B. Transferorigins, Phagenintegrationsstellen, IS-Elemente; Ochman *et al.*, 2000).

Seit der Abspaltung von *Salmonella* spp. von *Escherichia* spp. vor ca. 100 Millionen Jahren sind ungefähr 620 kb neuer DNS horizontal aufgenommen bzw. im Genom ausgetauscht worden (Lawrence, 1997). Diese Zahlen lassen vermuten, daß die horizontale Aufnahme und auch Deletion von Gensequenzen eine wichtige Triebkraft der bakteriellen Evolution darstellt. Auch die Genomvergleiche zwischen verschiedenen *Salmonella*-Stämmen beweisen, daß der Transfer von Genen keine seltenes Ereignis darstellt und zur Diversifizierung einer Bakterienart beitragen kann. So ist gezeigt worden, daß sich zwei *Salmonella*-Stämme um bis zu 20 % in ihrer Chromosomenlänge unterscheiden können (= 1 Million Basenpaare; Lan und Reeves, 1996). Es wird vermutet, daß zumindest ein Teil der hinzugewonnenen Gensequenzen die Virulenzeigenschaften des Bakteriums verändern und zur Entstehung neuer Klone und somit neuer Epidemien beitragen. Genetische Mechanismen, die zur Entstehung von *S. enterica*-Stämmen mit neuen Kombinationen von Virulenzfaktoren beitragen, sind demnach für die Anpassung an neue Wirte und der Genese neuer Epidemiestämme von großer Bedeutung (Hardt *et al.*, 1998a, Miao *et al.*, 1999; Miold *et al.*, 1999; Figueroa-Bossi *et al.*, 2001).

1.5.3 Mechanismen des horizontalen Gentransfers für Bakterien

Es gibt verschiedene genetische Mechanismen, die den horizontalen Transfer von Genen bzw. größeren Genomabschnitten vermitteln können. Die Effektivität dieser Transfermechanismen bestimmt in starkem Maße die Entwicklungsrate eines Bakteriums.

Bei der natürlichen Transformation wird von der Bakterienzelle „nackte“ DNS aufgenommen. Dies ist ein unspezifischer Gentransfermechanismus, durch den theoretisch jede DNS, die aus lysierten Mikroorganismen, Pflanzen oder Tieren freigesetzt wird, aufgenommen werden kann (Lorenz und Wackernagel, 1994). Voraussetzung ist die Kompetenz der Empfängerzelle, die mit bestimmten physiologischen Zuständen der Zellen verbunden sein kann (Lorenz und Wackernagel, 1994). Bei *Salmonella* spp. konnte bislang keine natürliche Kompetenz nachgewiesen werden.

Die bakterielle Konjugation stellt eine weitere Möglichkeit des horizontalen Transfers dar. Hierbei wird ein enger physikalischen Kontakt zwischen Donor- und Empfängerzelle benötigt. Bei gram-negativen Bakterien stellen Pili den Kontakt her (Dreiseikelmann, 1994). Die Konjugation kann durch Gene der konjugativen Plasmide gesteuert werden (z. B. F-Plasmide). Es können sowohl Plasmide als auch chromosomale DNS übertragen werden. Letzteres ist bei Hfr-Stämmen der Fall (Sanderson, 1996). Die Konjugation stellt einen wichtigen Mechanismus bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen dar. Konjugative Plasmide können neben Virulenz- und Resistenzloci auch weitere genetische Elemente (IS-Elemente, Transposons oder Integrons) enthalten, die es erlauben, die übertragene DNS in der Empfängerzelle umzuorganisieren (Hall und Collins, 1995; Salyers *et al.*, 1995). So können beispielsweise horizontal übertragene Gene von einem Plasmid in das Chromosom integrieren (Ochman *et al.*, 2000). Generell stellt der horizontale Transfer über Konjugation einen effektiven Mechanismus für evolutive Prozesse dar. Die Effizienz der Konjugation ist allerdings von dem Kontakt zwischen zwei Bakterien abhängig und es können nur wenige Empfänger erreicht werden.

Einen weiteren effizienten Mechanismus für den horizontalen Gentransfer stellt die Transduktion dar. Unter der Transduktion versteht man die Übertragung genetischen Materials durch Bakteriophagen von einem Bakterium auf ein anderes. Man unterscheidet unspezifische, allgemeine Transduktion und spezifische, spezialisierte Transduktion. Bei der unspezifischen Transduktion werden anstelle der Phagen-DNS Teile der Bakterien-DNS verpackt. Die Verpackung des Phagengenoms wird normalerweise durch eine Verpackungssequenz (*pac-site*) gesteuert. Es erfolgt an dieser Erkennungsstelle ein Schnitt und replizierte Phagen-DNS wird über einen *Headfull*-Mechanismus in die Kapseln der Nachkommenphagen gespult. Besitzen bakterielle Sequenzen zufälligerweise diese *pac*-Erkennungsstelle, können auch diese Sequenzen fälschlicherweise in die Phagenkapseln verpackt werden (Schmieger, 1982). Solche Phagenpartikel können zwar weitere Zellen infizieren, die transduzierte bakterielle DNS kann sich jedoch nicht autonom replizieren. Durch Rekombination kann diese DNS allerdings in das Chromosom des Empfängers integrieren und sich somit in der neuen Zelle etablieren (Zinder und Lederberg, 1952; Schmieger, 1972). Zur spezifischen Transduktion kommt es, wenn ein Prophage induziert wird, sich unpräzise ausschneidet und dadurch angrenzende bakterielle Gensequenzen mitverpackt (Weisberg, 1986). Diese bakteriellen DNS-Abschnitte werden dann bei einer Lysogenisierung zusammen mit dem Phagengenom ins Genom der Empfängerzelle integriert. Bei der spezifischen Transduktion werden somit nur bestimmte Sequenzen transferiert, die in der Nachbarschaft zur Phagenintegrationsstelle liegen (Weisberg, 1986), während bei der unspezifischen Transduktion jede beliebige Bakteriensequenz betroffen sein kann. Die Länge der transferierten DNS ist dabei von der Verpackungskapazität der Phagenkapsel abhängig. Je nach Bakteriophagentyp können bis zu 100 kb transferiert werden (Masters, 1996). Bakteriophagen sind in der Natur sehr weit verbreitet (Schicklmaier und Schmieger, 1995; Jiang und Paul, 1998). Daß dabei Empfänger- und Donorbakterien nicht in engem Kontakt zueinander stehen müssen, ist von besonderem Vorteil. So können mehrere Empfänger gleichzeitig erreicht werden und sogar in unterschiedlichen Habitaten vorkommen. Zudem sind Bakteriophagen resistenter gegenüber Umwelteinflüssen als Bakterien (Schicklmaier und Schmieger, 1995). Die Transduktionseffizienz ist jedoch von bestimmten bakteriellen Oberflächenrezeptoren abhängig, die für die erfolgreiche Phageninfektion benötigt werden. Außerdem bestehen spezifische Ausschlußmechanismen, welche die Superinfektion einer Bakterienzelle verhindern (Susskind und Botstein, 1980).

Neben der Transduktion kann auch die lysogene Konversion eines Bakteriophagen zum horizontalen Gentransfer beitragen. Das transferierte Gen liegt hier direkt im Genom eines Bakteriophagen. Durch Integration des Bakteriophagen in das Wirtschromosom erhält das Bakterium somit auch das zusätzliche Gen. Auf diese Weise wird die Empfängerzelle im Bezug auf dieses Gen konvertiert. Konvertierende Bakteriophagen wurden erstmals 1984 beschrieben (Weeks und Ferretti, 1984).

1.5.4 Horizontal übertragene Eigenschaften

Grundsätzlich erfolgt der horizontale Gentransfer nach dem Zufallsprinzip. Vergleichende Untersuchungen an den veröffentlichten *E. coli*-Genomsequenzen haben gezeigt, daß die weitaus meisten, durch horizontalen Gentransfer erworbenen Sequenzabschnitte innerhalb kurzer Zeit (80 % von 3000 kb in 100 Millionen Jahren, d.h. 23,8 kb pro 1 Mio Jahre) durch genetische Drift wieder eliminiert werden (Lawrence, 1997). Nur solche Sequenzabschnitte, die Funktionen kodieren, welche die Überlebensfähigkeit des Empfängerbakteriums verbessern, bleiben längerfristig erhalten. Hierzu können Gene gehören, die Resistenz gegen Antibiotika oder neue metabolische Eigenschaften kodieren. Müssen mehrere Gene für die Ausbildung eines vorteilhaften Phänotyps zusammenwirken, so sind sie häufig in benachbarten Positionen im Genom oder sogar in Operons organisiert zu finden. Dieses Phänomen wird nach der „Selfish“-Operontheorie dadurch erklärt, daß bei wiederholtem horizontalen Gentransfer nur solche Gene erhalten bleiben, die aufgrund ihrer benachbarten Positionen im Chromosom als

eine funktionelle Einheit übertragen werden können (Lawrence, 1997). Viele komplexe Virulenzfunktionen sind entsprechend den Postulaten der „Selfish“-Operontheorie in sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI) kodiert. Pathogenitätsinseln kodieren im allgemeinen sämtliche Gene, die für eine bestimmte Virulenzfunktion benötigt werden. Die Aufnahme dieser Inseln hat wahrscheinlich für die Entwicklung von *Salmonella* spp. hin zu pathogenen Erregern eine elementare Bedeutung gehabt (Hacker *et al.*, 1997; Bäumlner *et al.*, 1998). Durch die Übertragung dieser virulenzsteuernden Inseln konnte die Evolution in schnellen Schritten vonstatten gehen (Groisman und Ochman, 1996).

1.6 Allgemeine Definition von Pathogenitätsinseln

Pathogenitätsinseln wurden zum ersten Mal bei uropathogenen *E. coli* beschrieben (Hacker, 1983 *et al.*; Knapp *et al.*, 1995) und sind mittlerweile auch in vielen anderen Bakterien, wie auch in *Salmonella* spp. gefunden worden (Tabelle 1). Pathogenitätsinseln sind sowohl als chromosomal wie auch als plasmidal integrierte Insel gefunden worden (Hueck, 1998).

Nach Hacker *et al.* (1997) sind Pathogenitätsinseln folgendermaßen definiert:

- (1): Pathogenitätsinseln sind diskrete DNS-Elemente, die in pathogenen Stämmen bestimmter Spezies vorkommen, in verwandten aopathogenen Stämmen dagegen nicht.
- (2): Sie kodieren für Virulenzfaktoren (Toxine, Adhäsine, Eisenaufnahmesysteme etc.) und Regulatorproteine.
- (3): Der häufig unterschiedliche G+C-Gehalt weist darauf hin, daß diese Pathogenitätsinseln über horizontalen Gentransfer erworben worden sind. Außerdem weisen Pathogenitätsinseln häufig Mobilitätsgene, wie beispielsweise IS-Elemente, Phagenintegrasen oder Transposasen auf. Oft sind diese Inseln in tRNS-Gene inseriert.
- (4): Oftmals sind Pathogenitätsinseln instabil und werden spontan eliminiert. Dies ließ sich für die *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 und 2 jedoch nicht bestätigen (Ochman und Groisman, 1996).

Eine Zusammenstellung aller bis heute beschriebenen *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI) mit ihrer jeweiligen Virulenzfunktion ist in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI). Bislang sind 5 durch horizontalen Gentransfer erworbene Pathogenitätsinseln in *Salmonella* spp. beschrieben worden, die in unterschiedlichen Phasen der Salmonellose von Bedeutung sind. Es sind jeweils deren Funktion, Größe und auch die Referenz für die Erstbeschreibung angegeben.

Pathogenitätsinsel	Funktion	Größe	Referenz
SPI1	Typ-III-Sekretionssystem; Invasion in Epithelzellen; Zelltod von Makrophagen	40 kb	Mills, 1995
SPI2	Typ-III-Sekretionssystem; Überleben in Monozyten; systemische Infektion	40 kb	Shea, 1996
SPI3	Überleben in Monozyten; Magnesiumaufnahme	17 kb	Blanc-Potard, 1997
SPI4	Überleben in Monozyten	25 kb	Wong, 1998
SPI5	Enteropathogenität: Entzündungsreaktionen; Flüssigkeitsausstrom in das Darmlumen (Durchfall)	7 kb	Wood, 1998

1.7 *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1)

Die SPI1 liegt bei Zentisom 63 des *Salmonella*-Chromosoms. Sie umfaßt ca. 40 kb und ist über einen unbekannt horizontalen Transfermechanismus erworben worden. SPI1 hat im Vergleich zum durchschnittlichen G+C-Gehalt des Chromosoms von *S. enterica*-Stämmen einen niedrigeren G+C-Gehalt (Groisman und Ochman, 1993).

Die Region von SPI1 beinhaltet 35 Gene (Abbildung 2). Diese Gene können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

(1) Apparategene kodieren Proteine, die Komponenten des Typ-III-Sekretionsapparates darstellen (*invH*, *invG*, *invE*, *invA*, *invB*, *invC*, *invI*, *spaP*, *spaQ*, *spaO*, *spaR*, *spaS*, *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*). Effektorproteine werden vom Bakterium mit Hilfe dieses „Spritzenkomplexes“ direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert. Dort können sie Ihre Wirkung entfalten.

(2) Translokatoren: Diese Proteine sind ebenfalls mechanistisch am Transport der Effektorproteine in die Wirtszelle beteiligt. Sie zeichnen sich aber dadurch aus, daß sie selbst auch mit Hilfe des Typ-III-Apparates sekretiert bzw. transloziert werden und zusammen mit dem Typ-III-Apparat die Translokation von Effektorproteinen in das Zytoplasma der Wirtszelle vermitteln (*sipB*, *sipC*, *sipD*). Zum Teil besitzen diese Proteine zusätzlich eine Funktion als Effektorprotein (*sipB*, *sipC*).

(3) Effektoren: Proteine, die nach Translokation die Wirtszellfunktionen zum Vorteil des Bakteriums modulieren (*avrA*, *sptP*, *sipA*).

(4) Chaperone: Diese Proteine sind für den Sekretionsprozeß der Substratproteine (Effektorproteine) verantwortlich, indem sie die Degradation und auch die Aggregation der Effektorproteine im Zytoplasma des Bakteriums verhindern. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Chaperonen können diese Typ-III-Sekretions-assoziierten Chaperone kein ATP hydrolysieren (*sicA*, *sicP*).

(5) Regulatoren (*sprA*, *sprB*, *hila*, *invF*): Das Typ-III-Translokationssystem transloziert eine Vielzahl von Effektorproteinen in die Wirtszelle, die zu unterschiedlichen Phasen der Wirtszellinteraktion benötigt werden. Dies erfordert eine differentielle Regulation der Genexpression. Es spielen sowohl globale Sensor-/Regulatormechanismen (*phoP*, *fliA*, *sirA*) als auch untergeordnete Regulatoren (*hila*, *invF*, *sprA*) für die Regulation der SPI1-Gene eine Rolle.

(6) Eisentransportsystem (*sitA-D*): *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typimurium besitzt mehrere Eisenaufnahmesysteme. Eines dieser Systeme (*sitA-D*) ist am linken Ende von SPI1 kodiert. Eine *sit*-Mutante ist bei Koinfektionsexperimenten bis zu 100-fach attenuiert (Janakiraman und Slauch, 2000).

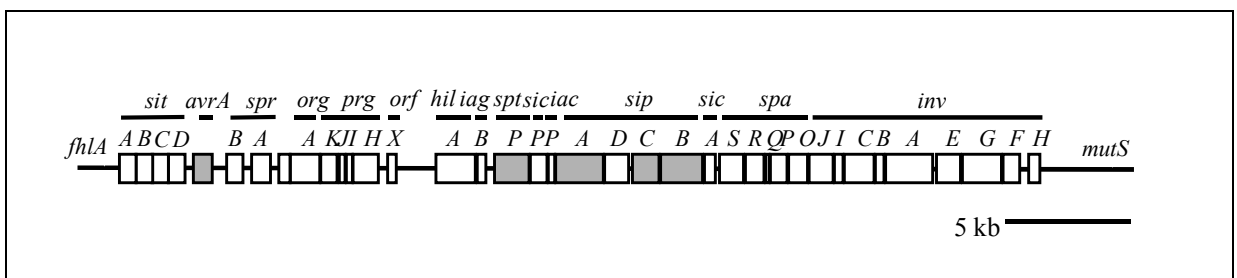


Abbildung 2: Die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1. SPI1 ist zwischen den Genen *fhlA* und *mutS* integriert, die auch in *E. coli* gefunden werden. Graue Kästchen: offene Leserahmen für translozierte Effektorproteine.

SPI1 kodiert Proteine, die in der darmassoziierten Phase der Salmonellose eine wichtige Rolle spielen (Galan und Curtiss, 1989; Mills *et al.*, 1995). Die Inaktivierung dieser Pathogenitätsinsel führt bei Mäusen nach oraler Infektion zu einer 50-fach höheren und bei Hühnern sogar zu einer 1000 bis 10.000-fach höheren LD₅₀ (Galan und Curtiss, 1989; Porter und Curtiss, 1997). Das Zusammenspiel der translozierten Effektoren induziert beispielsweise Wirtszellreaktionen, welche die bakterielle Invasion und die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen im Wirtsorganismus zur Folge haben (Eckmann *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996; Hobbie *et al.*, 1997). Außerdem induziert SPI1 die Einwanderung neutrophiler Granulozyten über das Darmepithel (McCormick *et al.*, 1993) und einen erhöhten Einstrom von Flüssigkeit in das Darmlumen (Galyov *et al.*, 1997). Desweiteren induzieren Effektoren, die mit Hilfe des SPI1-Typ-III-Apparates in die Wirtszelle transloziert werden, den Zelltod in Makrophagen (Chen *et al.*, 1996; Monack *et al.*, 1996).

1.7.1 Der SPI1-Typ-III-Translokationsapparat

Effektorproteine, die von dem gram-negativen Bakterium in das Wirtszellcytosol transloziert werden, müssen über folgende Barrieren transportiert werden: innere Membran - periplasmatischer Raum - Mureinsacculus - äußere Membran - Membran der Wirtszelle. Um diese Barrieren zu überwinden, verwenden *Salmonella* spp. einen spezialisierten Typ-III-Translokationsapparat. Dies ist ein Multiproteinkomplex, der aus mehr als 20 Proteinen aufgebaut ist. Die Lokalisation und biochemische Funktion einiger Proteine, die den Typ-III-Sekretionsapparat aufbauen, ist bereits aufgeklärt worden (Kubori *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 2000). Die Struktur und die Aminosäuresequenzen einzelner Apparatskomponenten zeigen zum Teil hohe Ähnlichkeit zum bakteriellen Flagellenkomplex (Mecsas und Strauss, 1996, Kubori *et al.*, 1998,; Kubori *et al.*, 2000).

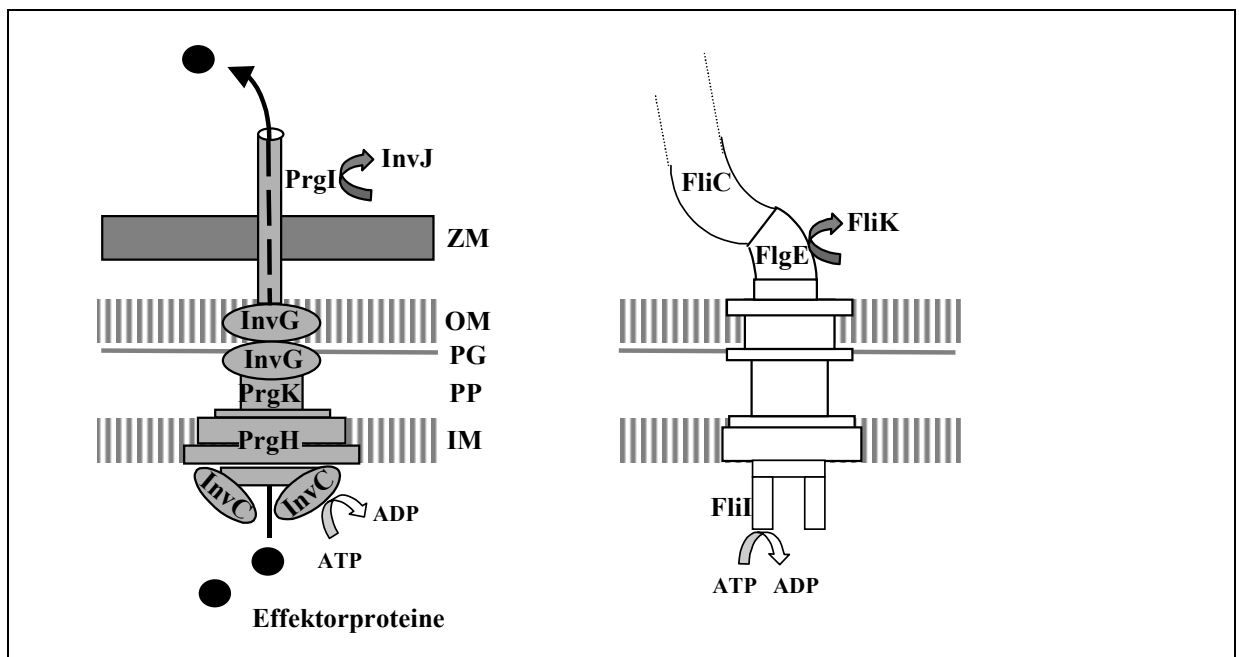


Abbildung 3: Der SPI1-Typ-III-Translokationsapparat von *Salmonella* spp. im Vergleich zum bakteriellen Flagellensystem. Beide Modelle wurden aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen und biochemischer Analysen aufgestellt. Links: Typ-III-Sekretionsapparat von *Salmonella* spp. (nach Kubori *et al.*, 2000); rechts: Flagellensystem von *E. coli* (nach Macnab, 1996); ZM: eukaryontische Zellmembran; OM: Äußere Membran; PG: Peptidoglykanschicht (Mureinsacculus); PP: Periplasmatischer Raum; IM: innere Membran).

Der Apparat konnte isoliert und seine supramolekulare Struktur elektronenmikroskopisch untersucht werden (Kubori *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 2000). Diese Struktur, auch Nadelkom-

plex genannt, durchspannt innere und äußere Membran. Sie ist dem Basalkörper der Flagellen sehr ähnlich (Abbildung 3). Der Nadelkomplex ist eine 120 nm lange Hohlstruktur. Sie ist aus zwei klar unterscheidbaren Domänen aufgebaut. Ein nadelartiger Anteil zeigt nach außen und ein zylindrischer Teil ist in der inneren und äußeren Membran verankert (Abbildung 3). Biochemische Analysen zeigten, daß die Nadelstruktur aus PrgI aufgebaut ist (Kubori *et al.*, 2000). Die Nadellänge wird durch InvJ gesteuert (Kubori *et al.*, 2000). Beim Flagellensystem hat FliK vermutlich eine analoge Funktion (Kutsukake *et al.*, 1994, Kubori *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus der Längenkontrolle dieser Strukturen ist bis jetzt jedoch noch nicht verstanden. Der basale Anteil des Sekretionsapparates wird durch 3 Proteine aufgebaut: InvG und die zwei Lipoproteine PrgH und PrgK (Kubori *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 2000). Obwohl die Architektur dieses Proteinkomplexes der des flagellären Basalkörpers sehr ähnlich ist, zeigen die Proteine (InvG, PrgH und PrgK) wenig bis gar keine Ähnlichkeit zu flagellären Proteinen (Kubori *et al.*, 2000).

Werden Effektorproteine vom *Salmonella*-Zytosol direkt in das Zytosol der Wirtszelle geschleust, spricht man von der Proteintranslokation. Im Gegensatz dazu beschreibt die Sekretion die Abgabe der Proteine in die bakterielle Umgebung (Kulturmedium). Oftmals werden diese Begriffe allerdings parallel verwendet.

Der Mechanismus des Typ-III-Translokationsprozesses ist noch wenig verstanden. Der Apparat scheint jedoch einen hohlen Kanal zu bilden, durch den die Proteine vom Bakterium in die Wirtszelle geschleust werden. ATP-Hydrolyse liefert wahrscheinlich die Energie für diesen Translokationsprozeß. Die konservierte Komponente InvC des Sekretionsapparates zeigt Sequenzähnlichkeit zu der α - und β -Untereinheit der F_1 Komponente von F_0F_1 -ATPasen und hat eine ATPase-Aktivität (Eichelberg *et al.*, 1994). Zusätzlich zu dem Nadelkomplex spielen spezielle Translokatorproteine in *Salmonella* spp. für die erfolgreiche Translokation von Effektorproteinen eine elementare Rolle (Collazo und Galan, 1997). Für das Translokatorprotein SipB von *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium konnte gezeigt werden, daß dieses Protein eine membranfusionierende Aktivität besitzt (Hayward *et al.*, 2000). Man vermutet, daß es eine Verbindung zwischen dem Nadelkomplex (Kanal) und dem eukaryontischen Zytoplasma über das Verschmelzen der bakteriellen und der Wirtszellmembran herstellt. Durch diese „Öffnung“ gelangen die bakteriellen Effektoren in das Zytosol der Wirtszelle (Hayward *et al.*, 2000).

Die translozierten Proteine besitzen kein konserviertes Signalpeptid, so wie es für den sec-abhängigen Proteintransportweg bekannt ist (Hueck, 1998). Untersuchungen an Effektoren von *Yersinia* spp., die über einen Typ-III-Translokationsapparat transportiert werden, haben gezeigt, daß manche Effektoren Chaperon-abhängig sekretiert werden (Cheng *et al.*, 1997). Neben dieser Chaperon-vermittelten Sekretion konnten Lloyd *et al.* (2001) ein weiteres Signal zur Translokation identifizieren. Danach sind die ersten Aminosäuresequenzen (1-10) des Aminoterminus für die Translokation des Effektorproteins in die Wirtszelle von kritischer Bedeutung. Eine amphipatische Aminosäureabfolge war in dieser Region erforderlich; allerdings konnte keine Konsensussequenz identifiziert werden. Bei *Salmonella* spp. liegen keine vergleichbaren Untersuchungen zu Sekretionssignalen vor. Es ist nur bekannt, daß auch hier der Aminoterminus der Effektorproteine für die Sekretion benötigt wird (Hardt, unveröffentlicht; Hueck, 1998; Miao und Miller, 2000).

1.7.2 Effektoren, die mit Hilfe des SPI1-Typ-III-Translokationsapparates sekretiert bzw. transloziert werden

Mit Hilfe der translozierten Effektorproteine können Signaltransduktionswege im Inneren von Wirtszellen moduliert werden. Die bisher identifizierten Effektorproteine und etwaig bekannte Funktionen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Ein Teil der Effektoren, die durch den spezialisierten Translokationsapparat geschleust werden, sind zusammen mit dem Typ-III-

Translokationsapparat in SPI1 kodiert. Es gibt aber auch Effektoren, die außerhalb von SPI1 kodiert sind.

Tabelle 2: Effektorproteine des SPI1-Typ-III-Translokationssystems. Alle bisher identifizierten Effektorproteine zusammen mit ihrer möglichen Funktion und chromosomalen Lokalisation sind mit den jeweiligen Literaturhinweisen aufgelistet. Cs: Zentisomposition auf dem Typhimurium LT2-Chromosom.

Effektorprotein	Funktion	Chromosomaler Locus	Referenz
AvrA	?	SPI1 (cs 63)	Hardt und Galan, 1997
SptP	Zellzytoskelettveränderung (GTPase-aktivierendes Protein; GAP)	SPI1 (cs 63)	Fu und Galan, 1999
SipA	Aktin-bindendes Protein; Entzündungsreaktionen (Neutrophileneinwanderung)	SPI1 (cs 63)	Zhou <i>et al.</i> , 1999a; Zhou <i>et al.</i> , 1999b; Lee <i>et al.</i> , 2000
SipB	Translokator, Makrophagenapoptose (bindet an Kaspase-1)	SPI1 (cs 63)	Collazo und Galan, 1997; Hersh <i>et al.</i> , 1999; Hayward <i>et al.</i> , 2000
SipC	Aktinbündelung	SPI1 (cs 63)	Hayward und Koronakis, 1999
SopA	Darmentzündung	(cs 44)	Wood <i>et al.</i> , 2000
SopB	Darmentzündung und Flüssigkeitsstrom ins Darmlumen (Inositolphosphatphosphatase)	SPI5 (cs 20)	Galyov <i>et al.</i> , 1997; Norris <i>et al.</i> , 1998
SopD	Darmentzündung und Flüssigkeitsstrom ins Darmlumen	(cs 64)	Jones <i>et al.</i> , 1998
SopE	<i>Membrane ruffling</i> ; G-Nukleotidaustauschfaktor	P2-ähnlicher kryptischer Phage? (cs 60)	Wood <i>et al.</i> , 1996; Hardt <i>et al.</i> , 1998a; Hardt <i>et al.</i> , 1998b
SopE2	<i>Membrane ruffling</i> ; G-Nukleotidaustauschfaktor	(cs 40-42)	Stender <i>et al.</i> , 2000; Bakshi <i>et al.</i> , 2000
SspH1	?	Phage Gifsy 3 (cs 27-28)	Miao <i>et al.</i> , 1999; Figueroa-Bossi <i>et al.</i> , 2001
SlrP	Darmkolonisierung der Maus	(cs 18,4)	Tsolis <i>et al.</i> , 1999a

Die für diese Arbeit relevanten Proteine und ihr Zusammenspiel für die Wirtszellinvasion werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.7.3 Zusammenspiel von SopE mit anderen invasionsrelevanten Effektorproteinen

Salmonella spp. haben während ihrer Entwicklung zu epidemiologisch relevanten Pathogenen neue Virulenzeigenschaften erworben (Tabelle 2). Viele dieser Virulenzeigenschaften werden durch translozierte Effektorproteine vermittelt. Diese Effektoren haben sich gegenseitig ergänzt und wirken zusammen, um Wirtszellreaktionen effizient zu steuern. Als Beispiel soll hier die Induktion der Invasion angeführt werden.

Bereits wenige Minuten nach Kontakt von *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium mit Epithelzellen des Dünndarms werden Effektorproteine mit Hilfe des SPI-Translokationsapparates in die Wirtszelle transloziert. In der Wirtszelle induzieren die Effektorproteine Zellzytoskeletumlagerungen. Die normalerweise nicht phagozytotisch aktiven Darmepithelzellen bilden Membranausstülpungen („Membrane Ruffles“), welche die Bakterien umschließen. Auf diese Weise gelangt das Bakterium in ein vesikuläres Kompartiment im Inneren der Wirtszelle.

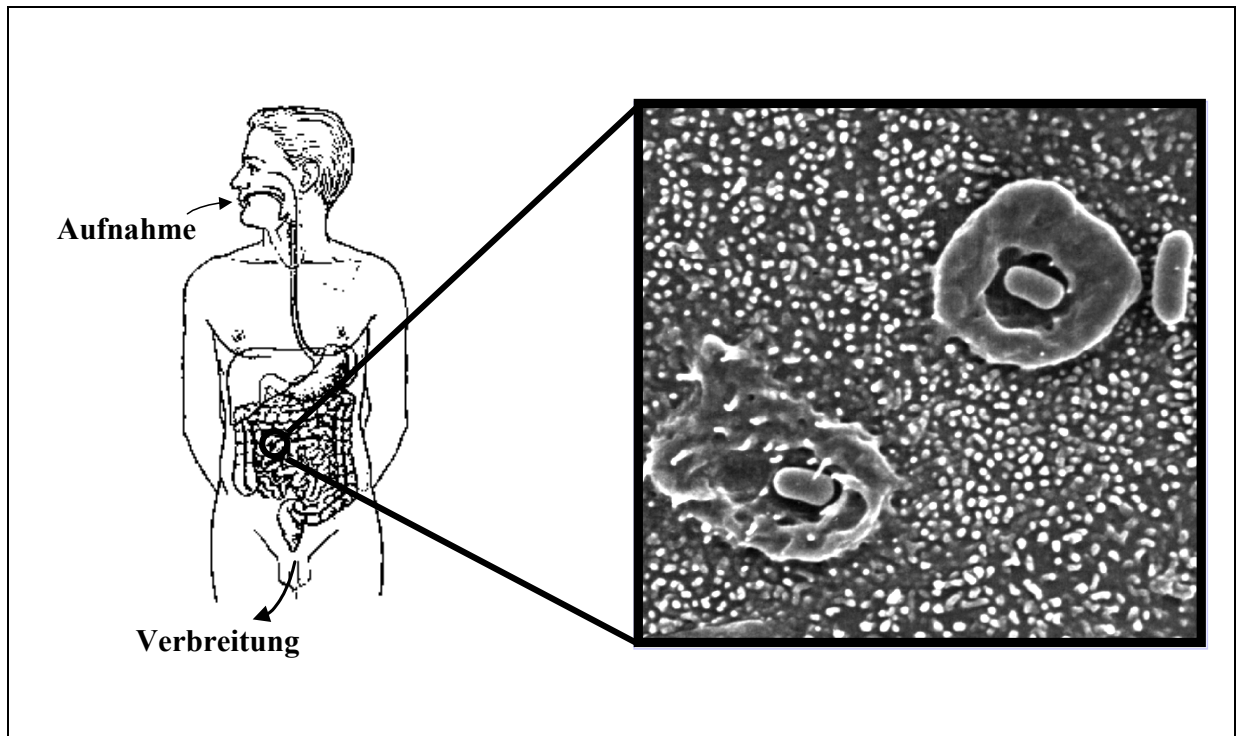


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium-induzierter „Membrane Ruffles“ auf der Oberfläche von Darmepithelzellen. Typhimurium wird oral über kontaminierte Nahrung aufgenommen. Während der Darmpassage kommen die Bakterien in engen Kontakt mit den Dünndarmepithelzellen. Effektorproteine werden über das Typ-III-Translokationssystem in die Darmzelle geschleust und induzieren die Umlagerung des Aktinzytoskeletts und die Ausbildung von Membranausstülpungen. Dadurch werden *Salmonella* spp. von normalerweise nicht phagozytotisch aktiven Zellen makropinozytiert.

An der Induktion dieser Membranausstülpungen sind die kleinen zellulären Guaninnukleotidbindenden Proteine (G-Proteine) der Wirtszelle beteiligt. Kleine G-Proteine regulieren in eukaryontischen Zellen verschiedene Signalwege, die zu einer Vielzahl von zellulären Reaktionen führen (Bishop und Hall, 2000). Sie können zwischen einer GTP-gebundenen (aktiven) und einer GDP-gebundenen (inaktiven) Konformation wechseln (Abbildung 5). So stellen sie molekulare Schalter für die räumliche und zeitliche Kontrolle wichtiger Zellfunktionen dar (z. B. Motilität, Adhäsion, Zellteilung, Genexpression; Bourne *et al.*, 1990). Für die Aktivierung der kleinen G-Proteine sind Proteine zuständig, die als G-Nukleotidaustauschfaktoren (GEF: *G-Nucleotide Exchange Factors*) bezeichnet werden und den GDP- zu GTP-Austausch katalysieren. Für die Inaktivierung der kleinen G-Proteine sind wiederum GTPase-aktivierende Proteine (GAP) nötig, die eine intrinsische GTPase-Funktion der kleinen G-Proteine aktivieren und somit die Signalproteine wieder ausschalten.

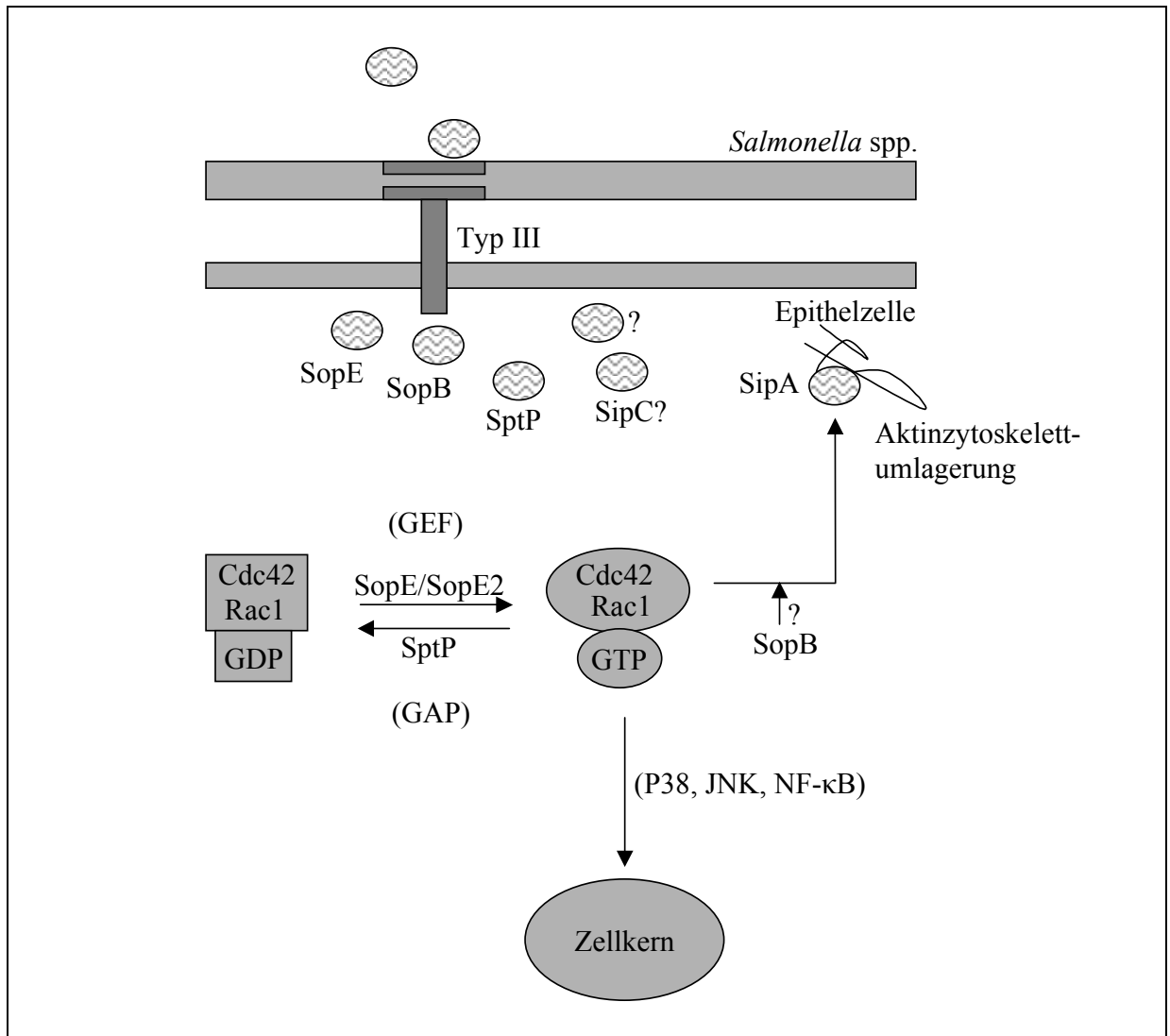


Abbildung 5: Zusammenspiel invasionsrelevanter Effektorproteine. Dargestellt sind die translozierten Effektorproteine und die von ihnen beeinflussten Signaltransduktionswege in der Wirtszelle, welche die Ausbildung der Membranausstülpungen und somit die *Salmonella*-Invasion vermitteln (Hayward und Koronakis, 1999). Typ III: SPI1-Typ-III Translokationsapparat.

Cdc42 und Rac1 gehören zur Rho-Familie der kleinen G-Proteine. Es wurde gezeigt, daß diese als Regulatoren der Zellzytoskelettarchitektur und auch für die Transkriptionsregulation im Zellkern eukaryontischer Zellen verantwortlich sind (Hotchin und Hall, 1996). Diese Signalproteine sind Ziele von Effektorproteinen, die von *Salmonella* spp. in die Wirtszellen geschleust werden (Chen *et al.*, 1996; Hobbie *et al.*, 1997). SopE ist eines dieser translozierten Effektorproteine (Hardt *et al.*, 1998b; Abbildung 5). Es bindet an Cdc42 und Rac1 und aktiviert diese (Abbildung 5; Hardt *et al.*, 1998b, Rudolph *et al.*, 1999). Obwohl es keine Sequenzähnlichkeiten zu klassischen G-Nukleotidaustauschfaktoren (GEF) hat, gehört es aufgrund seiner enzymatischen Eigenschaften zu dieser Klasse von Proteinen (Hardt *et al.*, 1998b, Rudolph *et al.*, 1999). Es scheint sich hierbei um ein perfektes Mimikri eukaryontischer Austauschfaktoren zu handeln (Rudolph *et al.*, 1999). SopE2 ist ein zweites Effektorprotein, das von Typhimurium in die Wirtszellen transloziert wird (Bakshi *et al.*, 2000; Stender *et al.*, 2000). Es ist auf Aminosäureebene 70 % identisch zu SopE und wirkt ebenfalls als GEF für kleine G-Proteine der Rho-Familie (Abbildung 5; Stender *et al.*, 2000, Bakshi *et al.*, 2000). Das Effektorprotein SopB ist eine Inositolphosphatphosphatase und ist somit an der Modulation eukaryontischer Signaltransduktionskaskaden beteiligt, die durch Inosi-

tolphosphatspiegel beeinflusst werden (Norris *et al.*, 1998). SopB ist an der Induktion der Zellzytoskelettlagerungen zum Zweck der Invasion beteiligt (Abbildung 5; Miold *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Die Signaltransduktionskaskaden, die hierbei aktiviert werden, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt worden. Zusätzlich zu den Signaltransduktionsmodulatoren unterstützt das translozierte Effektorprotein SipA die Aktinlagerungen des Wirtszellzytoskeletts (Abbildung 5). SipA bindet an G-Aktin und verringert so dessen kritische Polymerisationskonzentration. Es stabilisiert F-Aktin und erhöht die Aktinbündelungsaktivität des Wirtszellproteins T-Plastin (Fibrin). So werden Aktinfilamente in der Wirtszelle stabilisiert (Zhou *et al.*, 1999b). Bei einem weiteren translozierten Effektorprotein, SipC, wurde *in vitro* eine Aktin-polymerisierende Eigenschaft nachgewiesen (Hayward und Koronakis, 1999). Die genaue Funktion dieses Effektors ist jedoch noch nicht bekannt und es liegen auch keine konkreten Daten über den Beitrag dieses Effektorproteins zur bakteriellen Invasion vor. Die Veränderungen der Wirtszelle, die durch die oben erwähnten Effektoren ausgelöst werden, sind reversibel. Es wurde beobachtet, daß die Wirtszelle (Enterozyt) kurz nach dem bakteriellen Eintritt ihre normale Architektur wiedergewinnt (Takeuchi; 1967). Dieser Prozeß wird durch SptP katalysiert (Abbildung 5). SptP wird von *Salmonella* spp. in die Wirtszellen transloziert und wirkt als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für Cdc42 und Rac1 (Fu und Galan, 1999). So werden die G-Proteine nach der Stimulation durch SopE und SopE2 wieder inaktiviert und der Invasionsvorgang wird beendet.

Für die optimale Interaktion mit der Wirtszelle translozieren *Salmonella* spp. also mehrere verschiedene Effektorproteine, die in ihrer Funktion fein aufeinander abgestimmt sind und sich gegenseitig ergänzen.

1.8 Evolution der Pathogenität und Anpassung von *Salmonella* spp. an neue Wirte

Es wird angenommen, daß sämtliche heutigen *Salmonella* spp. auf einen einzigen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen, der vor ca. 25 bis 50 Millionen Jahren existiert haben muß (Lawrence und Ochman, 1997). Für das Verständnis der Ursache infektiöser Erkrankungen und des Entstehens immer neuer epidemischer *S. enterica*-Klone ist folgende Frage von zentraler Bedeutung: Wie können Bakterien eine Speziesbarriere überwinden und sich an immer neue Wirte anpassen? Die Analyse von Virulenzfaktoren verschiedenster *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare kann vermutlich einen wichtigen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage beisteuern. Diese Serovare unterscheiden sich nämlich zum Teil erheblich in Bezug auf das Wirtsspektrum und den Krankheitsverlauf (siehe Kapitel 1.3).

Welche Faktoren haben nun zur Diversifizierung der Gattung *Salmonella* in die Spezies *S. bongori* und *S. enterica* bzw. in die verschiedensten Subspezies und Serovare beigetragen? Es wurde postuliert, daß diese Diversifizierung mit der Anpassung an immer neue Wirte einherging und daß sich dieser Prozeß in drei Phasen abgespielt hat (Bäumler *et al.*, 1998):

(1): In der ersten Phase nach der Abspaltung von den *Escherichia* spp. vor ca. 100-160 Millionen Jahren wurde die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) durch ein horizontales Gentransferereignis erworben. SPI1 ist in allen heutigen phylogenetischen Linien von *S. enterica* und *S. bongori* zu finden, fehlt jedoch in *E. coli* und anderen verwandten Enterobacteriaceae (Li *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1995; Ochman und Groisman, 1995). SPI1 kodiert Virulenzfaktoren, die für Prozesse, die in frühen Stadien einer Infektion im Darm des Wirtes eine wichtige Rolle spielen (Galan, 1999; Wallis und Galyov, 2000). Diese Virulenzmechanismen scheinen also bereits im Anfangsstadium der Evolution von *Salmonella* spp. von Bedeutung gewesen zu sein.

(2): In der zweiten Phase der Virulenzentwicklung folgte der Erwerb der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2). Dadurch entstanden die zwei Spezies *S. bongori* (besitzt keine SPI2, Abbildung 6) und *S. enterica* (besitzt SPI2; Abbildung 6). Die eingeschränkte phylogenetische Verteilung und der vom Durchschnitt des *Salmonella*-Genoms abweichende G+C Gehalt von 44 % läßt vermuten, daß diese Pathogenitätsinsel in einem Block horizontal erworben wurde (Hensel, 2000). SPI2 kodiert ein weiteres Typ-III-Translokationssystem und Effektorproteine, die für spätere Phasen der systemischen Infektion von Bedeutung sind (Hensel, 2000). So hat *S. enterica* eine weitere Pathogenitätsinsel erworben, um sich nach der initialen Infektion im Wirt behaupten und länger persistieren zu können.

(3): In der anschließenden Phase der Evolution hat die Diversifizierung von *S. enterica* in Subspezies und Serovare stattgefunden. Damit einhergehend war die Erweiterung des Wirtsspektrums von *Salmonella* spp.. Während *S. bongori* und *S. enterica*-Subspezies-II, -IIIa, -IIIb, -IV, -VI und -VII hauptsächlich in kaltblütigen Wirbeltieren gefunden werden, werden die *S. enterica*-Subspezies-I-Stämme vor allem aus Säugetier- und Vogelbeständen isoliert (Bäumler, 1997). Der Erwerb weiterer Virulenzgene und Pathogenitätsinseln durch horizontalen Gentransfer hat hierbei eine wichtige Rolle gespielt. Viele dieser „neu“ erworbenen Virulenzfaktoren sind noch nicht identifiziert und auch die jeweiligen Auswirkungen der bereits identifizierten Proteine sind noch nicht genau untersucht worden.

Bestimmte Effektorproteine, die mit Hilfe des SPI1-Typ-III Sekretionsapparats transloziert werden, wie beispielsweise SopE und AvrA, sind z. B. zwischen den *S. enterica*-Subspezies-I-Serovaren sehr heterogen verteilt (Hardt und Galan, 1997; Hardt *et al.*, 1998a). Es wird vermutet, daß diese variablen Effektorproteine erst kürzlich horizontal erworben worden sind und als sogenannte Adaptationsproteine die Anpassung der entsprechenden *S. enterica*-Stämme an bestimmte Wirte verbessert haben. Durch ständige Neukombination dieser Adaptationsproteine (Virulenzfaktoren, Effektorproteine, Antibiotikaresistenzgene, usw.) durch horizontalen Transfer zwischen den verschiedenen *Salmonella* spp., aber auch von anderen Spezies, können immer neue Epidemiekclone entstehen, die immer besser an neue Bedingungen bzw. Wirte angepaßt sind (Hardt *et al.*, 1998a). Das Auftreten immer neuer Epidemiestämme in den letzten Jahrzehnten (Kühn und Tschäpe, 1995) zeigt zudem eindrucksvoll, daß die Anpassung von *S. enterica*-Subspezies-I an neue Wirte und Umweltbedingungen in einer beachtlichen Geschwindigkeit voranschreitet.

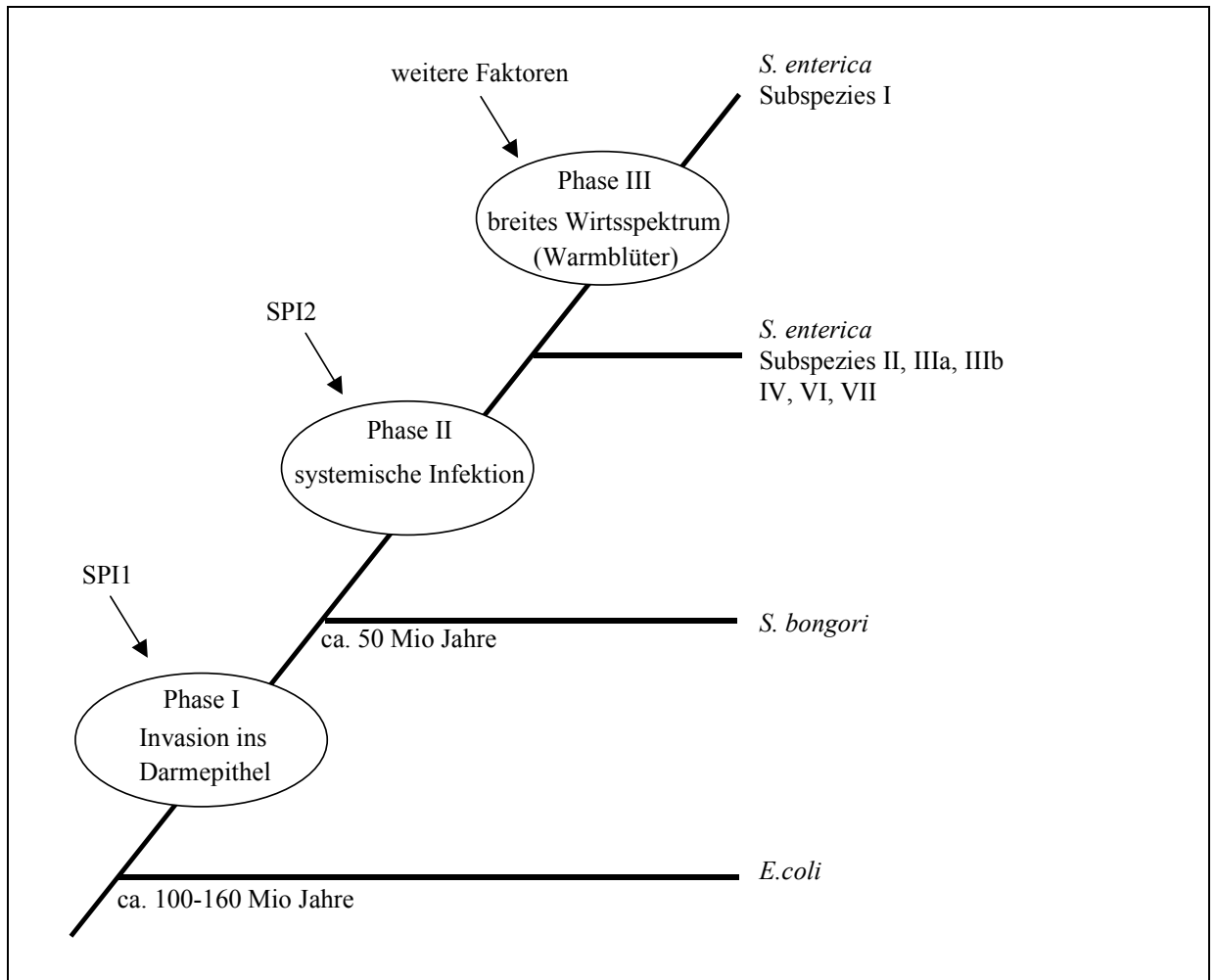


Abbildung 6: Evolution von *Salmonella* spp. (Schema übernommen von Bäumler *et al.*, 1998). Die Evolution der Pathogenität bzw. Wirtsanpassung verlief in drei Phasen, wobei zuerst SPI1, dann SPI2 und schließlich weitere Adaptationsfaktoren horizontal in das Genom aufgenommen wurden.

2 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetischen Mechanismen zu charakterisieren, welche zur Evolution der Virulenzeigenschaften von *S. enterica* beitragen. Besonderes Augenmerk lag auf der Analyse des Erwerbs von Genen für Effektorproteine, die mit Hilfe des SPI1-Typ-III-Apparats in Wirtszellen transloziert werden. Die Arbeiten gliederten sich in zwei Themenkomplexe.

1. Es sollte festgestellt werden, welche Rolle der Erwerb neuer Effektorproteine bei der Evolution von *Salmonella* spp. gespielt hat. Mit Hilfe von phylogenetischen Analysen sollte geklärt werden, in welchen Stadien der Evolution die für die Effektorproteine kodierenden Gene erworben wurden und wie stark sie in den heute vorkommenden Stämmen konserviert sind. Konservierte Effektorproteine sollten grundlegende Funktionen bei der Pathogenese haben, während Effektorproteine, die erst später hinzugewonnen worden sind und auch nur bei einigen Stämmen zu finden sind, eher zur Anpassung an spezielle ökologische Nischen (z.B. bestimmte Wirte) beitragen.

2. Es sollte festgestellt werden, ob Phagenkonversion am horizontalen Transfer von Effektorprotein-Genen beteiligt ist. Zu Beginn der Arbeit waren noch keine temperenten Bakteriophagen bekannt, die Effektorprotein-Gene tragen. Das für das Effektorprotein kodierende Gen *sopE* wird allerdings von Genen mit Ähnlichkeit zur Schwanzfaserregion von P2-Phagen flankiert. Mit Hilfe von Southernhybridisierungsanalysen sollte festgestellt werden, ob *sopE* Teil eines vollständigen P2-ähnlichen Phagen ist. Ferner sollte versucht werden, diesen putativen Phagen zu induzieren. Dies wäre die Voraussetzung für die Untersuchung des Transfers von *sopE* zwischen verschiedenen *S. enterica*-Stämmen durch lysogene Konversion.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme und Plasmide

Der Genotyp und die Herkunft der verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 aufgelistet. In Tabelle 4 sind die Plasmide aufgeführt. Genbanknummern der sequenzierten Bereiche sind in einer zusätzlichen Spalte aufgelistet. Patientenisolat, die vom Robert Koch Institut in Wernigerode zur Verfügung gestellt worden sind, sind in der Tabelle nur aufgeführt, wenn sie Gegenstand detaillierter Untersuchungen waren. In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit hergestellten Phagenlysate aufgelistet.

Tabelle 3: Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Herkunft / Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
χ6060	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA20 galK galE recA1 rpsE</i>	Manoil und Beckwith, 1985
MOSBlue	<i>endA1 hsdR17(r_{k12}⁻m_{k12}⁺)supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F^c proA⁺B⁺ lacI^fZΔM15:Tn10(Tc^R)]</i>	Amersham/Pharmacia
TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
SM10λpir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km</i>	Miller und Mekalanos, 1988
CC118λpir	<i>araD139 Δ(ara leu) ΔlacY74 phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recA1</i>	Manoil und Beckwith, 1985
<i>Salmonella</i> spp.		
A36	Typhimurium, Referenzstamm für Phagentypisierung (DT36)	Anderson <i>et al.</i> , 1977
WR1173	Typhimurium A36, <i>fhuA::mudJ</i>	RKI, Wernigerode (Tsolis <i>et al.</i> , 1995)
WR1174	Typhimurium A36, <i>tonB::km</i>	RKI, Wernigerode (Tsolis <i>et al.</i> , 1996)
LB5010	Typhimurium, <i>galE856^k</i>	Sanderson <i>et al.</i> , 1996
SL1344	Typhimurium, <i>rpsL hisG</i>	Hoiseth und Stocker, 1981
ATCC14028s	Typhimurium, Wildtypstamm	Fields <i>et al.</i> , 1986
SB856	Typhimurium, SL1344, <i>sopE::aphT</i>	Hardt <i>et al.</i> , 1998a
X3744	Typhi, Patienten- bzw. Feldisolat	Galan, Stony Brook
X3230	Hadar, Patienten- bzw. Feldisolat	Galan, Stony Brook
X3796	Gallinarum, Patienten- bzw. Feldisolat	Galan, Stony Brook
3351/78	Typhimurium DT204, Isolat aus Kalb	RKI, Wernigerode
M106	Typhimurium 3351/78, <i>sopE::aphT</i>	diese Arbeit
M4	Typhimurium A36 (SopEΦ ^{<i>sopE::aphT</i>})	diese Arbeit
3805/96	Typhimurium DT186, Patientenisolat, <i>sopE</i>	RKI, Wernigerode
M6	Typhimurium DT186, 3805/96 (SopEΦ ^{<i>sopE::aphT</i>})	diese Arbeit
2138/96	Typhimurium DT120, Patientenisolat, <i>sopE</i>	RKI, Wernigerode
M10	Typhimurium DT120, 2138/96 (SopEΦ ^{<i>sopE::aphT</i>})	diese Arbeit
M25	Typhimurium 3351/78 (SopEΦ ^{<i>aphT</i>})	diese Arbeit
M119	Typhimurium ATCC14028s, <i>sopE</i> ; <i>sopE2</i>	Miroid <i>et al.</i> , 2001
M202	Typhimurium SL1344, <i>sopE</i> , <i>sopE2</i>	Stender <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 4: Plasmide

Plasmid	Genotyp bzw. Konstruktion	Referenz/Genbank#
pMOSBlue	Amp ^R	Amersham/Pharmacia
pGEX-KG	Amp ^R ; <i>lacI^f</i>	Guan und Dixon, 1991
pBluescript II SK+	Amp ^R ; <i>lac'IPOZ'</i> α	Stratagene
pUC4K	Amp ^R ; Km ^R	Vieira und Messing, 1982
pSB377	Tet ^R ; <i>oriR6K</i> Suizidvektor	Kaniga, unveröffentlicht
pSB1116	Tet ^R ; <i>oriR6K</i> ; <i>sacAB</i> ; enthält Sequenzen, ca. 1,2 kb stromabwärts von <i>sopE</i> aus Typhimurium SL1344	Hardt und Galan, unveröffentlicht
pSB1119	Amp ^R ; 1,6 kb <i>EcoRV-HindIII</i> -Fragment von SL1344 in <i>EcoRV-HindIII</i> von pBluescript II SK+; enthält <i>orfJ</i> , <i>orfI</i> und <i>orfH</i> von SopE Φ .	Hardt, unveröffentlicht
pSB1124	Amp ^R ; 2,4 kb <i>EcoRI-XbaI</i> -Fragment von SL1344 in <i>EcoRI-XbaI</i> von pBluescript II SK+; enthält <i>orfK</i> und <i>orf45</i> von SopE Φ .	Hardt, unveröffentlicht
pSB1134	Amp ^R <i>sopE::aphT</i> ; <i>sacAB</i> (Suizidvektor)	Hardt <i>et al.</i> , 1998a
pSB1167	Amp ^R ; <i>sopE</i> (aa1-205) PCR-Produkt von SL1344 in <i>SmaI</i> -Schnittstelle von pBluescript II SK+ kloniert.	Hardt <i>et al.</i> , 1998a
pM2	Tet ^R ; 450 bp <i>Acc65I-XbaI</i> Fragment (nt 165-615 von SL1344- <i>sopE</i>) kloniert in <i>BamHI-SpeI</i> -Schnittstellen von pSB377	diese Arbeit
pM6	Tet ^R ; pM2 Suizidvektor wurde in <i>sopE</i> von X3744 (Typhi) integriert; integrierte Vektor und angrenzende chromosomale Sequenzen wurden mit Restriktionsendonuklease <i>SmaI</i> gespalten und religiert (chromosomale Sequenzen, stromaufwärts von <i>sopE</i>).	diese Arbeit; AF153829
pM11	Tet ^R ; pM2 Suizidvektor wurde in <i>sopE</i> von X3744 (Typhi) integriert; integrierter Vektor und angrenzende chromosomale Sequenzen wurden mit Restriktionsendonuklease <i>Acc65I</i> gespalten und religiert (chromosomale Sequenzen, stromabwärts von <i>sopE</i>).	diese Arbeit; AF153829
pM16	Amp ^R ; 3,5 kb <i>HindIII-PstI</i> -Fragment von Gallinarum X3796, kloniert in die <i>HindIII-PstI</i> -Schnittstellen von pBluescript II SK+ (<i>sopE</i> -chromosomale Region).	diese Arbeit; AF380340
pM19	Amp ^R ; 6,5 kb <i>BglII</i> Fragment von Hadar X3230, kloniert in die <i>BglII</i> -Schnittstellen von pBluescript II SK+ (<i>sopE</i> -chromosomale Region)	diese Arbeit; AY034828
pM35	Tet ^R ; Km ^R ; <i>oriR6K</i> ; <i>sacAB</i> ; Suizidvektor: <i>BamHI</i> -Klenow-Fragment von pUC4K (enthält <i>aphT</i> -Kassette), kloniert in <i>BspEI</i> -Klenow-Schnittstelle von pSB1116 (<i>aphT</i> direkt hinter <i>sopE</i> kloniert); verwendet für die Herstellung von M25)	diese Arbeit
pM36	Amp ^R ; 4,5 kb <i>NcoI-EcoRV</i> -Fragment von M106, kloniert in <i>NcoI-SmaI</i> -Schnittstelle von pGEX-KG (enthält <i>attR</i> von SopE Φ)	diese Arbeit
pM47	Amp ^R ; 1,3 kb <i>EcoRI-EcoRV</i> -Fragment von A36, kloniert in <i>EcoRI-SmaI</i> -Schnittstellen von pBluescript II SK+ (enthält <i>attB</i> von SopE Φ)	diese Arbeit
pM48	Amp ^R ; 3,5 kb <i>BamHI</i> -Fragment von M106, kloniert in <i>BamHI</i> -Schnittstelle von pBluescript II SK+ (enthält <i>attL</i> von SopE Φ)	diese Arbeit
pM52	Amp ^R ; <i>sopB</i> -PCR-Produkt von SARC10 kloniert in pMOSBlue	diese Arbeit; AF323078

pM53	Amp ^R ; <i>sopB</i> -PCR-Produkt von SARC7 kloniert in pMOSBlue	diese Arbeit; AF323077
pM54	Amp ^R ; <i>sopD</i> -PCR-Produkt von SARC3 kloniert in pMOSBlue	diese Arbeit
pM56	Km ^R ; <i>sopD</i> -PCR-Produkt von SARC7 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323074
pM57	Km ^R ; <i>sopD</i> -PCR-Produkt von SARC10 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323075
pM58	Km ^R ; <i>sopD</i> -PCR-Produkt von SARC11 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323076
pM59	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC7 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323070
pM60	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC10 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323071
pM61	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC11 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323072
pM62	Km ^R ; <i>sopB</i> -PCR-Produkt von SARC11 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323079
pM63	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC12 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF323073
pM64	Km ^R ; <i>sopE</i> -PCR-Produkt von SARC2 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF378115
pM65	Km ^R ; <i>sopE</i> -PCR-Produkt von SARC9 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF378111
pM66	Km ^R ; <i>sopE</i> -PCR-Produkt von SARC10 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF378112
pM67	Km ^R ; <i>sopE</i> -PCR-Produkt von SARC15 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF378113
pM68	Km ^R ; <i>sopE</i> -PCR-Produkt von SARC16 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit; AF378114
pM69	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC4 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit
pM70	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC6 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit
pM71	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC9 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit
pM72	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC13 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit
pM73	Km ^R ; <i>sopE2</i> -PCR-Produkt von SARC16 kloniert in pCR-Blunt II-TOPO	diese Arbeit
pM75	Amp ^R ; SARC16 <i>PstI</i> - <i>Bgl</i> III-Fragment kloniert in <i>PstI</i> - <i>Bam</i> HI-Schnittstellen von pBluescript II SK+	diese Arbeit; AY034829
pM149	Cm ^R ; 2 kb <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI-Fragment von SL1344 in <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI von pACYC184; <i>SopE2</i> -Expressionsvektor	Stender <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 5: Bakteriophagen. *: Die unterschiedlichen Derivate von *SopE*Φ wurden aus verschiedenen Rekombinanten (M25 und M106) des natürlichen Lysogens Typhimurium 3351/78 induziert. Diese Lysogene werden folgendermaßen beschrieben: Stamm-# (Name des integrierten Prophagen).

Name	Natürliches Lysogen aus dem der Prophage induziert wurde*	Referenz
<i>SopE</i> Φ	Typhimurium DT204 3351/78 (<i>SopE</i> Φ)	diese Arbeit; Kapitel 4.4
<i>SopE</i> Φ ^{<i>sopE::aphT</i>}	M106: Typhimurium DT204 3351/78 (<i>SopE</i> Φ ^{<i>sopE::aphT</i>})	diese Arbeit; Kapitel 4.5.1
<i>SopE</i> Φ ^{<i>aphT</i>}	M25: Typhimurium DT204 3351/78 (<i>SopE</i> Φ ^{<i>aphT</i>})	diese Arbeit; Kapitel 4.8

3.2 Enzyme, besondere Chemikalien und Puffer

Enzyme für die Molekularbiologie wurden von Invitrogen Life Technologies (Paisley, Schottland), Fermentas (Vilnius, Litauen), New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardpuffer der Molekularbiologie, Biochemie und Proteinchemie nach Sambrook *et al.*(1989) und Lämmler (1970) hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Zellkulturmedien sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 6: Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung /Bezugsquelle
Lambda-Puffer	100 mM NaCl, 20 mM MgSO ₄ , 35 mM Tris-Cl, pH 7,5
HBSS (Hanks gepufferte Salzlösung)	Invitrogen Life Technologies (Paisley, Schottland), # 14025-050
DMEM („Dulbeccos modifiziertes Eagle“ Medium	Invitrogen Life Technologies (Paisley, Schottland), # 31965-023

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Nährmedien

Zur Anzucht der verschiedenen Bakterienstämme wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Medien mit den in Tabelle 8 aufgeführten Zusätzen verwendet (Prozentangaben sind, soweit nicht anders angegeben, w/v-Angaben).

Tabelle 7: Nährmedien

Medium	Zusammensetzung	Referenz
LB	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl	Miller, 1972
LB 0,3 M NaCl	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1,75 % NaCl	Leclerc <i>et al.</i> , 1998
EBU	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; 0,25 % Glukose; 0,25 % K ₂ HPO ₄ *; 12,5 mg/l Evans Blau*; 25 mg/l Natriumfluoreszein* (*: Zugabe nach dem Autoklavieren)	Bochner, 1984

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5 % Agar zugesetzt. Für Agaroseplatten bzw. Topagarose wurden die im Ergebnisteil beschriebenen Prozentsätze an Agarose den Flüssigmedien zugesetzt.

Tabelle 8: Zusätze

Zusätze	Endkonzentration
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	12 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
X-Gal	60 µg/ml
IPTG	200 µM
Saccharose	5 %

3.3.2 Anzuchtbedingungen

Zur Präparation sekretierter Effektorproteine wurden *Salmonella* spp. für genau 12 h bei 37°C in LB 0,3 M NaCl kultiviert (Leclerc *et al.*, 1998). Diese Vorkultur wurde anschließend 1:20 in frischem Medium verdünnt und für weitere 4 h bei 37°C unter leichtem Schütteln wachsen gelassen.

Für die Präparation von Plasmid- oder chromosomaler DNS wurden die Bakterienkulturen über Nacht in LB in Anwesenheit der entsprechenden Antibiotika bebrütet.

3.3.3 Lytische Phageninduktion, Detektion und Vermehrung der SopEΦ-Derivate

Um SopEΦ, SopEΦ^{aphT} oder SopEΦ^{sopE::aphT}-Lysate herzustellen, wurden 150 µl einer frischen Übernachtskultur des lysogenen Bakterienstammes in 1,5 ml LB verdünnt, das zusätzlich 2 µg/ml Mitomycin C (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) enthielt. Die verdünnten Kulturen wurden für weitere 6 Stunden bei 37°C unter leichter Agitation angezchtet. Die Lysate wurden anschließend durch eine Zentrifugation bei 10.000 x g für 5 min bei 4°C geklärt und durch eine Membranfiltration (Porengröße: 0,45 µm) weiter aufgereinigt.

Um lytische Bakteriophagen detektieren zu können, wurden 5 µl jedes Lysats auf einem Typhimurium A36-Bakterienrasen (eingegossen in 0,7 % EBU-Topagarose) ausgestrichen bzw. aufgetragen. Die Platten wurden anschließend bei 37°C bebrütet bis Phagenplaques erkennbar wurden. Die DNS aus den Phagenplaques wurde auf Nitrozellulose transferiert und in einer Southernhybridisierung mit der Sonde V (siehe Tabelle 12) weiter charakterisiert. Die Phagenpartikel wurden aus der Topagarose durch Elution mit Lambda-Puffer bei 4°C gewonnen. Die Aufreinigung, die Titerbestimmung und die Herstellung der Plattenlysate wurden entsprechend der Standardmethoden, die für den Bakteriophagen Lambda beschrieben sind (Sambrook *et al.*, 1989), auf einem Typhimurium A36-Rasen durchgeführt. Die Phagentiter betragen durchschnittlich 10⁷ pfu/ml (= Plaque-bildende Einheiten/ml). CaCl₂ und EGTA hatten keinen Einfluß auf die Phagentiter.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die durch Zentrifugation und Filtration gereinigten Lysate zusätzlich durch eine Dialyse gegen Lambda-Puffer (50 kDa Ausschlußgröße) gereinigt. Lysate in der Konzentration von 5 x 10⁶ pfu/ml wurden jeweils für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Dr. M. Rohde (GBF, Braunschweig) versendet.

3.3.4 Lysogene Konversion

Um Lysogene herzustellen, wurden 10⁶ pfu des jeweiligen Bakteriophagenlysates mit ca. 4 x 10⁷ Empfängerbakterien in einem Endvolumen von 100 µl mit Lambdapuffer gemischt. Es erfolgte eine Vorinkubation von 15 min bei RT. Anschließend wurden Lysogene durch Platieren auf LB mit 50 µg/ml Kanamycin und 12 h Inkubation bei 37°C selektiert. Die resultierenden lysogenen Bakterien wurden durch dreimaliges Ausstreichen auf kanamycinhaltigem LB-Agar aufgereinigt.

3.3.5 Transduktion mit P22-Lysaten

100 µl einer Übernachtskultur der Empfängerbakterien wurden zu 3 bzw. 33 µl des P22-Lysates (ca. 10¹¹ pfu/ml) gegeben und für 15 min bei 37°C bebrütet. 40 µl des Ansatzes wurden unverdünnt oder 1:20 bzw. 1:400 verdünnt auf LB-Agarplatten, die mit den entsprechenden Antibiotika versetzt waren, ausplattiert. Die selektierten Antibiotika-resistenten Transduktanten wurden durch dreimalig aufeinanderfolgende Vereinzelausstriche aufgereinigt. Durch einen Kreuztest mit P22-Lysat und durch Ausstreichen auf EBU-Agar wurde die An-

wesenheit lysogener und lytischer P22-Bakteriophagen (Bildung blauer Lysehöfe oder blauer Kolonien) ausgeschlossen.

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 Standardmethoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Chromosomale DNS aus *E. coli* oder *Salmonella* spp. wurde mit Hilfe des „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) hergestellt. Plasmid-DNS wurde mit dem „Express Matrix“ Protokoll der Firma Bio101 (Carlsbad CA, USA) präpariert. Um größere Plasmid-DNS-Mengen hoher Reinheit zu erhalten, wurde das auf Säulenchromatografie basierende Verfahren des Qiagen Plasmid Präparationskits (Mini- oder Midi-) verwendet. Niedermolekulare DNS (bis zu 5 kb) wurde aus Agarosegelen mit dem „GeneClean 101-Kit“ (Bio101, Carlsbad CA, USA), gemäß Anleitung isoliert, höhermolekulare DNS-Fragmente gemäß des „Qiaquick Gel Extraction Kit“ Protokolls (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNS erfolgte durch Elektroporation (1800 V, 200 Ω , 25 μ F).

3.4.2 Amplifikation von DNS mittels PCR

Bakterielle chromosomale Regionen wurden über Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Zum einen diente das genomische DNS-Fragment zur direkten Ermittlung der Nukleotidsequenz oder zum Nachweis der Nachbarschaft zweier DNS-Sequenzen im Bakterienchromosom („Kokalisation“). In anderen Fällen wurden durch PCR-gewonnene genomische DNS-Fragmente kloniert. Die folgenden Tabellen (Tabelle 9 und Tabelle 10) geben eine Übersicht aller PCR-Reaktionen, die im Ergebnisteil dieser Arbeit erwähnt sind.

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide. (+): in Leserichtung oder „forward“, (-): gegen die Leserichtung oder „reverse“.

Oligonukleotid	Sequenz	Beschreibung
+1722	CCGTGGAACGATTGACTG	1000 nt stromabwärts von <i>sopE</i> (-)
-1017	AGCCATTAGCAGCAAGGT	1017 nt stromaufwärts von <i>sopE</i> (+)
SopB-1	TGCTCTAGACATGCAAATACAGAGCTTCTATCA	ATG = <i>sopB</i> -Startkodon (+)
SopB-2	AAGCTTGGCATAAAGGGACAGCACAA	162 nt stromabwärts von <i>sopB</i> (-)
SopD-1	CGGGATCCAGCGCAGATAAAGAAAAAGC	nt 73 von <i>sopD</i> (+)
SopD-2	GCTCTAGAAAGCGAGTCCTGCCATTC	nt 604 von <i>sopD</i> (-)
SopE2-1	CTCTTTCATAACGATTTTCTCAGC	nt 624 von <i>sopE2</i> (-)
SopE2-2	GGATATCAAAGGTAATGCGAGTAA	nt 282 von <i>sopE2</i> (+)
1	TTAACGGGCGAAGAGTATT	Abbildung 9
2	TTCCGGCTTTATTTTTACC	Abbildung 9
3	GGGCGGGGTGATTACTA	Abbildung 10
4	GCGACCACCGATGAAGA	Abbildung 10
5	CGGCGGATAACACGATT	Abbildung 10
6	CCGCCAGACCTTCCAG	Abbildung 10
7	CGGGATCCAGCGCAGATAAAGAAAAAGC	Abbildung 10
8	CAGCGCAGATAAAGAAAAAG	Abbildung 10
prM48-7	CGGGCTGAGTTATGAAAAG	Abbildung 22
prM48-D	CCAGACCGGGGAAAATA	Abbildung 22

E-I	TCATATTAATCAGGAAGAGGC	28 nt stromaufwärts von <i>sopE</i> (+)
E-II	GCTGGTACGCTCAACGA	246 nt stromabwärts von <i>sopE</i> (-)
pr1	CGCGCCNGACCATTAC	Abbildung 30
pr2	AAAAATTCGACACAACACTGGA	Abbildung 30
pr3	GAAACGGCTGGCGATAC	Abbildung 30
pr4	TCGATTCCCTTGCTGATGA	Abbildung 30
pr5	GCATTCCTCCCTATCCCT	Abbildung 30
pr6	TTTTGGTGTCTGTGTTCA	Abbildung 30
pr7	CCCTTTCATCGTTTCTCG	Abbildung 32
pr8	CGTTTGTTAGCGGAAGGT	Abbildung 32

Tabelle 10: Oligonukleotidpaare und PCR-Bedingungen.

Oligonukleotidpaar	Matrize / PCR-Bedingungen	Produkt / Zweck
+1722, -1017	3351/78: 30x: 94°C/30“, 53°C/30“, 72°C/3“	2,7 kb Sequenzierung der <i>sopE</i> -Region
sopB-1, sopB-2	SARC7, SARC10, SARC11: 33x: 95°C/30“, 50°C/30“, 72°C/2“	2 kb Klonierung des <i>sopB</i> -Fragment (pM52, pM53, pM62)
sopD-1, sopD-2	SARC7, SARC10, SARC11: 34x: 95°C/30“, 51°C/30“, 72°C/3“	0,5 kb Klonierung des <i>sopD</i> -Fragment (pM56, pM57, pM58)
sopE2-1, sopE2-2	SARC4, SARC6, SARC7, SARC9, SARC10, SARC11, SARC12, SARC13, SARC16: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/2“	0,35 kb Klonierung des <i>sopE2</i> -Fragment (pM59, pM60, pM61, pM63, pM69, pM70, pM71, pM72, pM73)
3, 7	SARC1, SARC2, SARC7, SARC8, SARC9, SARC10, SARC13, SARC15, SARC16: 34x: 95°C/30“, 51°C/30“, 72°C/5“	3,3 kb Nachweis der Nachbarschaft von <i>cysI</i> und <i>sopD</i> : Abbildung 10B
4, 7	SARC3, SARC4: 34x: 95°C/30“, 51°C/30“, 72°C/5“	2,3 kb Nachweis der Nachbarschaft von <i>cysI</i> und <i>sopD</i> : Tabelle 13
5, 8	SARC5: 34x: 95°C/30“, 51°C/30“, 72°C/5“	2,4 kb Nachweis der Nachbarschaft von <i>cysI</i> und <i>sopD</i> : Tabelle 13
6, 8	SARC11, SARC12: 34x: 95°C/30“, 51°C/30“, 72°C/5“	3,0 kb Nachweis der Nachbarschaft von <i>cysI</i> und <i>sopD</i> : Tabelle 13
1, 2	SARC1, SARC2, SARC5, SARC6, SARC7, SARC8, SARC9, SARC10, SARC11, SARC13, SARC15, SARC16: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/11“	8,5 kb (SARC13: 6kb) Nachweis der Nachbarschaft von <i>hpaB</i> und <i>sopB</i> : Abbildung 9C
prM48-7, prM48-D	3351/78, 1/82, 11635/98: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/3“	2,2 kb Sequenzierung der <i>SopEΦ-attL</i> -Region
E-I, E-II	SARC2, SARC9, SARC10, SARC15, SARC16: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/5“	1,0 kb Klonierung von <i>sopE</i> (pM64, pM65, pM66, pM67, pM68)
pr1, pr2	X3796, X3230 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/10“	6 kb Kapitel 9.2
pr3, pr4	X3796, Enteritidis WR1455, Enteritidis 136/87: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/5“	3,5 kb Kapitel 9.2
pr3, pr6	X3796, Enteritidis WR1455, Enteritidis 136/87: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/5“	4,0 kb Kapitel 9.2

pr5, pr4	X3796, Enteritidis WR1455, Enteritidis 136/87: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/5“	2,9 kb Kapitel 9.2
pr5, pr6	X3796, Enteritidis WR1455, Enteritidis 136/87: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/5“	3,4 kb Kapitel 9.2
pr7, pr8	SARC9, SARC10, SARC15, SARC16, SL1344: 34x: 95°C/30“, 53°C/30“, 72°C/5“	3,0 kb (SL1344: 1kb): Abbildung 32B

3.4.3 DNS-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNS oder PCR-Produkten wurde das „Ready Reactions Dye Deoxy Terminator Cycle Sequenzierungskit“ (Applied Biosystems, Rodgau-Jüdesheim, Deutschland) und ein automatischer Sequenzierer „Applied Biosystems Model 377XL“ verwendet.

3.4.4 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde nach Standardprotokollen durchgeführt (Biorad, München, Deutschland). Die DNS in den Agaroseblöckchen wurde mit *Xba*I restriktionsendonukleolytisch gespalten und mittels einer Chef DR III-Apparatur (Biorad, München, Deutschland) in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Umschaltzeit: 5-35 sec, Laufzeit: 22 h, Winkel: 120°, Spannungsgradient: 6 V/cm. Die gesamte Auftrennung erfolgte in 0,5 x TBE bei 8°C.

3.4.5 Southernhybridisierungen / Sonden

Für die Southernhybridisierung wurde das „Enhanced Chemiluminescence, Random-Primed-Markierungs- und Detektionskit“ nach Anweisungen des Herstellers (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Hybridisierung bei 56°C. Dabei wurde folgender Hybridisierungspuffer eingesetzt: 0,75 M NaCl, 75 mM Natriumcitrat (pH 7), 0,1 % SDS, 5 % Dextransulfat, 100 µg/ml Lachssperma-DNS als Blockierungsreagenz.

Für die Koloniehybridisierung wurden ausgewählte Bakterien (inklusive einer geeigneten Positiv- und Negativkontrolle) rasterförmig auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen, die zur Befeuchtung und Nährstoffversorgung auf LB-Agar aufgelegt wurde. Nach ca. 4 h Bebrütung bei 37°C wurden die Bakterien auf der Membran mit 0,4 N NaOH lysiert und die UV-fixierte DNS (0,12 J/cm²) mit einer spezifischen Sonde hybridisiert.

Folgende Sonden wurden während dieser Arbeit eingesetzt:

Tabelle 11: Sonden, die mittels Polymerasekettenreaktion hergestellt wurden.

Sonde	Oligonukleotide	Matrize/PCR – Bedingungen	Beschreibung der Sonde
I	TGATGTACAAAACCGACCAG TTTAGCACCACTTTAGCC	X3744 33x: 94°C/30“, 50°C/30“, 72°C/8“	Abbildung 17 2,2 kb
II	TTCTCTCCCATTTTCAACG GGTCCAGTTTTGCGTAGG	X3744 33x: 94°C/30“, 50°C/30“, 72°C/8“	Abbildung 17 6,1 kb
III	CTGGCAAACCGTAAGCA CAGCCAGTCATCAACCTTCT	X3744 32x: 94°C/30“, 50°C/30“, 72°C/10“	Abbildung 17 5 kb

IV	TGGCGCTGGCACTTG CAATAGACGATGCCACAAAT	X3744 30x: 94°C/30'', 53°C/30'', 72°C/5'	Abbildung 17 4,5 kb
<i>sipC</i>	ATGTTAATTAGTAATGTGGGA TTAAGCGCGAATATTGCCTGC	SL1344 33x: 95°C/30'', 50°C/30'', 72°C/2'	Abbildung 8A 1,2 kb
<i>sipB</i>	CTAAAAACGGCGGAGACA AATCGTTTTCGCCCATCA	SL1344 33x: 95°C/30'', 50°C/30'', 72°C/2'	Abbildung 8A 1,4 kb: beinhaltet auch 50 nt vom benachbarten <i>sicA</i>
<i>sipA</i>	CCGCAGTCAGAGCAAAGT TGCAATCTCAGCCAGTTTT	SL1344 33x: 95°C/30'', 51°C/30'', 72°C/3'	Abbildung 8A 1,8 kb
<i>sptP</i>	AGTATTAACCTGGCTTGAAAA CAAACGTGAGGCGTCTTCC	SL1344 33x: 95°C/30'', 51°C/30'', 72°C/3'	Abbildung 8A 1,5 kb
<i>sopB</i>	TGCTCTAGACATGCAAATACA- GAGCTTCTATCA AAGCTTGGCATAAAGGGACAGCACA	SL1344 33x: 95°C/30'', 50°C/30'', 72°C/2'	Abbildung 9A; 1,7 kb: beinhaltet auch 150 nt vom benachbarten <i>pipC</i>
<i>sopD</i>	TAAGCTTCGGTAATCATCAA TGCACCCATCTTTACCAAT	X3744 33x: 95°C/30'', 51°C/30'', 72°C/3'	Abbildung 10A; 1 kb
<i>cysI</i>	GGGCGGGGTGATTACTA CCGCTTCACGCTCTTTC	SL1344 33x: 95°C/30'', 53°C/30'', 72°C/3'	Abbildung 10A 1,35 kb
<i>p120</i>	GGACGCCTTTCTGACACA ATCGTTGATGCTGGAAA	X3744 33x: 95°C/30'', 53°C/30'', 72°C/3'	Abbildung 11A 1,3 kb
<i>hpaB</i>	TTAACGGGCGAAGAGTATT TGGCTGCCCGAGTAGTT	SL1344 33x: 95°C/30'', 53°C/30'', 72°C/3'	Abbildung 9A 1,35 kb
a	GTCGGCGCTCAGTCC AACGGCGAAAGCAAGAT	X3744 33x: 95°C/30'', 53°C/30'', 72°C/2'	Abbildung 9A 1 kb
b	TCGTACCCAGGAGTCACATA CCCTGGCCTGAGAGAATC	X3744 33x: 95°C/30'', 53°C/30'', 72°C/2'	Abbildung 9A 1,3 kb

Tabelle 12: DNS-Sonden für Southernhybridisierungen, die durch Restriktionsendonukleasespaltung von Plasmiden hergestellt wurden.

Sonde	Plasmid (<i>S. enterica</i> - Subspezies-I-Serovar, aus dem die Sequenz herstammt)	Restriktions- Endonukleasen	Beschreibung der Sonde	Abb.
V/ <i>sopE</i>	pSB1167 (Typhimurium)	<i>Acc65I-XbaI</i>	723 nt: <i>sopE</i>	17
VI	pSB1119 (Typhimuri- um)	<i>HindIII-PvuI</i>	700 nt: C-terminaler Teil von <i>orfJ</i>	17
VII	(Typhimurium)	<i>SacII-NdeI</i>	2,6 kb: C-Terminus von <i>orfG</i> und strom- abwärts	17
VIII	pM36 (Typhimurium)	<i>EcoRV-NdeI</i>	1,6 kb: rechtes Ende von <i>SopEΦ</i> und angrenzende chromosomale DNS	17 19
<i>sopE2</i>	pM202 (Typhimurium)	<i>EcoRI-XbaI</i>	723 nt: <i>SopE2</i> kodierende Sequenz	11A
<i>avrA</i>	pSB1138 (Typhimurium)	<i>EcoRV</i>	1 kb: Teil von <i>AvrA</i> kodierender Se- quenz	8A
K	pSB1124 (Typhimurium)	<i>PstI-NruI</i>	1,1 kb: Sequenzen direkt stromabwärts von <i>sopE</i> , einschließlich <i>orf45</i> und 3'- Anteil von <i>orfK</i>	27A 32A

J	pSB119 (Typhimurium)	<i>EcoRV-HindIII</i>	1,6 kb: 3'-Hälfte von <i>orfJ</i> , <i>orfI</i> und 5'-Teil von <i>orfH</i> (offene Leseraster von SopEΦ)	32A
G	pM16 (X3796, Gallinarum)	<i>XhoI-BglII</i>	900 nt: Sequenzen unmittelbar stromaufwärts von <i>orfI</i>	32A
H	PM19 (X3230, Hadar)	<i>XbaI-PvuII</i>	1,25 kb: 3'-Region von <i>orfJ</i>	32A

3.5 Biochemische Standardmethoden

3.5.1 Aufkonzentrierung sekretierter Proteine aus bakteriellen Kulturüberständen

Salmonella spp. wurden nach 12 h Vorinkubation in einem Verhältnis von 1:20 in 250 ml LB 0,3 M NaCl verdünnt und für ca. 4 h bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von $A_{600} = 0,5$ angezüchtet. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation (7000 x g, 20 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde durch 0,22-µm-Filtration aufgereinigt. Die Proteine in den zellfreien Überständen wurden mit kalter Trichloressigsäure (10 % v/v) für 1 h bei 4°C präzipitiert und durch Zentrifugation bei 7000 x g für 20 min bei 4°C sedimentiert. Die Präzipitate wurden anschließend in 4 ml kaltem 1x PBS gelöst und wiederum mit 20 ml eiskaltem Aceton gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Präzipitate nochmals in Aceton gewaschen, getrocknet und in 250 µl 1x PBS aufgelöst. Der pH der gelösten Proteinfraction wurde mit 1 M Tris-pH 8 auf neutralen pH eingestellt, um ein optimales Laufverhalten bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zu gewährleisten. Bakterienlysate wurden direkt durch Zugabe der entsprechenden Menge 5x Lämmli-puffer zur Bakterienkultur hergestellt.

Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in 12 % SDS-Polyacrylamidgelen nach Lämmli (Lämmli, 1970).

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Westernblot

Soweit nicht anders angegeben wurden die molekularbiologischen Standardmethoden nach Sambrook (1989) angewendet. Folgende Antikörper wurden im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt:

IM1 (Miold *et al.*, 1999): Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Aminosäure 78-240 von SopE (hergestellt aus Typhimurium SL1344); eingesetzte Verdünnung: 1:30.000 in 1x PBS, 5 % Milchpulver).

α-SopE2 (Stender *et al.*, 2000): Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Aminosäure 69-240 von SopE2 (hergestellt aus Typhimurium SL1344); eingesetzte Verdünnung: 1:500 in 1x PBS, 5 % Milchpulver; Antiserum kreuzreagiert mit SopE!

sekundärer Antikörper: Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziegen-α-Kaninchen-Antikörper; F(ab)₂-Fragment (Dianova; Verdünnung 1:5000 in 1x PBS, 5 % Milchpulver).

Zur Darstellung der Peroxidase-markierten Proteine wurde das „ECL-Chemilumineszenz-Detektionskit“ nach Anweisungen des Herstellers verwendet (Amersham Pharmacia).

3.6.2 Bestimmung der Invasivität mittels differentieller Immunfluoreszenzfärbung („Inside–Outside“-Färbung)

COS7-Zellkulturzellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und für zwei Tage in Dulbeccos modifiziertem „Eagle“ Medium (DMEM) mit 5 % fötalem Kälberserum (FBS) bis zu einer

Konfluenz von 80 % kultiviert. Vor Beginn des Infektionsexperimentes wurde das Kulturmedium durch 500 µl einer nach Hanks gepufferten Salzlösung (HBSS) ausgetauscht. *Salmonella* spp. wurde wie für die Gewinnung der sekretierten Proteine beschrieben (s.o.) kultiviert, bis eine optimale Dichte von $A_{600} = 0,9$ erreicht wurde. Die COS7-Zellen wurden mit einem 10-fachen Überschuß an Bakterien (MOI = 10; entspricht ca. 3 µl Bakterienkultur) infiziert. Nach 50 min Inkubation bei 37°C (5 % CO₂) wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und in 3,7 % Formaldehyd in 1 x PBS für 10 min fixiert. Extrazelluläre Bakterien wurden mit einem α -*Salmonella* O-1,4,5,12(8) polyklonalen Antiserum (Becton Dickinson, 1:100 in PBS, 5 % Milchpulver) inkubiert und mit einem Fluoreszeinisothiozyanatgekoppelten α -Kaninchen-Antikörper (Sigma Aldrich, 1:100 in PBS, 5 % Milchpulver) gegengefärbt. Nach einer ca. 3-minütigen Permeabilisierung der COS7-Zellmembran durch 0,1 % Triton X-100 in PBS, wurden die extra- und intrazellulären Bakterien mit dem α -*Salmonella* O-1,4,5,12,(8) polyklonalen Antikörper (Becton Dickinson, 1:100 in PBS, 5 % Milchpulver) und mit einem TRITC-gekoppelten α -Kaninchen-Antikörper (Texas-Red-Isothiocyanat; Sigma Aldrich, 1:100 in PBS, 5 % Milchpulver) gefärbt. Zusätzlich wurde die bakterielle und zelluläre DNS mit DAPI (Sigma-Aldrich, = 4,6-Diamidino-2-phenylindol, 1:2000 in PBS, 5 % Milchpulver) markiert. Die Deckgläschen wurden auf Objektträgern fixiert und die bakterielle Invasion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Dazu wurden solche COS7-Zellen ausgezählt, die mehr als ein intrazelluläres (rotes; TRITC⁺, aber nicht FITC⁺) Bakterium beinhalten. Dies entspricht der Anzahl der infizierten Zellen. Zusätzlich wurde die Anzahl der internalisierten Bakterien pro COS7-Zelle (TRITC⁺, aber nicht FITC⁺) ausgezählt. Die Invasivität jedes Stammes wurde folgendermaßen berechnet: Invasion (%) = (Mittelwert der Anzahl Zellen der Typhimurium-Mutante pro infizierter Zelle) / (Anzahl der internalisierten Wildtypbakterien pro infizierter Zelle aus dem Kontrollversuch) x 100. Diese Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt und die Ergebnisse gemittelt. Pro Versuchsansatz wurden jeweils mindestens 200 infizierte Zellen ausgezählt.

3.7 Bioinformatische Methoden

3.7.1 Datenbankrecherchen

Zur Suche nach homologen DNS- oder Protein-Sequenzen wurde die NCBI-Datenbank des „National Institute for Health“ (Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) genutzt. Genomsequenzen von Typhi CT18 konnten auf dem Server des „Sanger Centre“ (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi) analysiert werden. Die Sequenzen des noch nicht abgeschlossenen Sequenzierungsprojektes für Enteritidis (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Microb_blast/credits/592.html) und Typhimurium LT2 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Microb_blast/credits/99287.html) wurden ebenfalls herangezogen.

3.7.2 Sequenzanalyse und Sequenzvergleich

DNS-Sequenzvergleiche bzw. Proteinsequenzvergleiche wurden mit dem Clustal-Paket (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSAHLN/npsahlp_alignclustalw.html) durchgeführt. Zur Darstellung dieser Sequenzvergleiche wurde außerdem das Boxshade-Programm (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) benutzt.

Bei der Untersuchung evolutionärer Divergenz von DNS-Sequenzen ist es oft nötig, die Zahl der synonymen (stillen) und nichtsynonymen (Aminosäure-ändernden) Nukleotidsubstitutionen getrennt zu analysieren. Synonyme Nukleotidsubstitutionen in Proteingenen kommen häufig vor, da auf ihnen kein selektiver Druck herrscht. Die synonymen Austauschraten sollten daher in unterschiedlichen Genen (gleichen Alters) gleich sein. Diese Austauschraten kön-

können somit als molekulare Uhr für die Evolutionszeit eng verwandter Arten benutzt werden (Nei und Gojobori, 1986; Ochman und Wilson, 1987).

Um die Anzahl der synonymen und nichtsynonymen Nukleotidunterschiede zwischen zwei oder mehreren homologen Sequenzen zu berechnen, wurde in dieser Arbeit das „SNAP“-Analyseprogramm verwendet (Nei und Gojobori, 1986; (<http://hiv-web.lanl.gov/SNAP/WEBSNAP/SNAP.html>)). Dabei werden Sequenzen Kodon für Kodon miteinander verglichen und die d_S - (Rate der synonymen Substitutionen) und d_N -Werte (Rate der nichtsynonymen Substitutionen) berechnet. Pro Kodon wird durch dieses Analyseprogramm die Anzahl der synonymen und nichtsynonymen Mutationen berechnet, die zu einem Aminosäureaustausch geführt haben müssen. Wird beispielsweise die Änderung von TTT in GTA verglichen, so gibt es zwei mögliche Wege:

- (I) TTT(Phe) \leftrightarrow GTT(Val) \leftrightarrow GTA(Val)
- (II) TTT(Phe) \leftrightarrow TTA(Leu) \leftrightarrow GTA(Val)

Weg (I) braucht einen nichtsynonymen und einen synonymen Austausch während Weg (II) zwei nichtsynonyme Nukleotidaustausche benötigt. Wenn beide Wege als gleich wahrscheinlich betrachtet werden, so muß die relative Anzahl der verschiedenen Substitutionsarten unterschiedlich gewichtet werden. Dies fließt in die Berechnung der d_S - (Mittelwert aller synonymen Nukleotidsubstitutionen pro synonyme Stelle = Rate der synonymen Substitutionen) und d_N -Werte (Mittelwert aller nichtsynonymen Nukleotidsubstitutionen nichtsynonymer Stelle = Rate der nichtsynonymen Substitutionen) mit ein. Außerdem erlaubt dieses Programm die Erstellung von Stammbäumen, die nur unter der Berücksichtigung der synonymen oder nichtsynonymen Austauschraten berechnet werden.

Mit dem „Phylip-Dnadist-Drawtree-Paket“ werden die Sequenzen hingegen auf reiner Nukleotidbasis verglichen, um eine phylogenetische Verwandtschaft zu berechnen (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dnadist-simple.html>; <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/drawtree-simple.html>).

4 Ergebnisse

4.1 Evolution des Effektorprotein-Repertoires von *Salmonella* spp.

Phylogenetische Analysen haben gezeigt, daß der Bereich von SPI1, der wichtige Komponenten des Typ-III-Translokationsapparates (*invH*, *invE*, *invA*, *spaM/invJ*, *spaO*, *spaP* und *spaQ*; siehe rechte Seite von SPI1, Abbildung 8A) kodiert, in einer frühen Phase der Entwicklung von *Salmonella* spp., nach der Abspaltung von *Escherichia* spp. vor ca. 50 bis 100 Millionen Jahren, erworben worden ist (Li *et al.*, 1995; Boyd *et al.*, 1997; Ochman und Groisman, 1996). Diese Gene sind in *S. bongori* und in sämtlichen *S. enterica*-Subspezies vorhanden. Der Erwerb und Erhalt eines hochkonservierten Sekretionsapparates ist jedoch nur zu verstehen, wenn neben diesem Apparat auch Gene vorhanden sind, welche für Effektorproteine kodieren, die die eigentlichen Virulenzfunktionen vermitteln. Effektorproteine, die in diesem frühen Stadium der Evolution der *Salmonella* spp. bereits im Chromosom integriert worden waren, sollten sich durch phylogenetische Analysen identifizieren lassen. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine solche Analyse vorgenommen, in der sämtliche bis dato identifizierten Proteine, die mit Hilfe des SPI1-Typ-III-Translokationsapparates sekretiert werden, miteinbezogen wurden. Hierzu gehören die in SPI1 kodierten Proteine SipA, SipB, SipC, SptP und AvrA und die Effektoren SopD, SopE, SopE2 und SopB, die in anderen Regionen des Chromosoms kodiert sind (Abbildung 7). Um die Verteilung in *S. bongori* und in sämtlichen *S. enterica*-Subspezies zu bestimmen, wurde diese Analyse an Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung vorgenommen.

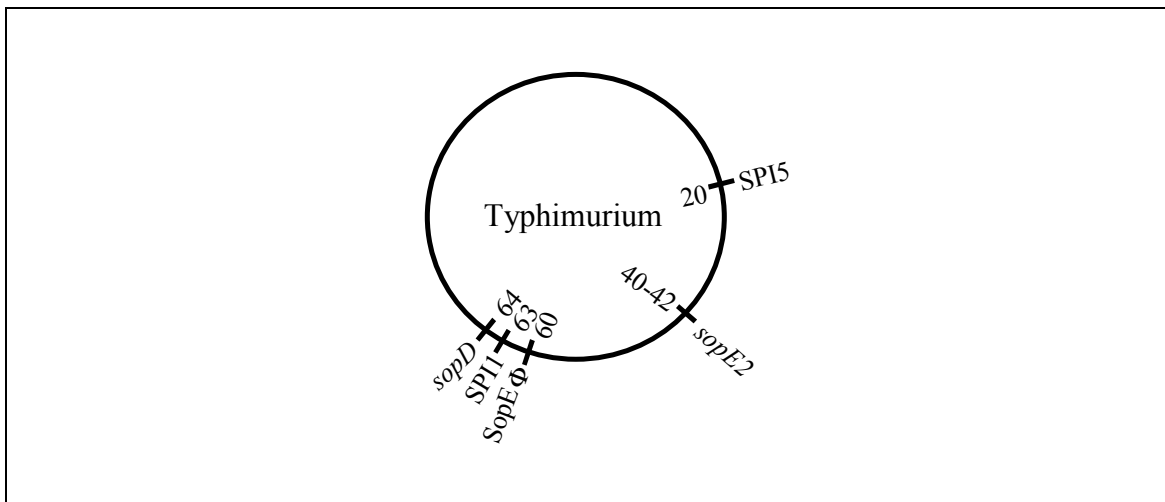


Abbildung 7: Chromosomale Karte von *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium. SPI1 kodiert ein Typ-III-Translokationssystem und die translozierten Effektorproteine SipA, SipB, SipC, SptP und AvrA. Weitere Typ-III-abhängig translozierte Effektoren sind in anderen chromosomalen Regionen kodiert. SopEΦ: *sopE* eingebettet in Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Bakteriophagen der P2-Familie (Hardt *et al.*, 1998a); SPI5: beinhaltet *sopB* (Wood *et al.*, 1998); Zahlen: Zentisombereiche des Typhimurium-Chromosoms.

4.1.1 Analyse der Verbreitung SPI1-kodierter Effektorproteine

Die Verteilung der in SPI1 lokalisierten Effektorgene wurde mittels DNS-Hybridisierungsanalyse nach Southern bestimmt. Hierzu wurde chromosomale DNS der Stämme der SARC-Referenzstammsammlung isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* gespalten. Die aufgetrennten Fragmente wurden mit Fluoreszein-markierten Gensonden für *sipA*, *sipB*, *sipC* oder *sptP*, hybridisiert (Abbildung 8A und B; Tabelle 11; Kapitel 9.1). Obwohl teilweise ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus vorliegt, hybridisierte jede Sonde in ver-

gleichbarer Stärke mit der chromosomalen DNS aller Stämme der SARC-Referenzstammsammlung (Tabelle 13; Abbildung 8B, Kapitel 9.1). Chromosomale DNS von *Yersinia enterocolitica* WA-C (pYV08), *Shigella flexneri* S1227 und des enteropathogenen *E. coli*-Stamms 2348/69, die auch Typ-III-Translokationssysteme besitzen, ergaben kein detektierbares Signal mit den gewählten Sonden (Abbildung 8B; Spur a, b, c). Aus den Ergebnissen dieser Hybridisierungsexperimente läßt sich schließen, daß die Gene der Effektorproteine SipA, SipB, SipC und SptP in allen untersuchten *Salmonella* spp. vorhanden sind.

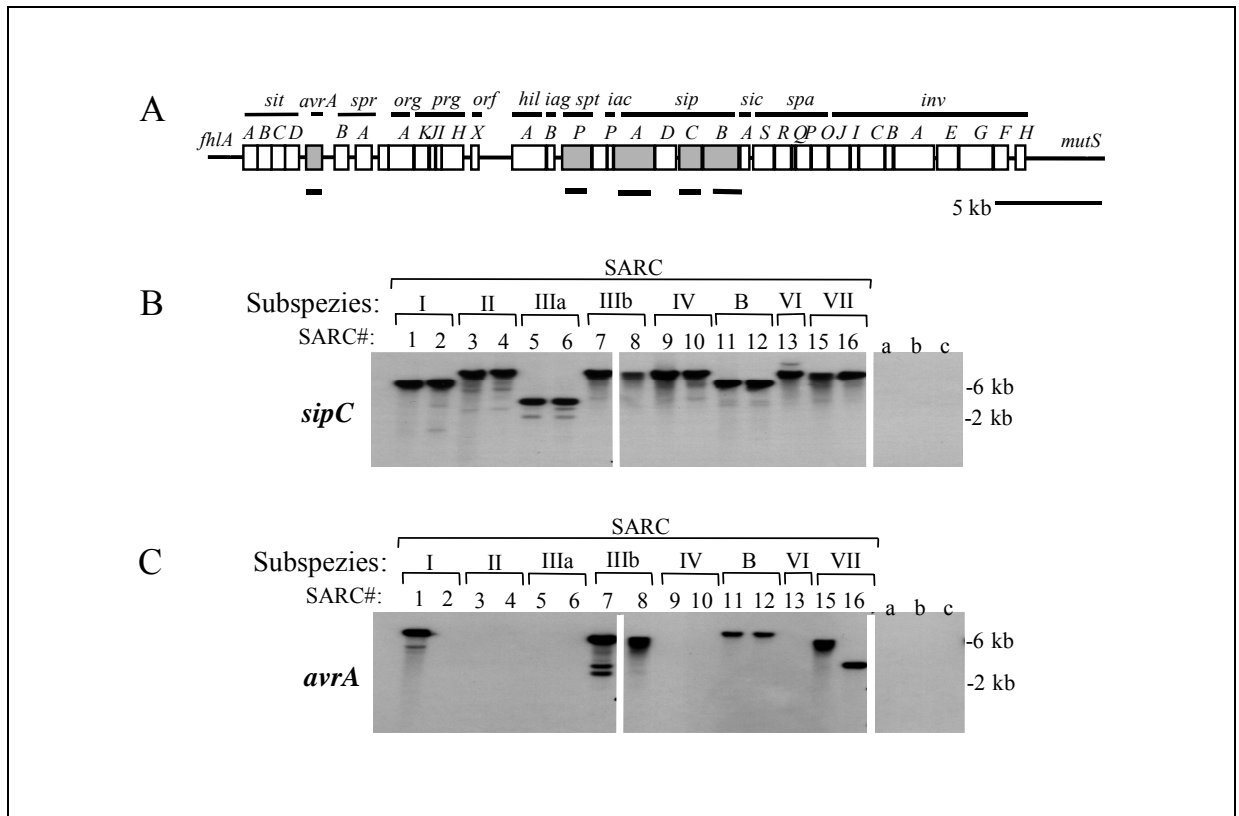


Abbildung 8: Translozierte Effektorproteine der SPI1. **A:** Karte von SPI1; grau: bekannte Gene translozierter Effektorproteine; schwarze Balken: Southernhybridisierungssonden. **B + C:** Southernhybridisierungsanalyse der *sipC*- (**B**) und *avrA*- (**C**) Verteilung innerhalb der SARC-Sammlung; a: *Yersinia enterocolitica* WA-C (pYV08); b: *Shigella flexneri* S1227; c: *E. coli* 2348/69. B: *S. bongori*.

Die Verteilung von *avrA* unter den Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung wurde ebenfalls analysiert. *AvrA* liegt am linken Rand der SPI1 und ist stromaufwärts von den Genen der Regulationsproteine *sprB* und *sprA* und stromabwärts von dem Operon *sitA-D* (ein Eisentransportsystem) flankiert (Abbildung 8A; Eichelberg *et al.*, 1999; Janakiraman und Slauch, 2000; Zhou *et al.*, 1999c). *AvrA* kodiert ein transloziertes Protein, das Ähnlichkeiten zu AvrRxv (Genbank L20423) und AvrBsT (Genbank AF156163) des pflanzenpathogenen Bakteriums *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und zum Apoptose-induzierenden Effektorprotein YopP/YopJ von *Yersinia* spp. (Genbank L33833, AF023202 und AF074612) aufweist. Southernhybridisierungen mit einer *avrA*-spezifischen Sonde zeigten, daß *avrA* in den SARC-Stämmen der *S. enterica*-Subspezies-I, -IIIb und -VII und in *S. bongori* vorhanden ist (Abbildung 8C). In den anderen analysierten Stämmen war *avrA* nicht nachweisbar (Abbildung 8C). Ein Zusammenhang zwischen dem Verteilungsmuster von *avrA* und der phylogenetischen Verwandtschaft der *avrA*-positiven Stämme der SARC-Referenzstammsammlung ist nicht erkennbar (Tabelle 13). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorherigen Studien, in denen gezeigt werden konnte, daß *avrA* nicht in allen Serovaren der *S. enterica*-

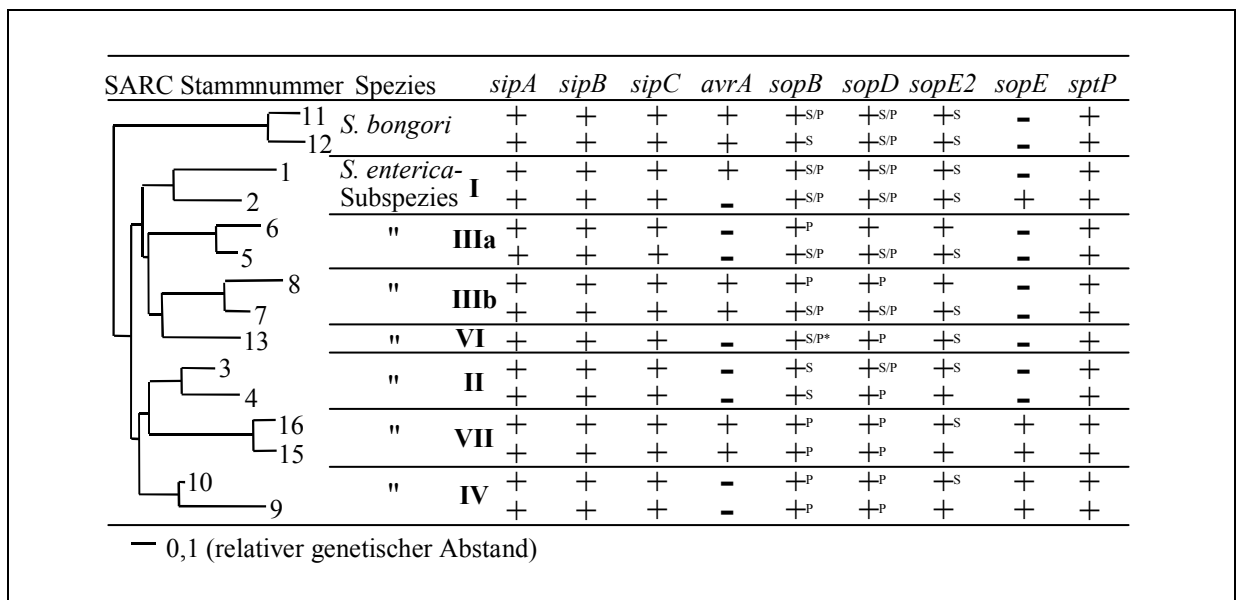
Subspezies-I vorhanden ist. Es liegt also auf beiden taxonomischen Ebenen (Subspezies- und Serovar-Ebene) hoch variabel vor (Hardt *et al.*, 1997). Diese Daten können auf zwei Weisen interpretiert werden:

(1): *AvrA* war bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren von *S. bongori* und *S. enterica* vorhanden und deletierte nachträglich wieder in einigen Stämmen.

(2): Mehrere zufällige Transferereignisse erfolgten nach der Diversifizierung in die einzelnen Subspezies und Serovare.

Im Gegensatz zu *AvrA* sind die Effektoren aus dem Kern der Pathogenitätsinsel (*SipA*, *SipB*, *SipC* und *SptP*) hoch konserviert und waren bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren von *S. bongori* und den *S. enterica* Subspezies vorhanden.

Tabelle 13: Verteilung der Gene der SPI1-abhängig translozierten Proteine in *Salmonella* spp.. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.1 bis 4.1.4 sind in dieser Tabelle zusammengefaßt. Der phylogenetische Stammbaum von Boyd *et al.*, 1996, abgeleitet. S, S/P, P: Untersuchung der chromosomalen Lage von *sopB*, *sopD* und *sopE2* über Southernhybridisierungsanalyse (S), Polymerasekettenreaktion (P) oder über beide Techniken (S/P) *: SARC13-PCR-Produkt (pr1/pr2) hatte nur eine Länge von 6 kb gegenüber 8,5 kb bei SARC1, 2, 5-11, 15 und 16.



4.1.2 *SopB* ist in allen Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung vorhanden

In *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Dublin liegt *sopB* bei Zentisom 20 des Chromosoms und ist Teil von SPI5 (Wood *et al.*, 1998; Abbildung 7; Abbildung 9A).

In einer Southernhybridisierungsanalyse, in der eine *sopB*-spezifische Sonde verwendet wurde, konnte gezeigt werden, daß *sopB* in allen Subspezies der SARC-Referenzstammsammlung vorhanden ist (Abbildung 9, Tabelle 13, Kapitel 9.1). Southernhybridisierungs- und PCR-Analysen haben ferner gezeigt, daß *sopB* (bzw. SPI5) immer an der selben Stelle des Chromosoms lokalisiert ist. Hierzu wurde chromosomale DNS der Stämme der SARC-Referenzstammsammlung mit *SalI* gespalten und mit den spezifischen Sonden für *sopB* und *hpaB* hybridisiert. Im Fall von SARC-Stamm 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 12 und 13 ergaben sich mit beiden Sonden gleiche Hybridisierungsmuster, was darauf hindeutet, daß *sopB* und *hpaN* in enger Nachbarschaft lokalisiert sind (Tabelle 13; Abbildung 9B). PCR Produkte der erwarteten Länge konnten mit den Oligonukleotiden 1 und 2 in folgenden SARC-Isolaten hergestellt werden: SARC1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15 und 16 (Tabelle 13; Abbildung 9C). Mutationen in den Oligonukleotidbindebereichen können dafür verantwortlich sein, daß keine PCR-

Produkte mit SARC3 und 4 erhalten wurden. SARC13 ergab ein um 2,5 kb verkürztes PCR-Produkt, was auf eine Deletion hindeutet. Eine weitere Restriktionskartierung dieses Stammes ergab, daß die Deletion zwischen der linken Grenze von SPI5 und dem *hpaB*-Gen erfolgt sein muß (Abbildung 9A; Daten nicht gezeigt). SPI5 blieb also auch in diesem Stamm unverändert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß *sopB* in sämtlichen Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung vorhanden ist und daß SPI5 immer in der Nähe des *hpaB*-Gens inseriert ist. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß SopB schon im letzten gemeinsamen Vorfahren von *S. bongori* und der *S. enterica*-Subspezies vorhanden war.

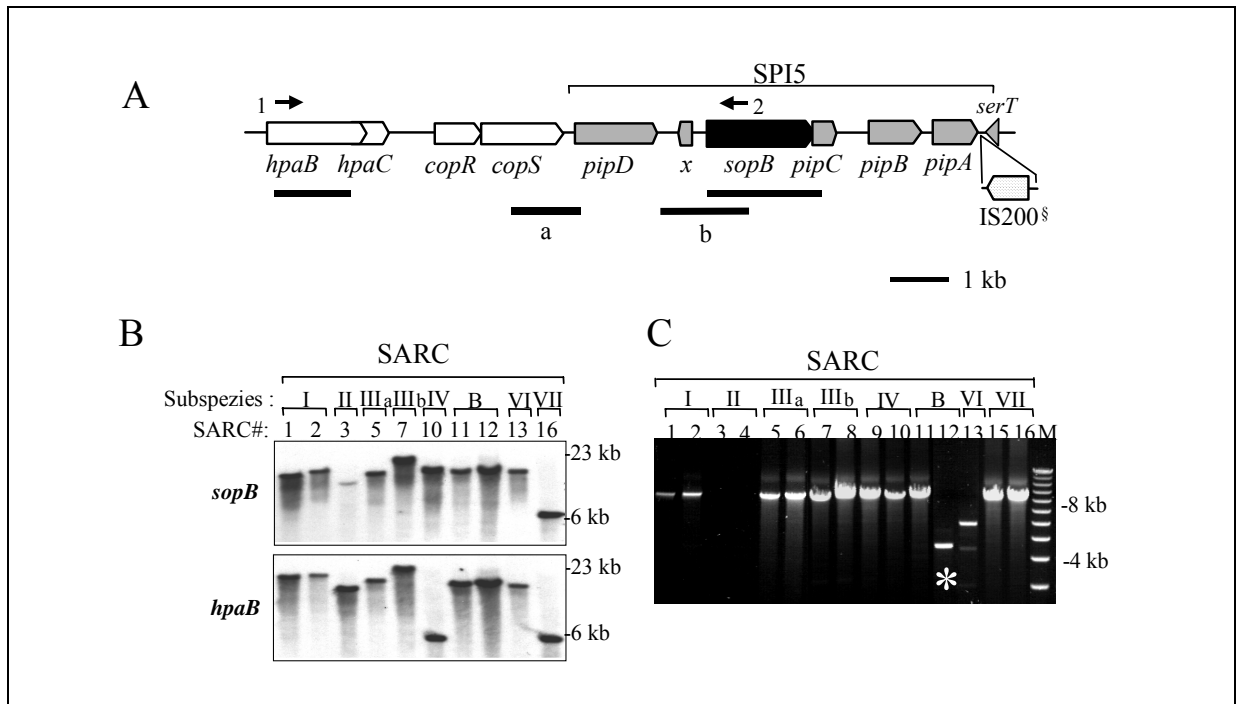


Abbildung 9: Analyse der Konservierung der *sopB*-Region. Das Effektorprotein SopB ist in SPI5 kodiert und ist bei allen Subspezies in die gleiche chromosomale Region integriert. **A:** Karte von SPI5 (graue und schwarze Pfeile) und der angrenzenden Region mit Ähnlichkeit zu Genen aus *E. coli*. (weiße Pfeile); kleine Pfeile: Oligonukleotide für die PCR-Analyse; Balken: Sonden für die Southernhybridisierungsanalysen; §: IS200 Element in SPI5 von Typhi (Sequenzierungsprojekt am Sangerzentrum), das in Dublin (Genbank AF060858) fehlt. **B:** *S. bongori* B: Southernhybridisierungsanalyse: *SalI*-gespaltene chromosomale DNS der SARC-Stämme wurde mit *sopB*- und *hpaB*-Sonden hybridisiert. **C:** PCR-Analyse unter der Verwendung der Oligonukleotide 1 und 2 (Tabelle 10). **B:** *S. bongori*. *: Bei dem PCR-Produkt von SARC12 handelt es sich um ein Artefakt, da ein PCR-Produkt gleicher Länge erhalten werden konnte, wenn Oligonukleotid 1 aus der Reaktion weggelassen wurde.

4.1.3 *SopD* ist in allen Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung vorhanden

Gemäß der *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhi Genomsequenz liegt *sopD* bei Zentisom 64, ungefähr 40 kb entfernt von SPI1 (Abbildung 10A). *SopD* besitzt einen niedrigeren GC-Gehalt als die angrenzenden chromosomalen Regionen und liegt zwischen zwei offenen Leserastern, die Sequenzähnlichkeiten zu *cysH* (3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat-sulfo-transferase; Jones *et al.*, 1998) und *ycgB* aufweisen (Abbildung 10A). In *E. coli* liegen diese beiden Gene in direkter Nachbarschaft zueinander (Blattner *et al.*, 1997). *SopD* kodiert für ein 40 kDa, Typ-III-transloziertes Protein, dessen genaue Funktion in der Wirtszelle nicht bekannt ist. Im Rind ist SopD zusammen mit SopB für das Auftreten der Diarrhoe verantwortlich (Jones *et al.*, 1998). Die Analyse von sieben Isolaten zeigte, daß *sopD* wahrscheinlich in sämtlichen *S. enterica*-Subspezies-I-Stämmen vorkommt (Jones *et al.*, 1998). Um eine genauere Aussage über den Zeitpunkt des Erwerbs von *sopD* zu erhalten, wurde eine Southern-

hybridisierungsanalyse mit einer *sopD*-Gensonde und der SARC-Referenzstammsammlung durchgeführt, die neben Stämmen der *S. enterica*-Subspezies-I, -II, -IIIa, -IIIb, -IV, -VI und -VII auch zwei *S. bongori*-Stämme umfaßt.

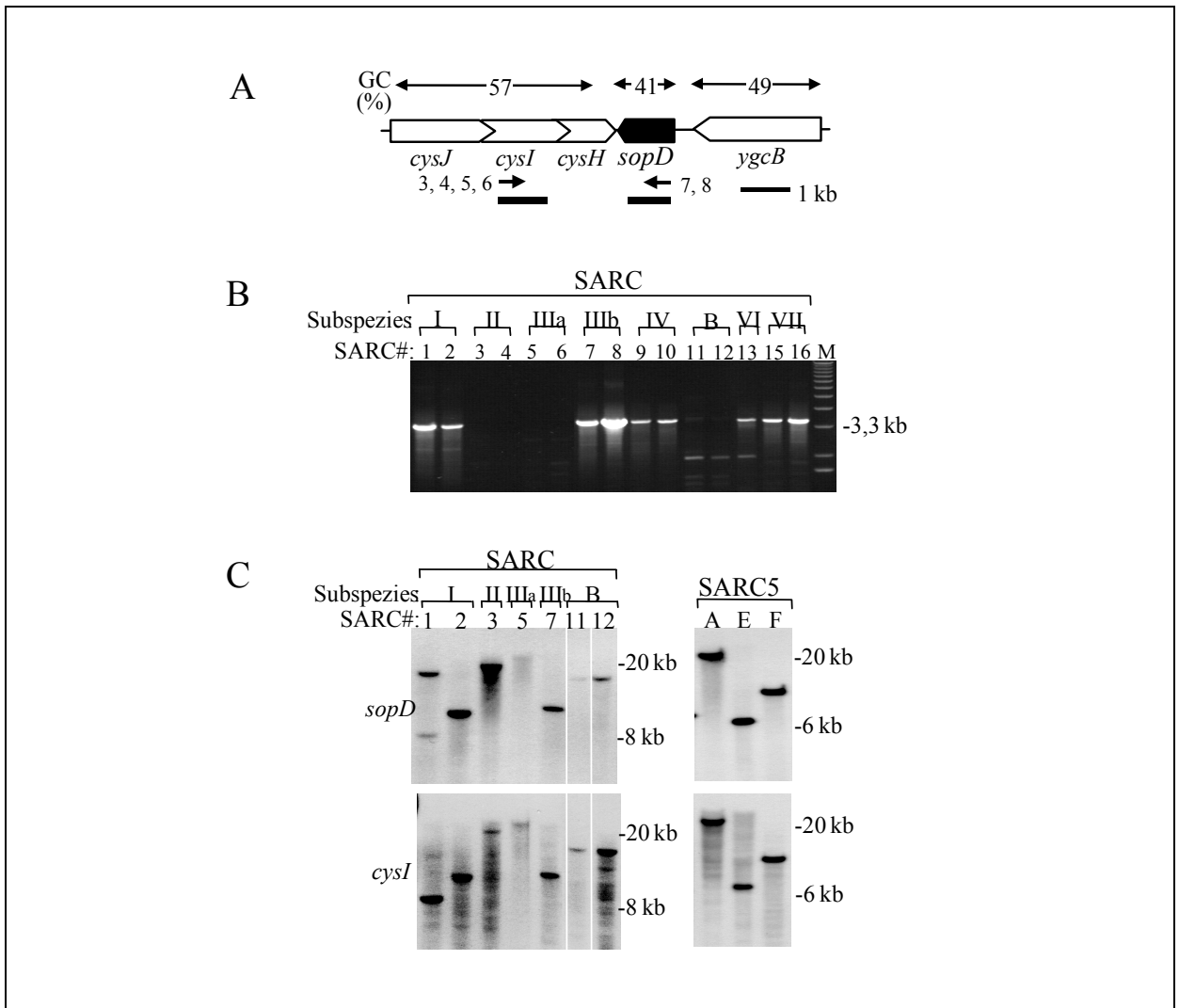


Abbildung 10: Analyse der Konservierung der *sopD*-Region. Das Effektorprotein SopD ist in *S. bongori* (B) und allen *S. enterica* Subspezies vorhanden und ist in der gleichen chromosomalen Region zwischen *cysH* und *ycgB*, 40 kb stromabwärts von SPI1, integriert. **A:** Karte der *sopD*-Region nach Sequenzdaten des Typhi-Genomsequenzierungsprojektes; schwarzer Pfeil: *sopD*; weiße Pfeile: *E. coli*-ähnliche Sequenzen; kleine Pfeile: Oligonukleotide für PCR-Analysen; Balken: Sonden für die Southernhybridisierung; Doppelpfeile: durchschnittlicher G+C-Gehalt (%) der entsprechenden Region. **B:** PCR-Analyse der *sopD*-Region mit Oligonukleotiden 3 und 7; M: DNS-Größenleiter. (Oligonukleotidsequenzen: Tabelle 9; PCR-Bedingungen: Tabelle 10) **C:** Southernhybridisierungsanalyse an ausgewählten SARC-Stämmen; linke Seite: Southernhybridisierung *Pst*I-gespaltener chromosomaler DNS wurde mit Gensonden für *sopD* und *cysI* hybridisiert; rechte Seite: Southernhybridisierungsanalyse chromosomaler DNS von SARC5 nach restriktionsendonukleolytischer Spaltung mit *Ava*I (A), *Eco*RI (E) und *Fsp*I (F).

Sämtliche Isolate der SARC-Referenzstammsammlung ergaben ein *sopD*-spezifisches Hybridisierungssignal (Tabelle 13, Kapitel 9.1). Im Gegensatz dazu blieb die Analyse für andere enteropathogene Bakterien (*Shigella* spp., *Yersinia* spp. und *E. coli*) negativ (Kapitel 9.1).

Ferner sollte festgestellt werden, ob *sopD* grundsätzlich benachbart zum *cysHIJ*-Operon lokalisiert ist. Dazu wurden Polymerasekettenreaktionen mit den Oligonukleotiden 3 und 7 (Abbildung 10A; Tabelle 10) durchgeführt. Dabei konnte die Kolokalisation von *cysI* und *sopD* in den Fällen von SARC1, 2, 7, 8, 9, 10, 13, 15 und 16 nachgewiesen werden (Abbildung 10B). Mit den Stämmen SARC3, 4, 5, 6, 11 und 12 konnten mit den Oligonukleotiden 3 und 7 keine PCR-Produkte erhalten werden. Vermutlich sind bei diesen Stämmen Mutationen in den Oligonukleotidbindebereichen aufgetreten. PCR-Reaktionen mit weiteren Oligonukleotidpaaren (Abbildung 10A; 4/7; 5/8; 6/8; Tabelle 9; Tabelle 10) mußten angeschlossen werden, um auch bei den übrigen Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung nachzuweisen, daß *sopD* neben dem *cysHIJ*-Operon lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Für SARC6 konnte in keinem der Versuche ein spezifisches Produkt erhalten werden. Auf weitere Oligonukleotidkombinationen wurde jedoch verzichtet, da bereits mit dem Stamm SARC5, der wie SARC6 zur *S. enterica*-Subspezies-IIIa gehört, die konservierte Lage über Southernhybridisierungsanalysen (siehe unten) nachgewiesen werden konnte. Insgesamt haben die Ergebnisse dieser PCR-Analysen jedoch gezeigt, daß *sopD* bei allen SARC-Stämmen in der gleichen chromosomalen Region zwischen *cysI* und *ycgB* integriert ist (Tabelle 13).

Parallel zu den PCR-Analysen bestätigen Southernanalysen mit *sopD*- und *cysI*-spezifischen Sonden, daß bei den Stämmen SARC1, 2, 3, 5, 7, 11 und 12 die Gene *sopD* und *cysI* in naher Nachbarschaft zueinander liegen müssen (Tabelle 13; Abbildung 10C). Die *sopD*- oder *cysI*-spezifischen Sonden hybridisierten bei sämtlichen untersuchten Stämmen mit *EcoRV*-Fragmenten identischer Größe (bzw. im Fall von SARC5 mit *AvaI*-, *EcoRI* und *FspI*-Fragmenten identischer Größe; Abbildung 10C).

Die Ergebnisse der Southernhybridisierungsexperimente und der PCR-Analysen belegen also, daß *sopD* in allen Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung (mit Ausnahme von SARC6) in naher Nachbarschaft zu *cysI* liegt. Ein Szenario mit mehreren unabhängigen horizontalen Transferereignissen, die möglicherweise zur Integration von *sopD*-Genen in verschiedene Stellen des Chromosoms geführt haben, kann somit ausgeschlossen werden. Da *sopD* in *S. bongori* und in allen Subspezies von *S. enterica* konserviert vorliegt, muß *sopD*, genauso wie *sopB*, bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren vor ca. 50 Millionen Jahren vorhanden gewesen sein und wurde in der frühen Phase nach Abspaltung von *Escherichia* spp. durch horizontalen Gentransfer erworben (Abbildung 6).

4.1.4 *SopE* ist hoch variabel, während der *sopE2*-Locus konserviert ist

In *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium ist *SopE* bei Zentisom 60 kodiert (Abbildung 7). Interessanterweise konnte in früheren Experimenten festgestellt werden, daß *sopE* nur in einigen der *S. enterica* Subspezies I Serovaren vorkommt (Hardt *et al.*, 1998a). Die Verteilung von *sopE* in phylogenetisch weniger nah verwandten *Salmonella* spp. war jedoch noch nicht analysiert worden.

Southernhybridisierungsexperimente mit einer *sopE*-spezifischen Sonde ergaben, daß dieses Gen in der SARC-Referenzstammsammlung nur in den *S. enterica*-Subspezies-I-, -IV- und -VII-Stämmen vorhanden ist (Tabelle 13, Kapitel 9.1). Es ist keine Korrelation zwischen der An- und Abwesenheit von *sopE* und der phylogenetischen Verwandtschaft der betreffenden Stämme zu erkennen (Tabelle 13). Das deutet darauf hin, daß ein horizontaler Transfer von *sopE* vermutlich mehrere Male stattgefunden hat. Anhand der Hybridisierungsdaten allein kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, zu welchem Zeitpunkt *sopE* entstanden (z.B. durch Genduplikation aus *sopE2*) oder zum ersten Mal in *S. enterica*-Stämme transferiert worden ist.

SopE2 ist auf Proteinebene ungefähr 70 % identisch zu *SopE*. Es ist auf Zentisom 40, am Rand eines ungefähr 60 kb chromosomalen Elementes kodiert, das wenig Ähnlichkeit zu *E.*

coli Sequenzen zeigt. *SopE2* hat mit 42 % einen geringeren G+C-Gehalt als die angrenzenden chromosomalen Regionen (Abbildung 11A), und es war lediglich bekannt, daß *sopE2* in mehreren *S. enterica*-Subspezies-I-Stämmen vorkommt (Stender *et al.*, 2000). Die Verteilung in *S. bongori* und den übrigen *S. enterica*-Subspezies ist jedoch nicht bekannt.

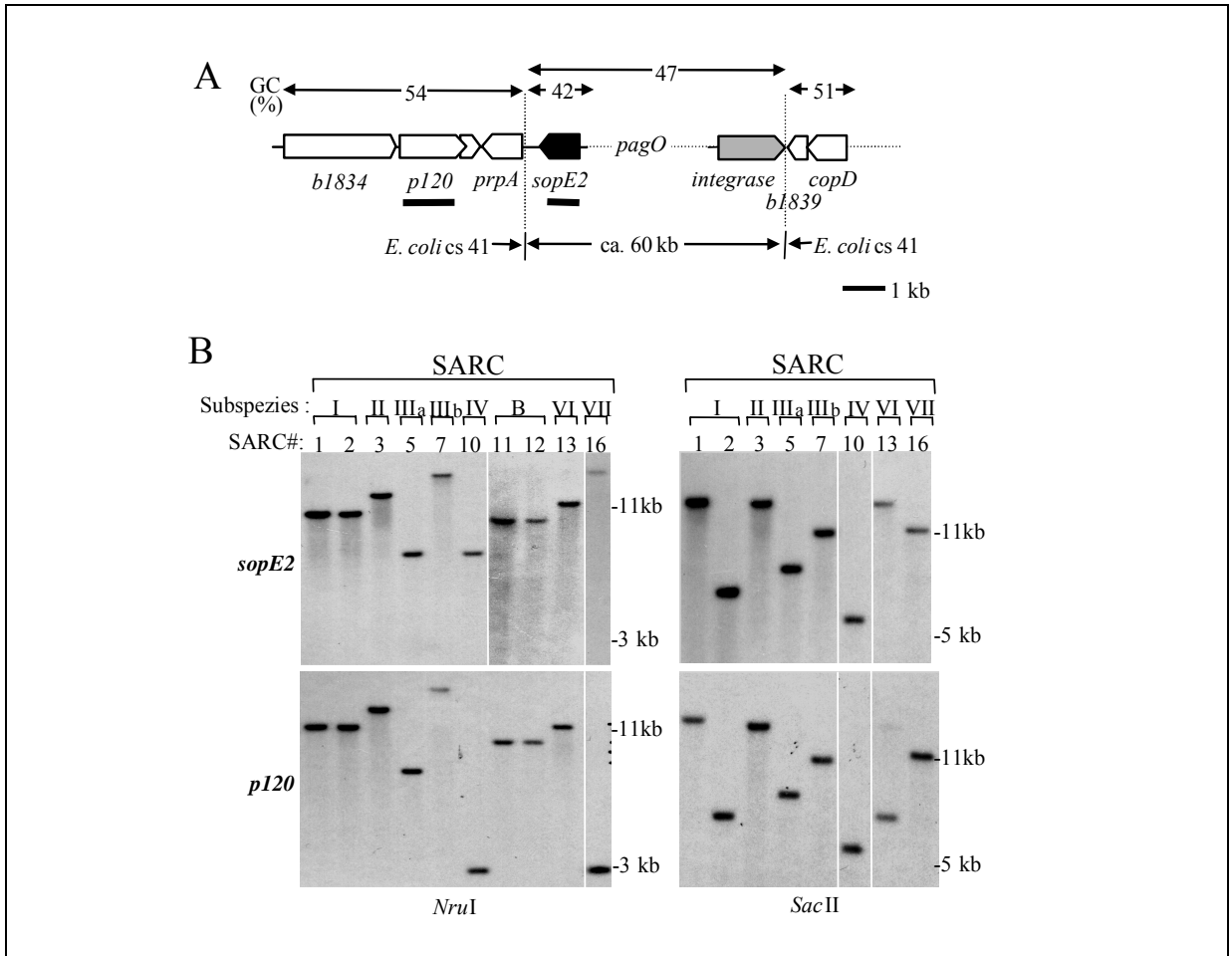


Abbildung 11: Konservierte *sopE2*-Region. *SopE2* (inklusive eines ca. 60 kb großen Fragments) ist in *S. bongori* (B) und in allen *S. enterica*-Subspezies in die gleiche chromosomale Region integriert. **A:** Karte der *sopE2*-Region; schwarzer Pfeil: *sopE2*; weiße Pfeile: *E. coli*-ähnliche Sequenzen; Doppelpfeile oben: G+C-Gehalt (%) der entsprechenden Region; Doppelpfeil unten: *sopE2* bildet die linke Flanke einer 60 kb Region, die wenig Ähnlichkeit zu *E. coli*-Sequenzen besitzt; grauer Pfeil: offener Leserahmen mit Ähnlichkeit zu Integrasen lambdoider Bakteriophagen auf der rechten Seite des 60 kb inserierten Elementes; schwarze Balken: Southernhybridisierungssonden. **B:** Southernhybridisierungsanalyse zur Abschätzung der Konserviertheit des *sopE2*-Integrationsortes.

In Southernhybridisierungsexperimenten mit *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNS von Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung und einer *sopE2*-Gensonde konnte gezeigt werden, daß *sopE2* in jedem Isolat der SARC-Sammlung und somit sowohl in *S. bongori* als auch in sämtlichen *S. enterica*-Subspezies vorhanden ist (Tabelle 13, Kapitel 9.1). Dabei waren die Hybridisierungsbedingungen stringent genug, um das homologe *sopE*-Gen nicht zu erfassen.

Die chromosomale Lage von *sopE2* wurde ebenfalls durch Southernhybridisierungen analysiert (Abbildung 11B). Chromosomale DNS von jeweils mindestens einem Vertreter von *S. bongori* und der *S. enterica*-Subspezies wurden entweder mit *NruI* oder mit *SacII* gespalten und mit Gensonden spezifisch für *sopE2* oder *p120* hybridisiert (Abbildung 11A und B). Da-

bei hybridisierten im Fall von SARC 1, 2, 3, 5, 7, 11, 12 und 13 beide Sonden zu *NruI*-Fragmenten identischer Größe (Abbildung 11B). Im Fall der Stämme SARC1, 2, 3, 5, 7, 10 und 16 hybridisierten beide Sonden mit *SacII*-Fragmenten identischer Größe (Abbildung 11B). Dies läßt darauf schließen, daß *sopE2* und *p120* in diesen Stämmen nahe beieinander liegen müssen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse also, daß *sopE2* in *S. bongori* und allen *S. enterica*-Subspezies an der gleichen chromosomalen Position (Zentisom 40-42) lokalisiert ist.

Die Daten zeigen somit zusammenfassend, daß die außerhalb von SPI1 kodierten Effektorgene *sopE2*, *sopB*, sowie *sopD* in sämtlichen untersuchten *S. bongori*-Stämmen und in den *S. enterica*-Subspezies vorhanden sind. Daraus läßt sich schließen, daß diese Gene bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren von *S. bongori* und *S. enterica* vorhanden waren. Im Gegensatz dazu ist *sopE* weder innerhalb der *S. enterica*-Subspezies (SARC-Referenzstammsammlung, diese Arbeit) noch innerhalb einzelner *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare konserviert (Hardt *et al.*, 1998a). Dies deutet darauf hin, daß *sopE* nach der Aufspaltung in die verschiedenen *S. enterica*-Subspezies und -Serovare horizontal transferiert worden ist. Die Effektoren aus SPI1 sind hingegen, mit Ausnahme von *AvrA*, hoch konserviert. Aus der Konservierung von *sipA*, *sipB*, *sipC*, *sptP*, *sopB*, *sopD* und *sopE2* läßt sich schließen, daß sie eine wichtige basale Funktion für *Salmonella* spp. haben und seit der Aufspaltung in *S. bongori* und *S. enterica* zusammen mit den Genen des SPI1-Typ-III-Sekretionsapparates koevolviert sind.

4.1.5 Phylogenetische Analyse der Herkunft von *sopE*

Anhand einer phylogenetischen Analyse sollte geklärt werden, ob *sopE* möglicherweise aus *sopE2* durch Genduplikation entstanden ist.

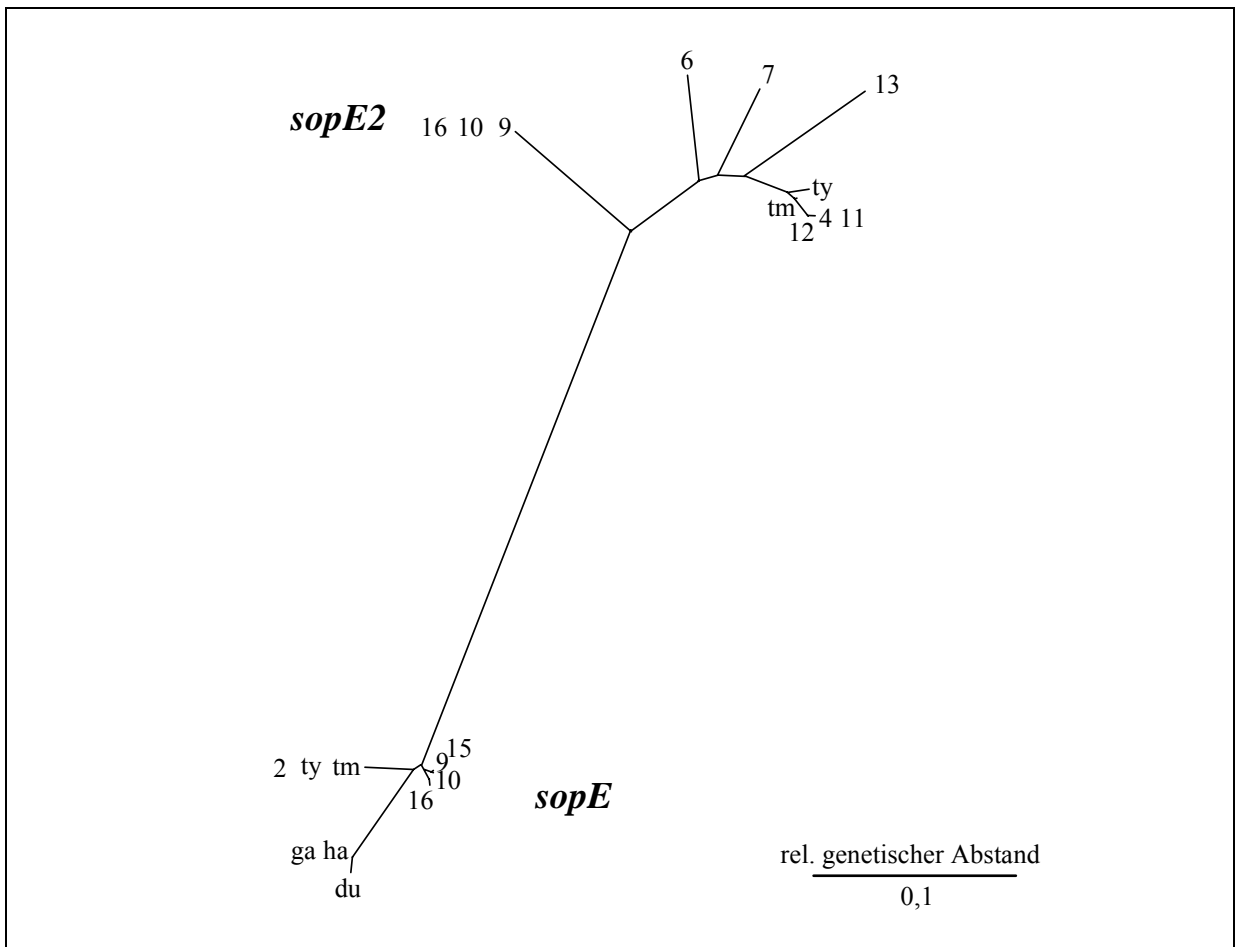


Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum der *sopE*- und *sopE2*-Gruppe. Kodierende Sequenzen von *sopE* und *sopE2* wurden kloniert, sequenziert und mit Hilfe des „Clustal“-Programmes verglichen (Kapitel 3.7.2). Der phylogenetische Stammbaum wurde auf Basis der variablen Nukleotidpositionen „DNA-DIST-Phylip“-Programmpaket) erstellt. Die *sopE*- und *sopE2*-Sequenzen bilden abgetrennte phylogenetische Gruppen. tm: Typhimurium SL1344 (*sopE*: AF043239/ *sopE2*: AF217274); ty: Typhi (*sopE*: Stamm X3744 (pM6 und pM11)/ *sopE2*: Stamm CT18, contig 1699); ha: Hadar X3230 (*sopE*: pM19); ga: Gallinarum X3796 (*sopE*: pM16); du: Dublin (*sopE*: L78932); 2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16: SARC2, SARC6, SARC7, SARC9, etc., siehe Tabelle 4 für die Beschreibung der Vektoren).

Zu diesem Zweck wurden die kodierenden Sequenzen von *sopE* und *sopE2* aus Stämmen der SARC-Referenzstammsammlung und weiterer *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare kloniert und sequenziert (*sopE*: SARC2, SARC9, SARC10, SARC15, SARC16, Typhimurium SL1344 (AF043239); Typhi X3744 (ty), Hadar X3230 (ha), Gallinarum X3796 (ga); (pM6, pM11, pM16, pM19, pM64-pM68); *sopE2* (kodierende Sequenz von Aminosäure 103-199): SARC4, SARC6, SARC7, SARC9, SARC10, SARC11, SARC12, SARC13 und SARC16; (pM59-pM61, pM63, pM69-pM73); Tabelle 4, Tabelle 10). Weitere *sopE*- bzw. *sopE2*-Sequenzen verschiedener *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare wurden aus der Gendatenbank „Genbank“ entnommen (*sopE*: Dublin (du, L78932); Typhimurium SL1344 (tm, AF043239); *sopE2*: Typhimurium SL1344 (tm, AF217274); Typhi CT18 (ty, contig 1699 des Sangersequenzierungsprojektes)). Die Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des „Clustal“-Programmes mit-

einander verglichen. Ein phylogenetischer Stammbaum wurde anhand der identifizierten Variationen in den Nukleotidsequenzen mit Hilfe des „DNA-Dist-Phylip“-Analysepaketes berechnet (Kapitel 3.7.2). *SopE*- und *sopE2*-Sequenzen bilden klar abgegrenzte phylogenetische Gruppen. Im Vergleich zur Diversität innerhalb der beiden einzelnen Gruppen liegt die *sopE*- und *sopE2*-Gruppe sehr weit voneinander entfernt. Wenn *sopE* aus *sopE2* von *Salmonella* spp. hervorgegangen sein sollte, so muß dies also bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt geschehen sein. Alternativ kann *sopE* durch ein zweites horizontales Gentransferereignis aus einer unbekanntem weiteren Spezies in *S. enterica* transferiert worden sein.

4.2 Phylogenetische Analyse von *sopB*, *sopD* und *sopE2*

Ziel dieser Untersuchung war es, die frühe Akquisition der konservierten Effektoren SopB, SopD und SopE2 auch anhand phylogenetischer Daten nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurden die Nukleotidsequenzen von Teilen der kodierenden Regionen von *sopB* (nt 434- nt 1686), *sopE2* (nt 306- nt 599) und *sopD* (nt 93- nt 603) der Stämme SARC7 (*S. enterica*-Subspezies-IIIb), SARC10 (*S. enterica*-Subspezies-IV) und SARC11, 12 (*S. bongori*) kloniert und sequenziert (*sopE2*: SARC7 (pM59); SARC10 (pM60); SARC11 (pM61); SARC12 (pM63); *sopB*: SARC7 (pM53), SARC10 (pM52); SARC11 (pM62); *sopD*: SARC7 (pM56); SARC10 (pM57); SARC11 (pM58); Tabelle 4, Tabelle 9, Tabelle 10). Diese Sequenzen wurden mit den bereits bekannten *sopB*-, *sopD*- und *sopE2*-Sequenzen der *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare Typhimurium (Stm), Typhi (Sty) und Dublin (Sdu) verglichen (*sopB*: Dublin/U90203; Typhi/ „contig“ 18 des Sequenzierungsprojektes am Sanger Centre; *sopD*: Typhi/ „contig“ 14 des Sequenzierungsprojektes; Dublin/AF030589; *sopE2*: Typhimurium/AF217274; Typhi/ „contig“ 1699 des Sequenzierungsprojektes; *putP*: Typhimurium/L01135; Typhi/L01134; SARC7/L01146; SARC10/L01143; SARC11/L01148; *spaO*: Typhimurium/U29364; Typhi/U29363; Dublin/U29345; SARC7/U29348; SARC10/U29358; SARC11/U29359). Der Sequenzvergleich zeigte, daß an einer großen Zahl von Nukleotidpositionen nichtsynonyme Nukleotidaustausche (in *sopB* (33,1 %), *sopD* (39,4 %) und *sopE2* (23,7 %)) vorkommen (Abbildung 13B). Im Vergleich dazu zeigten Haushaltsgene, wie beispielsweise *putP* (Prolinpermease) eine viel geringere Austauschrate an nichtsynonymen Nukleotidpositionen (2,66 %). Dementsprechend ist d_N (Mittelwert der nichtsynonymen Nukleotidsubstitutionen pro nichtsynonymer Stelle) für *sopB* (0,09), *sopD* (0,12) und *sopE2* (0,04) viel höher als für die Haushaltsgene *putP*, *gnd*, *mdh* und *aceK* ($d_N \leq 0,02$; Prolinpermease, Phosphoglukonatdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isozitatdehydrogenasekinase/-phosphatase) oder für Gene, die konservierte Komponenten des SPII-Typ-III-Sekretionsapparates kodieren (*invA*, *spaP*; Abbildung 13C). Der d_N -Wert für *sopB*, *sopD* und *sopE2* ist sogar größer als für *spaO* ($d_N = 0,03$), das für ein Protein kodiert, welches zwar sekretiert wird, aber zusätzlich eine essentielle Funktion beim Typ-III-Sekretionsmechanismus besitzt (Li *et al.*, 1995; Collazo und Galan, 1996). Für dieses sekretierte Protein konnte gezeigt werden, daß es im Vergleich zu membranständigen Komponenten des Typ-III-Sekretionsapparates sehr variabel ist (Li *et al.*, 1995). Erhöhte Nukleotidaustauschraten an nichtsynonymen Nukleotidpositionen, die zur Änderung der Aminosäuresequenz führen, werden oft bei Genen sekretierter Proteine von pathogenen Bakterien gefunden. Diese Gene unterliegen einem starkem Selektionsdruck, der beispielsweise durch das Immunsystem des Wirtes bedingt sein kann. Neue Anforderungen im Zusammenhang mit der Anpassung an Zielproteine der Wirtszellsignaltransduktionswege können ebenfalls einen Selektionsdruck auf die Änderung der Nukleotid- und somit Aminosäuresequenz ausüben (Li *et al.*, 1995).

Trotz der erheblichen Sequenzvariabilität zwischen den einzelnen *sopB*-Genen sind zwei Inositolphosphat-4-phosphatase-Konsensusmotive (Norris, 1998) in allen Sequenzen konserviert.

Diese Konsensusmotive sind für die biologische Funktion von *SopB* in *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Dublin essentiell (Norris *et al.*, 1998). Die molekulare Funktion von *SopB* scheint daher trotz aller Variabilität erhalten geblieben zu sein.

Im Vergleich zu den Haushaltsgenen oder den Genen, die auf der Pathogenitätsinsel 1 kodiert sind, ist die Zahl der synonymen Nukleotidsubstitutionen pro synonyme Stelle (d_s) für *sopB* ($d_s = 0,51$) und *sopD* ($d_s = 0,68$; Abbildung 13C) leicht erhöht. Dennoch ist unklar, ob diese Unterschiede signifikant sind, da die sequenzierten Fragmente -besonders die von *sopD* -sehr kurz sind. Darüberhinaus können Regionen mit ähnlichen d_s -Werten auch in den anderen Genen gefunden werden (Kodon 50-170 von *spaO* oder Kodon 380-480 von *putP*; Abbildung 13B).

Auf der Basis der synonymen (= stillen) Mutationen der kodierenden Sequenzen von *sopB*, *sopD* und *sopE2* wurden mit dem „SNAP-Analyseprogramm“ phylogenetische Stammbäume berechnet (Abbildung 13A, Kapitel 3.7.2). Zum Vergleich wurden die Stammbäume von *spaO* (Li *et al.*, 1995) und *putP* (Nelson und Selander, 1992) in die Analyse miteinbezogen. Die allgemeine Topologie der Stammbäume ist auffallend ähnlich (Abbildung 13A). Dies weist darauf hin, daß kein weiterer horizontaler Transfer zwischen den verschiedenen *Salmonella*-Linien nach der Aufspaltung in *S. bongori* und in die weiteren *S. enterica*-Subspezies stattgefunden hat. Die *sopE2*-Gene von *S. bongori* (SARC11 und SARC12) stellen dabei die einzige Ausnahme dar. Diese *sopE2*-Gene sind denen von *S. enterica*-Subspezies-I-Stämmen sehr ähnlich. Deshalb ist anzunehmen, daß *sopE2* in jüngerer Zeit zwischen der *S. enterica*-Subspezies-I und *S. bongori* transferiert worden ist.

Die phylogenetischen Analysen zeigen, daß *sopB*, *sopD* und *sopE2* ungefähr zeitgleich mit SPI1 in einer frühen Phase der Evolution der *Salmonella* spp. durch horizontalen Gentransfer erworben worden sind. Dieser Transfer fand für jedes Gen wahrscheinlich nur einmal statt (Ausnahme: *sopE2*). Er muß vor der Auftrennung in *S. bongori* und die weiteren *S. enterica*-Subspezies vor ca. 50 Millionen Jahren abgeschlossen gewesen sein. Somit kann der Zeitraum des horizontalen Transfers zwischen 100-160 Millionen (1 = Abspaltung der *Salmonella* spp. von *Escherichia* spp.; Abbildung 13D) und 50 Millionen Jahren (2; Abbildung 13D) vor unserer Zeit festgelegt werden (Abbildung 13D; Doolittle *et al.*, 1996; Lawrence und Ochman, 1997; Ochman und Wilson, 1987). Nach dem Erwerb dieser Gene fand eine Anpassung der Aminosäuresequenz an die Wirtszellbedingungen statt, wobei wahrscheinlich sowohl eine Optimierung der Kodonhäufigkeit als auch eine Adaptation an die Zielproteine in der Wirtszelle und das Umgehen von Abwehrmechanismen des Wirtes eine Rolle gespielt haben.

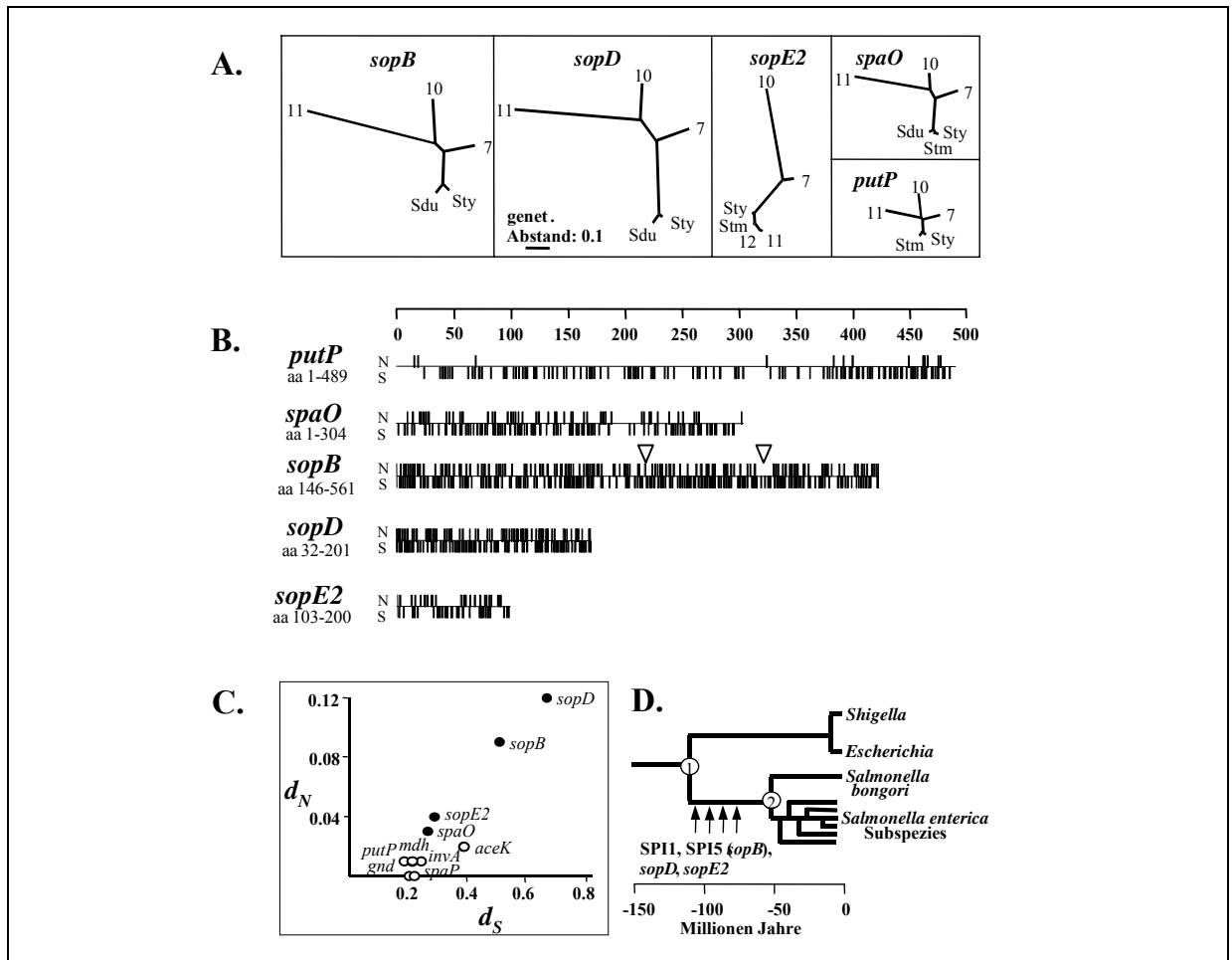


Abbildung 13: Phylogenetische Analyse von *sopB*, *sopD* und *sopE2*. **A:** Stammbäume, die aufgrund synonymen Nukleotidaustausche mit Hilfe des „SNAP“-Programmes erstellt wurden, zeigen eine auffallend ähnliche Topologie. **B:** Lineare Auftragung der Sequenzen von *putP*-, *spaO*-, *sopB*-, *sopD*- und *sopE2*-Positionen, an denen Synonyme (S) und Nichtsynonyme (N) Nukleotidaustausche gefunden wurden; offene Dreiecke: konservierte Sequenzmotive in *sopB*; Skalierung: Codonpositionen sind angegeben. **C:** Abgeschätzte Rate synonymen Substitutionen pro synonymen Nukleotidstelle (d_N) und nichtsynonymen Substitutionen pro nichtsynonymen Stelle (d_S) für *sopB*, *sopD*, *sopE2*, für SPI1-Typ-III-Apparatgene (*spaO*, *spaP* und *invA*) und verschiedene Haushaltsgene (*putP*, *gnd*, *mdh*, *aceK*). **D:** Schematische Darstellung der Evolution der Wirtszellinvasion von *Salmonella* spp. (angepaßt an Ochman und Groisman, 1995). 1: letzter gemeinsamer Vorfahre von *Escherichia* spp. und *Salmonella* spp.; 2: letzter gemeinsamer Vorfahre von *S. bongori* und *S. enterica*.

4.3 Epidemiologie von *Salmonella* spp. und das Auftreten von *sopE*

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, daß es neben den hoch konservierten auch solche Effektorproteine gibt, die nur in wenigen *S. enterica*-Stämmen vorkommen. Diese akzessorischen Effektoren stellen wahrscheinlich Adaptationsfaktoren dar. Es wurde spekuliert, daß sich *Salmonella* spp. durch Erwerb (oder Verlust) eines dieser Proteine an neue Wirte bzw. Umweltbedingungen anpassen können oder daß auf diesem Wege neue Epidemiestämme entstehen können. Diese Hypothese sollte im Rahmen dieser Arbeit experimentell untersucht werden. In einem ersten Ansatz sollte hierzu untersucht werden, ob solche Stämme, die ein *sopE*-Gen tragen, möglicherweise besonders häufig mit Salmonellosepidemien assoziiert sind.

4.3.1 *SopE*-Koloniehybridisierungsanalyse von *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Enteritidis-Stämmen

Infektionen mit *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Enteritidis erfolgen fast ausschließlich durch Genuß kontaminierter Geflügelprodukte. Enteritidis verursacht heutzutage bis zu 55 % aller in Deutschland registrierten Salmonellosen. Patientenisolat verschieden häufig auftretender Enteritidis-Stämme wurden von Dr. W. Rabsch (RKI, Wernigerode) zur Verfügung gestellt. Es wurden Koloniehybridisierungen chromosomaler DNS dieser Stämme mit einer *sopE*-Gensonde (Tabelle 12) auf Nitrocellulosefilter durchgeführt. Wie in Tabelle 14 dargestellt, wurden mit sämtlichen untersuchten Enteritidis-Stämmen positive Hybridisierungssignale mit der *sopE*-spezifischen Sonde erhalten. 80 % der heutzutage in Deutschland isolierten Enteritidis-Stämme gehören dabei dem Epidemiestamm LT4/6 an (Tschäpe, 2000; Gericke *et al.*, 1999). Es läßt sich jedoch keine Aussage über den Beitrag des *sopE*-Gens zur epidemischen Potenz dieses Stammes machen, da die weniger häufig vorkommenden Stämme auch ein *sopE*-Gen tragen (Tabelle 14).

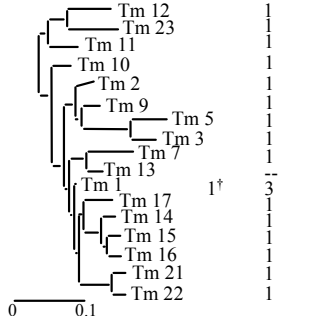
Tabelle 14: Koloniehybridisierung von *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Enteritidis-Stämmen mit einer *sopE*-spezifischen Sonde. Bei den LT4/6-Isolaten, die von einem Epidemiefall (1 oder 2) stammen, muß berücksichtigt werden, daß diese Stämme klonalen Ursprungs sind; die anderen LT4/6-Isolate stammen aus verschiedenen Ausbrüchen. Von den Enteritidis-Stämmen LT35/nc, LT2/10, LT8/7 und LT 1/1a stand jeweils ein Isolat zur Verfügung. *: Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin 31/98; Ausbruch in Heinsberg nach Speiseeisverzehr. Auf der rechten Seite ist exemplarisch ein Ausschnitt einer Koloniehybridisierungsanalyse gezeigt. +: Positivkontrolle (Typhimurium SL1344); -: Negativkontrolle (Typhimurium A36); 1 bis 6: *sopE*-positive Enteritidis LT4/6-Stämme.

Enteritidis	Anzahl der Isolate	<i>sopE</i> ⁺	<i>sopE</i> ⁻	Beispiel einer Hybridisierung
LT 4/6 Epidemie 1*	9	9	-	
LT 4/6 Epidemie 2	9	9	-	
LT 4/6	90	90	-	
LT 35/n.c.	1	1	-	
LT 2/10	1	1	-	
LT 8/7	1	1	-	
LT 1/1a	1	1	-	

4.3.2 Verteilung von *sopE* zwischen verschiedenen Typhimurium-Stämmen

S. enterica-Subspezies-I-Serovar Typhimurium verursacht zusammen mit Enteritidis die mit Abstand meisten Salmonellosen in Deutschland. Durch dieses Serovar ausgelöste Epidemien sind meistens mit kontaminierten Rindfleischprodukten assoziiert (Rabsch, 1997; Gericke *et al.*, 1999). Bei der Untersuchung der Verteilung von *sopE* unter verschiedenen Typhimurium-Stämmen wurden die Stämme der SARA-Referenzstammsammlung analysiert (Beltran *et al.*, 1991). DNS-Hybridisierungsexperimente, die von Silke Stender mit dieser Sammlung durchgeführt wurden, zeigten, daß die Mehrheit der Typhimurium-Stämme kein *sopE* enthält (Tabelle 15). Nur eine phylogenetische Gruppe, Tm1, beinhaltet neben drei *sopE*-negativen auch ein *sopE*-positives Isolat (SARA4) (Tabelle 15A).

Tabelle 15: DNS-Hybridisierungsanalyse von *S. enterica*-Serovar Typhimurium-Isolaten mit einer *sopE*-spezifischen Sonde. A: Isolate sind Teil der SARA-Sammlung und umfassen nur Typhimurium-Isolate; der phylogenetische Stammbaum wurde aus Beltran *et al.*, 1991, übernommen; †: SARA4 (DT20, *sopE*-positiv). **B:** Stämme sind klinische Isolate aus Deutschland, die im Robert Koch Institut in Wernigerode gesammelt und charakterisiert wurden. Die *sopE*-Gensonde ist in Tabelle 12 beschrieben.

A		B			
<i>sopE</i> ⁺ <i>sopE</i> ⁻		<i>sopE</i> ⁺ <i>sopE</i> ⁻		<i>sopE</i> ⁺ <i>sopE</i> ⁻	
	1	DT1	2	DT46a	1
	1	DT2	2	DT49	10
	1	DT8	1	DT68 [†]	2 3
	1	DT9	9	DT70	1
	1	DT10	1	DT85	1
	1	DT12	3	DT92	3
	1	DT14	1	DT96	4
	1	DT15a	1	DT99	2
	1	DT17	4	DT104	7
	1	DT22	1	DT107	2
	1	DT30	1	DT120	6
	1	DT40	1	DT125	1
	1			DT126	2
	1			DT164	1
	1			DT170	7
	1			DT175 [§]	6 2
	1			DT177	2
	1			DT186	9
	1			DT193	6
	1			DT204 [†]	21
	1			DT204c	4
	1			DT208	2
	1			RDNC	1
	1			U302	2

Mit Hilfe eines Koloniehybridisierungsversuchs wurde auch die Verteilung des *sopE*-Gens in einer repräsentativen Sammlung von Typhimurium-Isolaten aus Deutschland durchgeführt. Diese Sammlung wurde von Dr. W. Rabsch (RKI, Wernigerode) zusammengestellt und gibt einen Überblick über Typhimurium-Stämme, die in der Zeit zwischen 1960 und 1989 in der damaligen DDR und ab 1990 in ganz Deutschland isoliert worden sind. Die Stämme wurden auf Nitrozellulosefiltern angezüchtet, auf den Filtern lysiert, und die freie DNS wurde durch UV-Bestrahlung auf der Membran immobilisiert. Anschließend wurden die Membranen mit einer *sopE*-Gensonde hybridisiert. Die Mehrheit der Isolate ist *sopE*-negativ (Tabelle 15B). Bei den Typhimurium-Stämmen DT68 und DT175 wurden sowohl *sopE*-negative als auch *sopE*-positive Isolate identifiziert. Infektionen mit dem Stamm DT175 traten in den letzten dreißig Jahren vermehrt auf. DT68 Typhimurium-Stämme hingegen konnten erst kürzlich in Deutschland häufiger isoliert werden (Dr. W. Rabsch, persönliche Mitteilung). Sämtliche analysierten Isolate der Stämme DT49, DT204 und DT204c (jeweils 10, 21 und 4 Stämme) tragen das *sopE*-Gen. Diese drei Stämme gehören eigentlich zu einem einzigen Epidemiestamm, der Ende der 60er Jahre zunächst als DT49 identifiziert wurde und im Laufe der 70er Jahre einen hohen Prozentsatz (in einigen Jahren mehr als 50 %) der in Deutschland gemeldeten Salmonellosen verursacht hat (Kühn *et al.*, 1982; Threlfall *et al.*, 1978a, Threlfall *et al.*, 1978b; Wray *et al.*, 1998). Später nahm dieser Stamm Antibiotikaresistenz-vermittelnde Plasmide auf und wurde dann als DT204 bzw. DT204c bezeichnet. Diese Stämme lassen vermuten, daß die Anwesenheit von *sopE* möglicherweise zur „epidemiologischen Virulenz“ der Stämme DT49, DT204 und DT204c beigetragen hat. Allerdings ist *sopE* natürlich nicht der einzige Faktor, der einen epidemisch erfolgreichen Typhimurium-Stamm von einem weniger erfolgreichen unterscheidet. So trägt z.B. der heutzutage in Deutschland häufig isolierte Typhimurium-Stamm DT104 (1997: 20 Fälle pro 100.000 Einwohner; 12,5 % bezogen auf alle gemeldeten Salmonellosen; Gericke *et al.*, 1999) kein *sopE*-Gen. Der epidemiologische Erfolg dieses Stammes ist also von *sopE* unabhängig und wird der erhöhten (chromosomal kodierten) Multiantibiotikaresistenz zugeschrieben, die sich infolge des Einsatzes von Antibiotika als nutritiver Futtermittelzusatz bei Nutztieren (Rindern und Schweine) entwickelt haben könnte (Gericke *et al.*, 1999).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß epidemiologisch erfolgreiche *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare, wie Enteritidis LT4/6 und die Typhimurium DT49-, DT204- und DT204c-Stämme *sopE*-positiv sind. Es gibt jedoch auch epidemiologisch dominante Stämme, wie beispielsweise DT104, die *sopE*-negativ sind. Dies läßt vermuten, daß verschiedene Faktoren den epidemiologischen Erfolg von *Salmonella* spp. begründen können. SopE ist möglicherweise einer dieser Faktoren.

4.4 SopE ist in Typhimurium im Genom eines Prophagen der P2-Familie kodiert

4.4.1 Isolierung von SopE-kodierenden Bakteriophagen aus Typhimurium-Stämmen

Die variable Verteilung von *sopE* innerhalb des Serovars Typhimurium und die Tatsache, daß *sopE* in Typhimurium SL1344 von phagenähnlichen Sequenzen flankiert ist (Hardt *et al.*, 1998a), weisen darauf hin, daß *sopE* mittels eines Bakteriophagen horizontal transferiert wird. Um aktive *sopE*-kodierende Phagen zu identifizieren, wurden Flüssigkulturen folgender 12 *sopE*-positiver Typhimurium Isolate mit 2 µg/ml Mitomycin C behandelt (Kapitel 3.3.3): SL1344 (RDNC), 3351/78 (DT204), 1153/72 (DT204), 646/96 (DT204c), 660/96 (DT204c), 1/82 (DT175), 198/82 (DT175), 11635/98 (DT68), 1061/97 (DT49), 838/88 (DT49), 409/88 (DT49) und SARA4 (DT20). Die Überstände der Mitomycin C-behandelten Kulturen wurden auf einem Rasen des *sopE*-negativen Typhimurium-Stammes A36 ausplattiert. 11 Überstände produzierten Plaques unterschiedlicher Morphologie bzw. Größe auf dem Bakterienrasen (Abbildung 14). Die Bakteriophagen-DNS aus den Plaques wurde auf Nitrozellulose transferiert und die DNS in einer Southernhybridisierung mit einer *sopE*-Gensonde analysiert. Plaques der Lysate aus 3351/78 (DT204), 1/82 (DT175), 11635/98 (DT68), 838/88 (DT49) und 409/88 (DT49) hybridisierten mit der *sopE*-spezifischen Sonde (Abbildung 14).

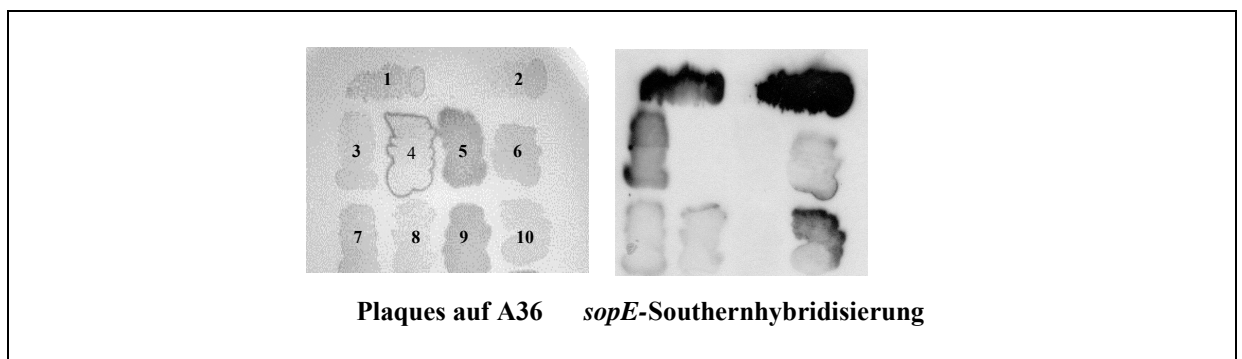


Abbildung 14: Mitomycin C-Induktion von *sopE*-tragenden Bakteriophagen. Links: Lysate induzierter Typhimurium-Stämme wurden auf einem *sopE*-negativen Bakterienrasen (Typhimurium A36) ausgestrichen. Die Plaquebildung wurde nach ca. 7 h Bebrütung bei 37°C beurteilt: 1: 3351/78 (DT204); 2: M25#1 (ein 3351/78-Derivat, siehe Kapitel 4.8); 3: M25#2 (ein 3351/78-Derivat, siehe Kapitel 4.8), 4: SARA4 (DT20); 5: 1061/97 (DT49); 6: 409/88 (DT49); 7: 838/88 (DT49); 8: 11635/98 (DT68); 9: 198/82 (DT175); 10: 1/82 (DT175). Rechts: Bakteriophagen-DNS wurde auf Nitrozellulose transferiert und in einer Southernanalyse mit einer *sopE*-spezifischen Sonde hybridisiert. Positive Hybridisierungssignale wurden mit 1, 2, 3, 6, 7, 8, und 10 (3351/78 (DT204), M25#1, M25#2, 409/88 (DT49), 838/88 (DT49), 11635/98 (DT68) und 1/82 (DT175)) erhalten.

Im Vergleich zum Phagen P22HT_{int} (Schmieger, 1972) war die Anzahl und Größe der *sopE*-positiven Plaques sehr gering (Daten nicht gezeigt). Die Bestimmung der Wurfgröße, die am Robert Koch Institut in Wernigerode durchgeführt wurde, zeigte zudem, daß nur 8 ± 2 pfu (*plaque forming units* = Plaque bildende Einheiten) pro infizierter Zelle gebildet werden. Die-

ses schwache lytische Wachstum kann erklären, warum ähnliche *sopE*-positive Bakteriophagen nicht mit den übrigen Lysaten (SL1344(RDNC); 1153/72 (DT204); 646/96 (DT204c); 660/96 (DT204c); 1/82 (DT175); 198/82 (DT175); 1061/97 (DT49) und SARA4 (DT20) gefunden werden konnten. Es wäre vorstellbar, daß stärker replizierende Bakteriophagen die *sopE*-positiven Phagen in einem Gemisch „überwachsen“ haben.

Die *sopE*-positiven Phagenpartikel aus 3351/78 (DT204) wurden für die weitere Charakterisierung des *sopE*-positiven Bakteriophagen ausgewählt. Die Phagenpartikel wurden eluiert und durch zwei weitere Vereinzelungsschritte auf Typhimurium A36 aufgereinigt.

4.4.2 Charakterisierung des *sopE*-tragenden Bakteriophagen

SopE kann theoretisch über Konjugation kontaminierender Bakterien oder über die Aufnahme von nackter DNS (oder RNS) aus dem Überstand der Mitomycin C-behandelten Typhimurium-Stämme auf A36 übertragen werden. Um sicherzustellen, daß die beobachteten *sopE*-positiven Plaques wirklich auf die Anwesenheit eines *sopE*-tragenden Bakteriophagen zurückzuführen sind, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt:

Kulturüberstand des Mitomycin C-behandelten Typhimurium-Stamms 3351/78 (*sopE*-positiv; DT204) wurde in der Anwesenheit von RNaseA (250 µg/ml) oder DNaseI (250 µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes bzw. eine 1:10 oder 1:100 Verdünnung auf einen Typhimurium A36-Bakterienrasen aufgetragen. Die Beurteilung der Plaquebildung erfolgte nach 7 h Bebrütung bei 37°C und ergab, daß weder RNaseA noch DNaseI den Titer, im Vergleich zum unbehandelten Lysat, verändert hatten. Eine Vorinkubation über 30 min bei 70°C verhinderte jedoch die Ausbildung von Plaques durch das Typhimurium 3351/78-Lysat. Dagegen zeigte eine Vorinkubation bei 0°C oder die Zugabe von Chloroform zu den Phagenlysaten keinen Einfluß auf die Plaquestärke bzw. den Bakteriophagentiter (Abbildung 15; Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse bestätigen, daß *sopE* Bestandteil eines Bakteriophagen sein muß. Der Bakteriophage wurde weiterhin als SopEΦ bezeichnet.

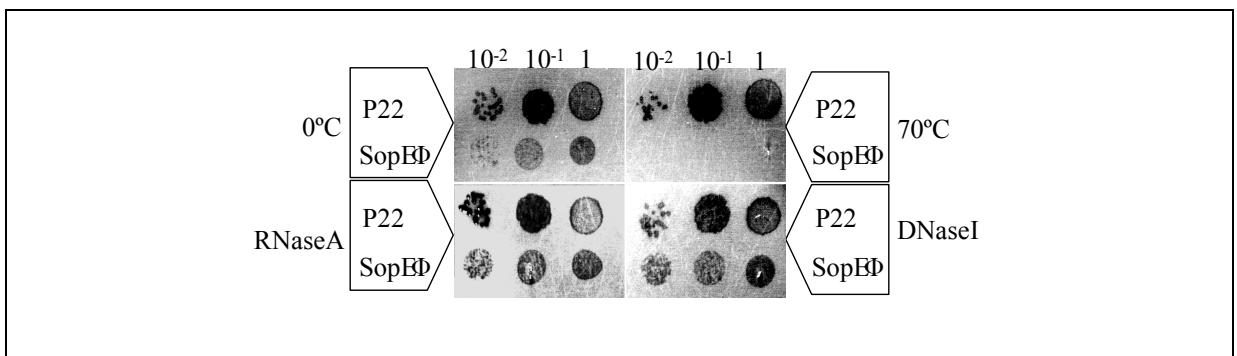


Abbildung 15: Hitze- und DNase-/RNase-Resistenz von SopEΦ. Kulturüberstand von Mitomycin C-behandeltem Typhimurium 3351/78 (SopEΦ) zeigt auf Typhimurium A36 nach Hitzebehandlung keine Plaquebildung; RNaseA oder DNaseI haben dagegen keinen Einfluß auf den Titer. Zum Vergleich wurde P22-HTint-Kontrolllysat (P22) aufgetragen.

4.4.3 Elektronenmikroskopische Analyse der SopE Φ -Morphologie

Die meisten Bakteriophagen in Typhimurium gehören zur Familie der P22 Phagen (Schicklmaier und Schmieger, 1995). 5 kb *sopE*-flankierender DNS in Typhimurium SL1344 zeigten jedoch bei vorhergehenden Untersuchungen Sequenzähnlichkeiten zu Schwanz- und Schwanzfasergenen P2-ähnlicher Bakteriophagen (Hardt *et al.*, 1998a). Da Phagen Genome modular aufgebaut sind und oft Hybride zwischen nichtverwandten Phagen beobachtet wurden (Botstein, 1980; Brüssow und Desiere, 1980; Schmieger, 1999; Schicklmaier *et al.*, 1999; Hendrix *et al.*, 2000), mußten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, um SopE Φ einer Bakteriophagenfamilie eindeutig zuordnen zu können. Zur genauen Klärung der Morphologie von SopE Φ , wurde eine elektronenmikroskopische Analyse im Labor von Dr. M. Rohde (GBF, Braunschweig) durchgeführt.

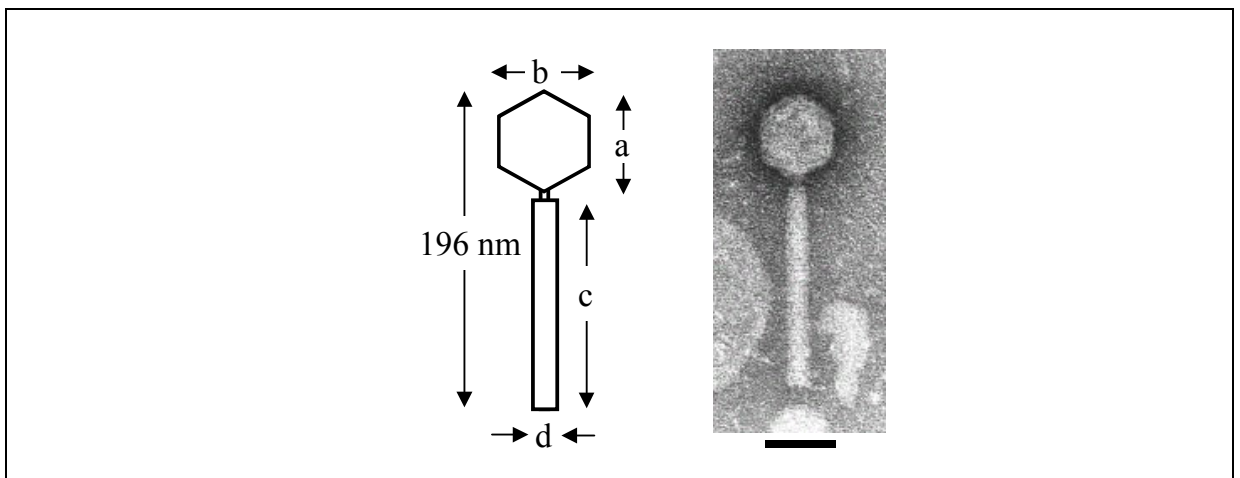


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Analyse der SopE Φ -Morphologie. Aufgereinigte Phagenlysate wurden auf dünne Karbonfilter aufgetragen, mit einer 4 % Uranylacetat-Lösung (pH 4,5) gefärbt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM910; Firma Zeiss) untersucht. Skizziert sind die Durchschnittswerte von mindestens 20 vermessenen Bakteriophagen: a: Kopflänge = 58 ± 2 nm; b: Kopfbreite = 54 ± 2 nm; c: Schwanzlänge = 133 ± 5 nm; d: Schwanzbreite = 19 ± 1 nm; Balken: 50 nm.

Die Morphologie von SopE Φ unterscheidet sich deutlich von der P22-ähnlicher Phagen. Die SopE Φ -Partikel besitzen ikosaedrische Köpfe mit einem Durchmesser von 58 ± 2 nm und gerade Schwänze mit einer Länge von 133 ± 5 nm (Abbildung 16). Dies sind ähnliche Abmessungen wie die des Bakteriophagen P2 (Kopfweite 60 nm, Schwanzlänge 135 nm, Schwanzweite 18 nm; Bertani und Six, 1988). Die reifen Partikel von P22 haben dagegen einen ikosaedrischen Kopf von 60 nm Durchmesser und eine kurze Basisplatte (20 nm breit), die einen dünnen, 20 nm langen Fortsatz trägt (Anderson, 1960; Susskind und Botstein, 1978). Die untersuchten Phagenlysate von SopE Φ beinhalten außerdem eine große Anzahl von Bakteriophagendebris. Dieses Phänomen wird oft bei P2-Phagenlysaten beobachtet. Es gibt Verwandte des Phagen ES18, die eine ähnliche Morphologie zu P2-Phagen aufweisen. Diese Phagenart wird gelegentlich aus *Salmonella* spp. isoliert (Kuo und Stocker, 1970). Durch weitere Experimente konnte jedoch ausgeschlossen werden, daß es sich bei SopE Φ um einen Bakteriophagen dieser Verwandtschaftsgruppe handelt.

4.4.4 Untersuchungen zum bakteriellen Rezeptor von SopEΦ

Die Adsorption von Bakteriophagen an die Zelloberfläche der Bakterien erfolgt durch eine Wechselwirkung der Phagenschwanzspitze mit einer Komponente der äußeren bakteriellen Zellmembran. Im Fall des Bakteriophagen λ sind das Protein GpJ an der Phagenschwanzspitze und der bakterielle Oberflächenrezeptor MalB (früher LamB, ein Maltoserezeptor) an dieser Wechselwirkung beteiligt (Randall-Hazelbauer und Schwartz, 1973; Schwartz, 1975). P2 und P22 nutzen das Lipopolysaccharid (LPS; Lindberg, 1973, Klaus *et al.*, 1992) und ES18 die Eisentransportproteine FhuA und SidK als Rezeptor (Luckey und Neilands, 1976; Heller, 1992). FhuA kann jedoch nur als Phagenrezeptor fungieren, wenn gleichzeitig TonB als allosterisches Regulatorprotein vorliegt, welches im Energie-aktivierten Zustand die Konformation des äußeren Membranrezeptors FhuA steuert (Braun, 1995).

Um ausschließen zu können, daß es sich bei SopEΦ um einen ES18-ähnlichen Bakteriophagen handelt, wurde die Rezeptorspezifität von SopEΦ analysiert. Hierzu wurde die Fähigkeit zu lytischem Wachstum von SopEΦ auf bestimmten Typhimurium-Mutanten analysiert. SopEΦ-Lysat wurde auf die in Tabelle 16 aufgezählten Mutanten aufgetragen. Nach 7 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Plaquebildung überprüft (Tabelle 16). Die Typhimurium A36-Mutanten WR1173 und WR1174, die jeweils eine Mutation im Eisenrezeptor FhuA bzw. in TonB besitzen, konnten durch SopEΦ lytisch infiziert werden. Diese Membranproteine werden also von SopEΦ nicht zur Adsorption benötigt. Typhimurium LB5010 ist ein „Rauhstamm“, d.h. er besitzt kein vollständiges LPS. SopEΦ bildete auf diesem Stamm keine lytischen Plaques. Deshalb ist zu vermuten, daß SopEΦ LPS für die Adsorption bzw. Infektion benötigt. Diese Eigenschaft und auch die morphologischen Untersuchungen deuten darauf hin, daß es sich bei SopEΦ um einen Bakteriophagen der P2-Familie handelt.

Tabelle 16: Analyse des lytischen Wachstums von SopEΦ auf verschiedenen Typhimurium-Mutanten.

Empfängerstamm	Genotyp	Plaquebildung durch SopEΦ
WR1173	<i>fhuA</i>	+
WR1174	<i>tonB</i>	+
LB5010	<i>galE</i>	-

4.4.5 Vollständige Restriktionskartierung von SopEΦ

Die Ähnlichkeit von SopEΦ zu Phagen der P2-Familie ist durch Restriktionskartierung und Southernhybridisierungsanalysen bestätigt worden. Chromosomale DNS des SopEΦ-lysogenen Typhimurium-Stammes 3351/78 (DT204) wurde mit *EcoRV* und/oder *HindIII* geschnitten und mit den DNS-Sonden V und VI aus Typhimurium SL1344 hybridisiert (Abbildung 17).

Parallel dazu wurde eine 2,7 kb große *sopE*-Region aus Typhi X3744, die auch die Bereiche der Hybridisierungs sonden V und VI enthält, kloniert und sequenziert. Dazu wurde der Suizidvektor pM2, der die Nukleotide 165-615 des offenen Leserahmens von *sopE* aus Typhimurium SL1344 trägt, in das *sopE*-Gen von Typhi X3744 integriert. Der integrierte Vektor und angrenzende chromosomale Sequenzen aus Typhi wurden durch Restriktionsendonukleasespaltung mit *Acc65I* (pM11) und *SmaI* (pM6) und anschließende Religation und Elektroporation in *E. coli* CC118λpir zurückgewonnen. Ein 4938 bp langes Fragment, das auch *sopE* beinhaltet, konnte auf diese Weise isoliert und sequenziert werden (Genbank AF153829; Abbildung 17). Diese Region beinhaltet *sopE*, *orfR*, *orfJ*, *orfH* und Teile von *orf45* und ist auf Nukleotidebene mehr als 98% identisch zur *sopE*-Region aus

Typhimurium SL1344 (Hardt et al., 1998a; Abbildung 17). Außer einer N238Y-Substitution in Typhi X3744 war die abgeleitete Aminosäuresequenz von SopE identisch.

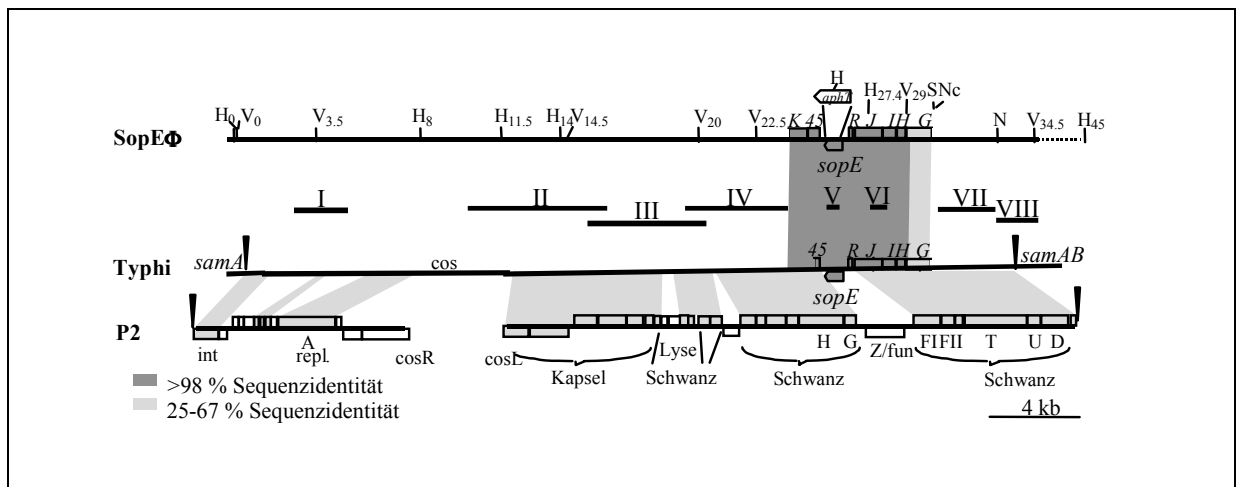


Abbildung 17: Restriktionskarte von SopEΦ. Dargestellt sind die Ähnlichkeiten zwischen den bekannten Nukleotidsequenzen von SopEΦ in *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium-Stamm 3351/78, dem Serovar Typhi-Stamm CT18 und dem P2-Phagengenom. SopEΦ: Restriktionskartierung des Bakteriophagen aus 3351/78; Region mit Kästchen: bekannte DNS-Sequenz (SopEΦ: AF043239; Typhi: AF153829); *aphT*: *aphT*-Kassette, die in SopEΦ inseriert wurde (siehe Kapitel 4.5.1). Die Restriktionskarte des SopEΦ-Prophagen beinhaltet alle *Hind*III (H) und *Eco*RV (V) Erkennungsstellen. Nur relevante *Sac*II (S), *Nco*I (Nc) und *Nde*I (N)-Schnittstellen sind eingezeichnet. Tiefgestellte Zahlen zeigen die relativen Nukleotidpositionen (in kb) an. Typhi: Region mit Kästchen: eigene Sequenzierungsdaten aus Typhi X3744 (AF153829); restliche Sequenzen stammen vom Typhi CT18 Genomsequenzierungsprojekt am Sangerzentrum. P2: P2-Phagengenom; Genbank AF063097, geschlossene Dreiecke: Integrationsstellen; schraffierte Regionen: weiß (keine Ähnlichkeiten); hellgrau (25-67 % Identität); dunkelgrau (>98 % Identität); Balken I-VIII: verwendete Sonden für die Southernhybridisierung (Tabelle 11; Tabelle 12).

Die aus der Sequenzierung der Typhi X3744 *sopE*-Region gewonnene Information wurde für eine Suche nach homologen Sequenzen in Typhi CT18 (sequenziert durch die „Pathogen Sequencing Unit“ am Sanger Center; http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi) genutzt. Dadurch konnte ein größerer Sequenzbereich in Typhi CT18 gefunden werden (Abbildung 17). Die Analyse des homologen DNS-Bereiches in Typhi CT18 zeigte, daß sich die Ähnlichkeit der Typhi-*sopE*-Region zu P2-ähnlichen Bakteriophagen über eine Länge von 33 kb erstreckt (Abbildung 17). Mit Hilfe dieser zusätzlichen Sequenzinformation konnten PCR-Oligonukleotide zur Herstellung der Sonden I, II, III und IV (Abbildung 17; Tabelle 11) für die weitere Restriktionskartierung des SopEΦ-Prophagen in Typhimurium 3351/78 hergestellt werden. Dabei diente chromosomale DNS von Typhi X3744 als Matrize. Alle vier Sonden hybridisierten mit *Hind*III- oder *Eco*RV-Fragmenten des lysogenen SopEΦ in Typhimurium 3351/78 (Abbildung 17; Tabelle 17). Diese Signale konnten nicht detektiert werden, wenn zur Kontrolle chromosomale DNS des *sopE*-negativen Stammes A36 verwendet wurde. Zur weiteren Kartierung der rechten Seite von SopEΦ wurden die Sonden VII und VIII verwendet (Abbildung 17). Laut Kartierung beträgt die Länge des Prophagen ungefähr 32 kb. Dies entspricht der typischen Genomgröße von Phagen der P2-Familie (Nakayama et al., 1999).

Die P2-ähnlichen Sequenzen in Typhi CT18 und SopEΦ (von Typhimurium 3351/78) sind jedoch nicht identisch. So beträgt beispielsweise die Nukleotidübereinstimmung von *orfG* zwischen Serovar Typhi und SopEΦ nur 25 % und Sonde IV hybridisierte nicht mit dem überlappenden *Eco*RV_{22.5-29} Fragment des SopEΦ-Prophagen (Abbildung 17, Tabelle 17).

Dies zeigt, daß sich die 5'-Region beider *orfK* Gene unterscheidet. Außerdem hybridisierte Sonde I nur mit dem 3,5 kb langen *EcoRV*-Fragment, aber nicht mit dem benachbarten überlappenden 11 kb-Fragment (V_{3,5-14,5}; Abbildung 17 und Tabelle 17). Dieser Bereich unterscheidet sich also ebenfalls zwischen *SopE*Φ in Typhimurium und dem *sopE*-tragenden, P2-ähnlichen Bakteriophagen in Typhi CT18.

Tabelle 17: Southernhybridisierungsanalyse des *SopE*Φ-Prophagen in Typhimurium 3351/78. In dieser Tabelle sind nur die Fragmente aufgelistet, die durch die jeweiligen Southernsonden detektiert werden konnten.

*: Sonden stammen von Typhi oder Typhimurium (Tabelle 11; Tabelle 12); §: Siehe Restriktionskarte (Abbildung 17); ¶: Keine Signale wurden mit A36 (DT36; *sopE*-negativ) detektiert; †: Sonde I hybridisierte nicht mit dem Fragment V_{3,5/14,5}; ‡: Sonde IV hybridisierte nicht mit Fragment V_{22,5/29}; ||: Detektiert auch ein 2,7 kb *EcoRV*-Fragment und ein > 20 kb *HindIII*-Fragment von A36 (DT36; *sopE*-negativ). V: *EcoRV*-Fragmente; H: *HindIII*-Fragmente chromosomaler DNS von Typhimurium 3351/78.

Sonde (Herkunft/Temp.)*	detektierte Fragmente (kb)§	
I [¶] (Typhi / 55°C) †	V _{0/3,5}	H _{0/8}
II [¶] (Typhi / 55°C)	V _{3,5/14,5} V _{14,5/20}	H _{8/11,5} H _{11,5/14} H _{14/27,4}
III [¶] (Typhi / 55°C)	V _{14,5/20} V _{20/22,5}	H _{14/27,4}
IV [¶] (Typhi / 55°C) ‡	V _{20/22,5}	H _{14/27,4}
V [¶] (Typhim. / 64°C)	V _{22,5/29}	H _{14/27,4}
VI [¶] (Typhim. / 64°C)	V _{22,5/29}	H _{27,4/45}
VII [¶] (Typhim. / 64°C)	V _{29/34,5}	H _{27,4/45}
VIII (Typhim. / 64°C)	V _{29/34,5}	H _{27,4/45}

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß *SopE*Φ aufgrund seiner Morphologie, seiner möglichen Präferenz für LPS als Rezeptor und aufgrund der DNS-Hybridisierungsanalysen als neues Mitglied der P2-Bakteriophagenfamilie anzusehen ist. Typhi CT18 trägt einen ähnlichen, jedoch nicht identischen Prophagen bei Zentisom 93 des Genoms.

4.5 Horizontaler Transfer von *sopE* durch lysogene Konversion mit *SopE*Φ

Untersuchungen aus Kapitel 4.1.4. konnten zeigen, daß *sopE* auf der Ebene der Subspezies und Serovare variabel verteilt ist. Im folgenden sollte experimentell untersucht werden, inwieweit *SopE*Φ in der Lage ist, *sopE* durch lysogene Konversion in neue *Salmonella* spp. horizontal zu transferieren.

4.5.1 Konstruktion des rekombinanten Phagen *SopE*Φ^{*sopE::aphT*}

Um die lysogene Konversion als einen möglichen Mechanismus des horizontalen Transfers von *sopE* zu untersuchen, wurde ein Derivat des *SopE*Φ-Prophagen im Chromosom des *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium-Stammes 3351/78 (DT204) konstruiert. Über allelen Austausch wurde zunächst eine Kanamycinresistenz-vermittelnde Genkassette in das *sopE*-Gen inseriert. Dazu wurde das *aphT*-tragende Suizidplasmid pSB1134 (Tabelle 4) über homologe Rekombination in den *sopE*-Locus von 3351/78 integriert. Anschließend wurden durch Selektion auf saccharosehaltigem LB-Agar solche Klone selektioniert, in denen es zu

einem spontanen zweiten Rekombinationsereignis gekommen war und die *sacAB*-Gene und somit auch das Vektorrückgrat verloren gegangen waren. Der rekombinante Bakterienstamm wurde als M106 bezeichnet (Abbildung 17, Tabelle 3). Der rekombinante Prophage (SopE $\Phi^{sopE::aphT}$) aus M106 wurde mittels Mitomycin C-Behandlung induziert, aufgereinigt, und es wurde ein Lysat mit einem Titer von 10^7 pfu/ml hergestellt (Kapitel 3.3.3). Mit diesem Lysat wurden die weiteren Versuche zum horizontalen Transfer durch lysogene Konversion durchgeführt.

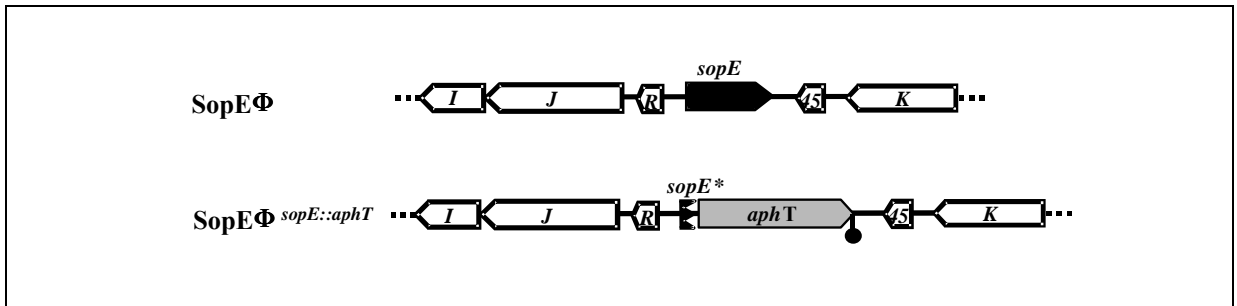


Abbildung 18: Genkarte von SopE Φ und von SopE $\Phi^{sopE::aphT}$. Der rekombinante Prophage wurde aus Typhimurium M25 induziert und für lysogene Konversionsexperimente eingesetzt.

Zunächst mußte verifiziert werden, daß die genetische Manipulation die Eigenschaften von SopE Φ nicht verändert hatten. Plaquebildung wurde auf denselben Typhimurium-Stämmen beobachtet wie mit SopE Φ . Die *sopE*-negativen Stämme A36 (DT36), 2138/96 (DT120), 3805/96 (DT186) und 1509/96 (DT193) waren sensitiv während die *sopE*-positiven Stämme 3351/78 (DT204), 839/88 (DT49), 11635/98 (DT68) und 1/82 (DT175) resistent waren. Elektronenmikroskopische Analysen belegten, daß auch die Phagenmorphologie bei SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ nicht verändert war (Daten nicht gezeigt). Diese Daten deuten darauf hin, daß die Insertion der *aphT*-Genkassette in das *sopE*-Gen die Eigenschaften von SopE Φ nicht verändert hat.

4.5.2 Lysogene Konversion von *sopE*-negativen Typhimurium-Stämmen

Durch die folgenden Versuche sollte experimentell belegt werden, daß SopE Φ in der Lage ist, *sopE* bzw. die *aphT*-Genkassette durch lysogene Konversion in neue *Salmonella* spp. horizontal zu transferieren.

Typhimurium A36 (DT36) wurde mit SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ infiziert und Lysogene wurden auf kanamycinhaltigem LB-Agar selektioniert (Kapitel 3.3.4). Lysogene traten mit einer Frequenz von 10^{-4} (1 Lysogen pro 10.000 pfu) auf. Southernhybridisierungsexperimente an einem Lysogen (M4) mit den Sonden I und IV (Tabelle 11, Abbildung 17) zeigten, daß SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ tatsächlich in das Chromosom integriert war (Abbildung 19A und B). Bei dem Lysogen sind mit den Sonden ein Restriktionsfragment derselben Länge wie beim „natürlichen“ Lysogen (M106) detektierbar. Der Größenunterschied zwischen der *Hind*III-gespaltenen chromosomalen DNS von Stamm M106 und 3351/78 ist durch die Anwesenheit der *aphT*-Kassette in M106 erklärbar.

Zur Analyse der chromosomalen Integrationsstelle von SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ in M4 und M106 wurde chromosomale DNS der beiden Stämme mit *Xba*I gespalten. Die chromosomalen Fragmente wurden durch Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt und durch Southernhybridisierung mit Sonde VI (Abbildung 17, Tabelle 12) analysiert. SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ liegt in M4 und M106, wie auch im natürlichen SopE Φ -Lysogen 3351/78 (DT204) in einem 60 kb großen, chromosomalen Fragment (Abbildung 19C). Zusätzlich hybridisiert bei dem in dieser Arbeit hergestellten Lysogen M4 eine weitere 35 kb große Bande mit Sonde VI. Hierbei könnte es sich um

die zirkuläre, replikative Form von $\text{SopE}\Phi^{\text{sopE}::\text{aphT}}$ handeln. Genauso könnte sie aber auch auf reife Phagenpartikel zurückzuführen sein, die in der Bakterienkultur vorhanden waren.

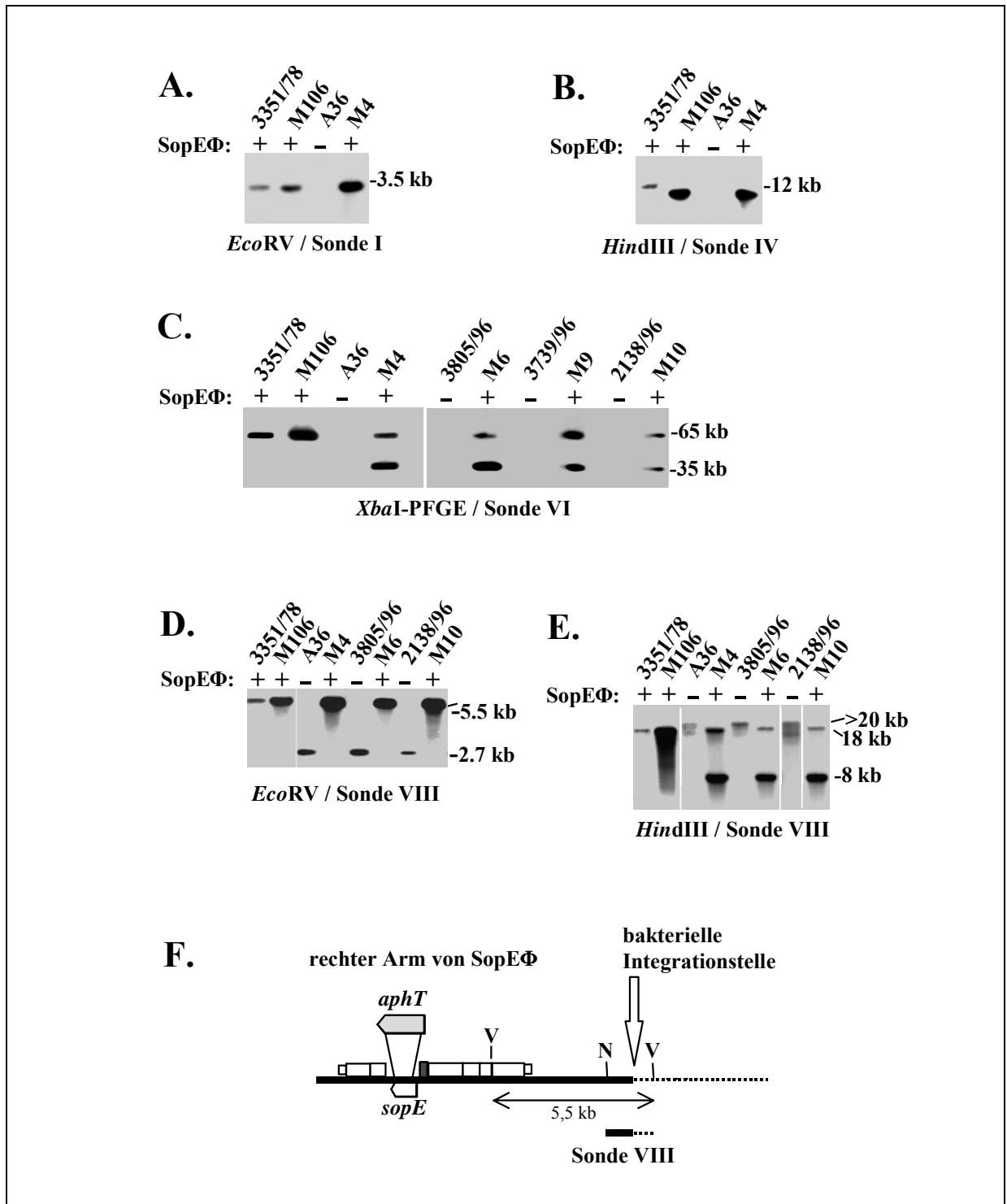


Abbildung 19: Southernhybridisierungsanalyse von $\text{SopE}\Phi^{\text{sopE}::\text{aphT}}$ -Lysogenen. $\text{SopE}\Phi^{\text{sopE}::\text{aphT}}$ integriert in eine bevorzugte chromosomale Region. Außerdem ist bei den hergestellten Lysogenen eine weitere (freie/replikative) Form des Bakteriophagen zu detektieren. A.: Southernhybridisierung *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNS der angegebenen Stämme mit Sonde I (Abbildung 17). B.: Southernhybridisierung *HindIII*-gespaltener chromosomaler DNS mit Sonde IV (Abbildung 17). C.: *XbaI*-Restriktionsspaltung, PFGE-Analyse und Southernhybridisierung mit Sonde VI (Abbildung 17). D.+E.: *EcoRV*- (D) oder *HindIII*- (E) gespaltene chromosomale DNS der angegebenen Stämme wurden mit Sonde VIII (Abbildung 17) in einer Southernhybridisierung analysiert. F.: Rechter Arm von $\text{SopE}\Phi$; dargestellt ist das 5,5, kb chromosomale Fragment, das an das Sonde VIII hybridisiert. Durchgezogene Linie : rechter Arm von $\text{SopE}\Phi$; gepunktete Linie: bakterielle chromosomale Sequenzen; V: *EcoRV*, N: *NdeI*.

Southernhybridisierungsanalysen mit weiteren Sonden bestätigten, daß SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ im Chromosom von M4 integriert ist. Die chromosomalen *EcoRV*- (2,7 kb) und *HindIII*-Fragmente (>20 kb) des Empfängerstammes A36 (DT36), an die Sonde VIII vor der Lysogenisierung noch band, fehlten in der chromosomalen DNS des Lysogens M4 (Abbildung 19D und E). Statt dessen hybridisierte die Sonde beim Lysogen M4 mit einem Fragment, das auch bei den „natürlichen“ Lysogenen 3351/78 (SopE Φ) und M106 (SopE $\Phi^{sopE::aphT}$) zu detektieren ist (Abbildung 19D und E: 5,5 kb *EcoRV* und 18 kb *HindIII*) und der rechten Integrationsstelle des Prophagen entspricht. Auch in dieser Analyse wurde bei M4 eine zweite Bande detektiert, die wahrscheinlich auf eine extrachromosomale Form von SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ zurückzuführen ist (Abbildung 19E: 8 kb *HindIII*-Fragment und D: Die zweite *EcoRV*-Bande hat eine fast identische Größe wie die zuerst beschriebene 5,5 kb-Bande und konnte daher im gezeigten Experiment nicht aufgelöst werden). Ein zusätzlicher Hinweis auf freie Phagenpartikel im lysogenisierten *Salmonella*-Stamm M4 ist ein SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ -Phagentiter von bis zu 10^4 pfu/ml in den Überständen eines M4-Kulturüberstandes, selbst ohne vorherige Induktion mit Mitomycin C.

Weitere Versuche zeigten, daß auch mit den Typhimurium-Stämmen 2138/96 (DT120), 3805/96 (DT186) und 1509/96 (DT193) SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ -Lysogene erhalten werden konnten. Bei der Southernhybridisierungsanalyse waren auch in diesen Lysogenen zusätzliche Banden festzustellen, die auf die freie, replikative Form des Bakteriophagen zurückzuführen sein könnten (Abbildung 19C, D, E). Diese Lysogenisierungsexperimente zeigten, daß SopE Φ eine bevorzugte Integrationsstelle besitzt und fähig ist, Gene, wie *sopE* bzw. *aphT*, durch lysogene Konversion in verschiedene Typhimurium-Stämme horizontal zu übertragen.

4.5.3 Verteilung von SopE Φ in Wildtyp-Typhimurium-Isolaten

Es war gezeigt worden, daß das variabel vorkommende Effektorprotein SopE in Isolaten der Typhimurium-Stämme DT49, DT68; DT175, DT204, DT204c und in einem Stamm der SARA-Referenzstammsammlung (SARA4) vorhanden ist. Es stellte sich nun die Frage, ob natürliche *sopE*-positive Typhimurium-Stämme SopE Φ -Lysogene sind.

Um dies zu überprüfen, wurden die *sopE*-Loci von ausgewählten Typhimurium-Isolaten in einem Southernhybridisierungsexperiment miteinander verglichen. Die chromosomale DNS dieser Stämme wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *HindIII* gespalten, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit den Sonden II, V und VII in einer Southernhybridisierung analysiert (Abbildung 20A). Diese Sonden sind komplementär zu Bereichen von SopE Φ stromauf- und stromabwärts von *sopE* (Abbildung 17). In allen untersuchten Isolaten besaßen die detektierten DNS-Fragmente die gleiche Länge (Abbildung 20A; Daten für Sonde II und VII nicht gezeigt). Durch Pulsfeldgelelektrophorese und anschließender Southernhybridisierung mit Sonde VI (Abbildung 17) konnte ferner gezeigt werden, daß SopE Φ in sämtlichen analysierten Typhimurium-Isolaten auf *XbaI*-Fragmenten identischer Größe lokalisiert ist. Diese Daten belegen, daß der *sopE*-Locus in allen untersuchten Typhimurium-Stämmen gleich organisiert ist und daß SopE Φ offensichtlich eine bevorzugte Integrationsstelle besitzt (Abbildung 20B).

Um zu zeigen, daß SopE in allen *sopE*-positiven Isolaten auch produziert und sekretiert wird, wurde eine Westernblotanalyse von Kulturüberständen der entsprechenden Isolate abgeschlossen. Mit Hilfe eines SopE-spezifischen Antiserums (IM1) konnte in allen Isolaten eine 25 kDa-Protein detektiert werden, das in *sopE*-negativen Stämmen (Typhimurium M106; 3351/78 (SopE $\Phi^{sopE::aphT}$)) und Typhimurium 2728/96 (DT104)) nicht nachzuweisen war (Abbildung 20C).

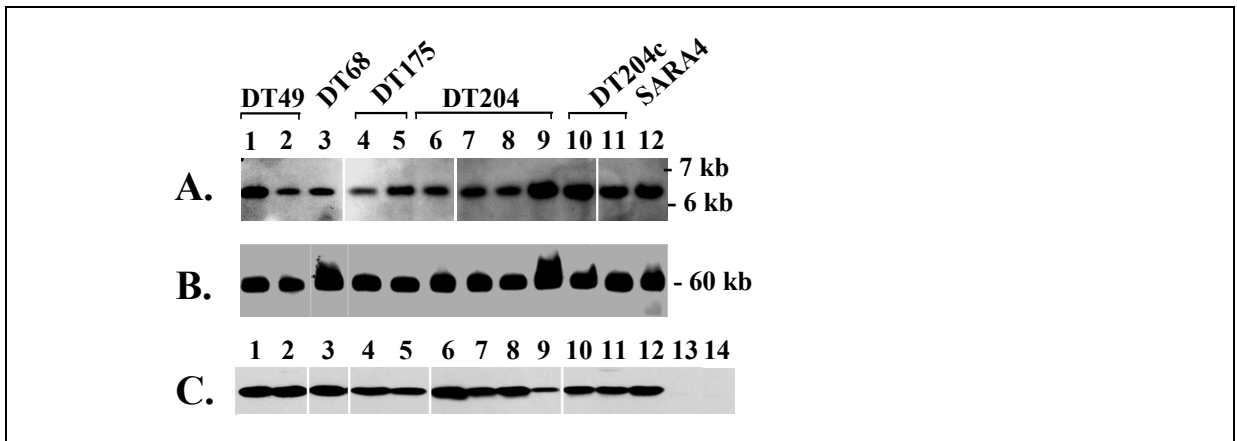


Abbildung 20: Strukturelle und funktionelle Konservierung der *sopE*-Region verschiedener Typhimurium-Isolate. Sämtliche untersuchten *sopE*-positive Typhimurium-Stämme sind SopE Φ -Lysogene. **A:** Southernhybridisierungsanalyse *EcoRV*-gespaltener chromosomaler DNS mit Sonde V (Abbildung 17). **B:** PFGE-Southernhybridisierungsanalyse *XbaI*-gespaltener chromosomaler DNS mit Sonde VI (Abbildung 17). **C:** Westernblotanalyse der SopE-Sekretion mittels eines α -SopE-Antiserums (IM1). *SopE*-positive Patientenisolat in A-C: 1: 839/88; 2: 408/88; 3: 11635/98; 4: 1/82; 5: 1646/82; 6: 3351/78; 7: 93/80; 8: 1690/75; 9: 74/80; 10: 646/96; 11: 6203/97; 12: SARA4; 13: M106 (3351/78 (SopE^{*sopE::aphT*}); 14: 2728/96 (*sopE*-negativ).

Diese Daten zeigen, daß sämtliche *sopE*-positiven Typhimurium-Stämme SopE Φ -Lysogene sind.

4.5.4 SopE Φ kann neben Typhimurium weitere *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare lysogenisieren

P2-ähnliche Bakteriophagen können ein breites Spektrum gram-negativer Bakterien, einschließlich *Yersinia* spp., *Shigella* spp. und *Pseudomonas* spp. infizieren (Bertani und Six, 1988; Nakayama *et al.*, 1999). Dies läßt vermuten, daß SopE Φ neben Typhimurium-Isolaten weitere *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare und auch möglicherweise andere Bakterienspezies infizieren kann.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden weitere Konversionsexperimente durchgeführt. In diesen Experimenten wurden Stämme von *E. coli*, *Shigella* spp. und *Yersinia* spp., wie auch Stämme verschiedener *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare untersucht. Die *sopE*-negativen Typhimurium-Isolate 1919/96 und 4959/96 dienten bei diesen Experimenten als Positivkontrolle. 4×10^7 Bakterien wurden mit 10^6 pfu SopE Φ ^{*sopE::aphT*} infiziert. Die Ansätze wurden anschließend auf LB-Agar (50 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert. Kanamycin-resistente Kolonien wurden mit den Stämmen Paratyphi A Referenzstamm PT1, Gallinarum X3796, Enteritidis LT1b und mit den Kontrollstämmen (Typhimurium 1919/96, 4959/96, sowie A36; Abbildung 21) erhalten (Lysogene aus Paratyphi A PT1 und Enteritidis LT1b wurden jeweils von Dr. W. Rabsch im RKI Wernigerode hergestellt). Mit *E. coli*, *Shigella* spp. und *Yersinia* spp. wurden bei diesen Versuchen keine Lysogene erhalten.

SopE Φ kann somit Virulenzfaktoren auch zwischen Stämmen unterschiedlicher Serovare transferieren. Der horizontale Transfer durch lysogene Konversion ließ sich hingegen nicht über die Speziesgrenze hinweg nachweisen. Die Klärung der Mechanismen, die zu dieser Speziesbarriere führen, könnten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht weiterverfolgt.

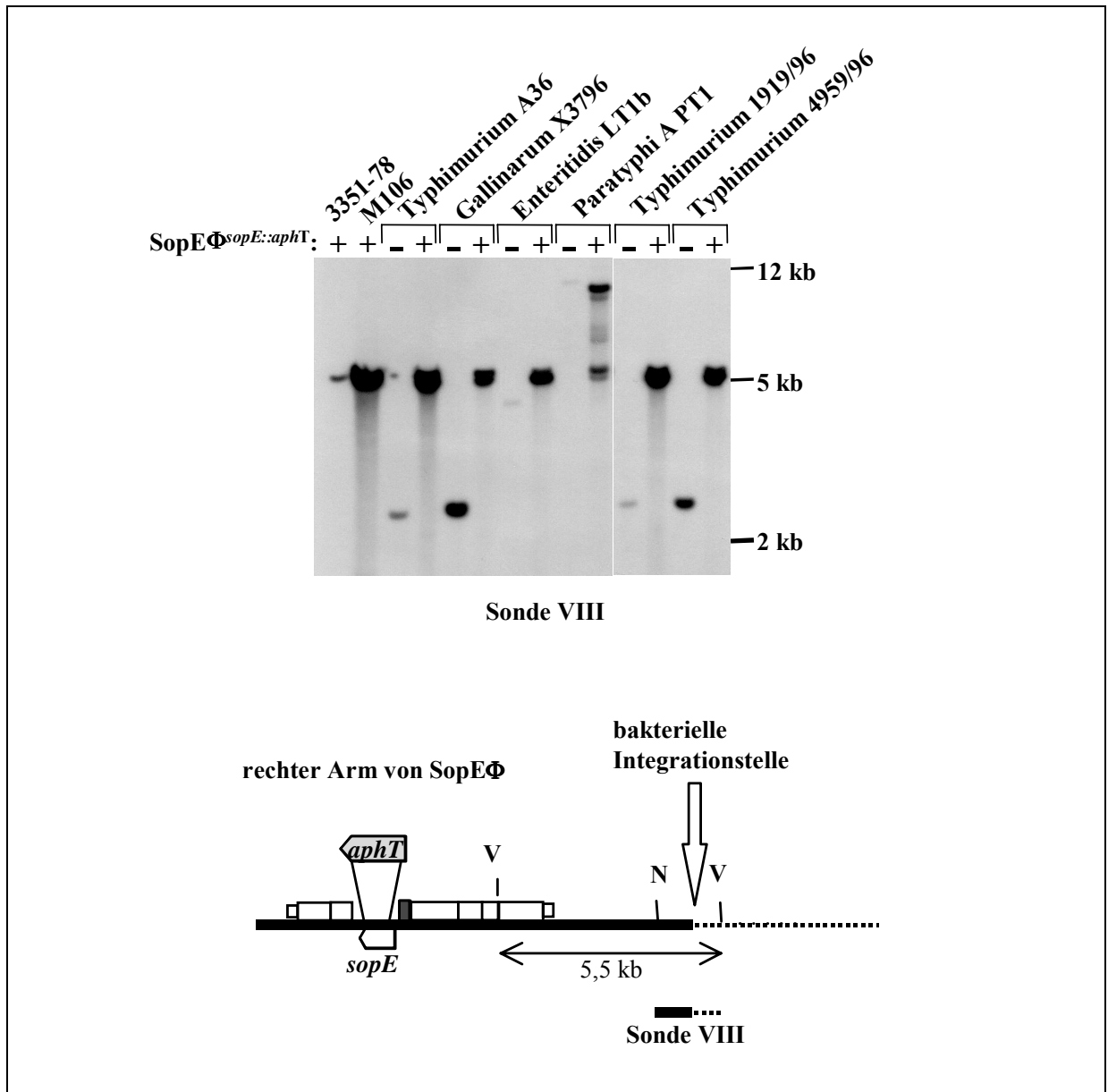


Abbildung 21: Lysogene Konversion verschiedener *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare. Stämme verschiedener SopE Φ -negativer *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare wurden mit SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ lysogenisiert. Chromosomale DNS der Empfängerstämmen (-) und der entsprechenden Lysogene (+) wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* gespalten und durch Southernhybridisierung mit der Sonde VIII (siehe unteres Schema) analysiert. Als Kontrolle dienten 3351/78 (SopE Φ) und M106 (3351/78 (SopE $\Phi^{sopE::aphT}$), sowie Typhimurium-Stamm 1919/96 und 4959/96. V. *EcoRV*; N: *NdeI*.

Um zu bestätigen, daß bei den erhaltenen Lysogenen SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ tatsächlich im Chromosom integriert ist, wurde eine Southernanalyse durchgeführt. Chromosomale DNS der Lysogene und der Empfängerbakterien wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* gespalten, in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Southernhybridisierung wurde mit Sonde VIII durchgeführt (Abbildung 21). Bei der chromosomalen DNS jedes Empfängerstammes hybridisierte Sonde VIII mit einem spezifischen Fragment, was darauf hindeutet, daß die Integrationsstelle in diesen Stämmen vorhanden ist (Abbildung 21, Spur (-)). Dieses Hybridisierungssignal kann in den Lysogenen nicht detektiert werden (Abbildung 21, Spur (+)). Statt dessen hybridisiert Sonde VIII bei allen Lysogenen mit einem 5,5 kb-Fragment (Abbildung 21).

Diese Daten belegen, daß $\text{SopE}\Phi^{\text{sopE}::\text{aphT}}$ in allen untersuchten Lysogenen in das bakterielle Chromosom integriert ist. Der Phage kann also nicht nur Typhimurium-Stämme sondern auch Stämme verschiedener anderer *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare infizieren und lysogen konvertieren. Somit kann beispielsweise eine *aphT*-Kassette horizontal transferiert werden. Außerdem bestätigen diese Versuche, daß $\text{SopE}\Phi$ eine bevorzugte, jedoch noch nicht näher charakterisierte Integrationsstelle besitzt.

4.6 Analyse der $\text{SopE}\Phi$ -Integrationsstelle

Der Bakteriophage P2 integriert durch spezifische Rekombination zwischen der Anheftungsregion *attB* (*attachment region-att*) im Chromosom des Bakteriums und *attP* der zirkulären P2-DNS. Durch die Rekombination kommt es zur Bildung von *attR* und *attL* an den jeweiligen Enden des integrierten Prophagen (Abbildung 22; Barreiro und Haggard-Ljungquist, 1992; Yu *et al.*, 1989, Yu und Haggard-Ljungquist, 1993a). Alle vier *att*-Stellen (*attB*, *attP*, *attL* und *attR*) weisen eine 27 Nukleotide lange, konservierte *att*-Kernsequenz (*core sequence*) auf, die als Schlüsselerkennungsstelle für die Enzyme wirkt, die für die Integration bzw. das Ausschneiden des temperenten Bakteriophagen verantwortlich sind. Innerhalb dieser homologen Kernsequenz findet auch die Rekombination statt.

Die *attR*-Sequenz des $\text{SopE}\Phi$ -Prophagen muß sich im klonierten DNS-Fragment (enthält Sequenzen von $\text{SopE}\Phi$ und angrenzende chromosomale Region des Lysogens M106) des Vektors pM36 befinden. Um diese zu identifizieren, wurden in einer zweistufigen Strategie zunächst die Integrationsstelle des *sopE*-negativen Typhimuriumstammes A36 (inklusive *attB*) und das die *attL*-Region-beinhaltende Ende des $\text{SopE}\Phi$ -Prophagen kloniert. Sequenzvergleiche der klonierten DNS-Fragmente sollten die Identifizierung der konservierten *att*-Kernsequenz erlauben (Abbildung 22).

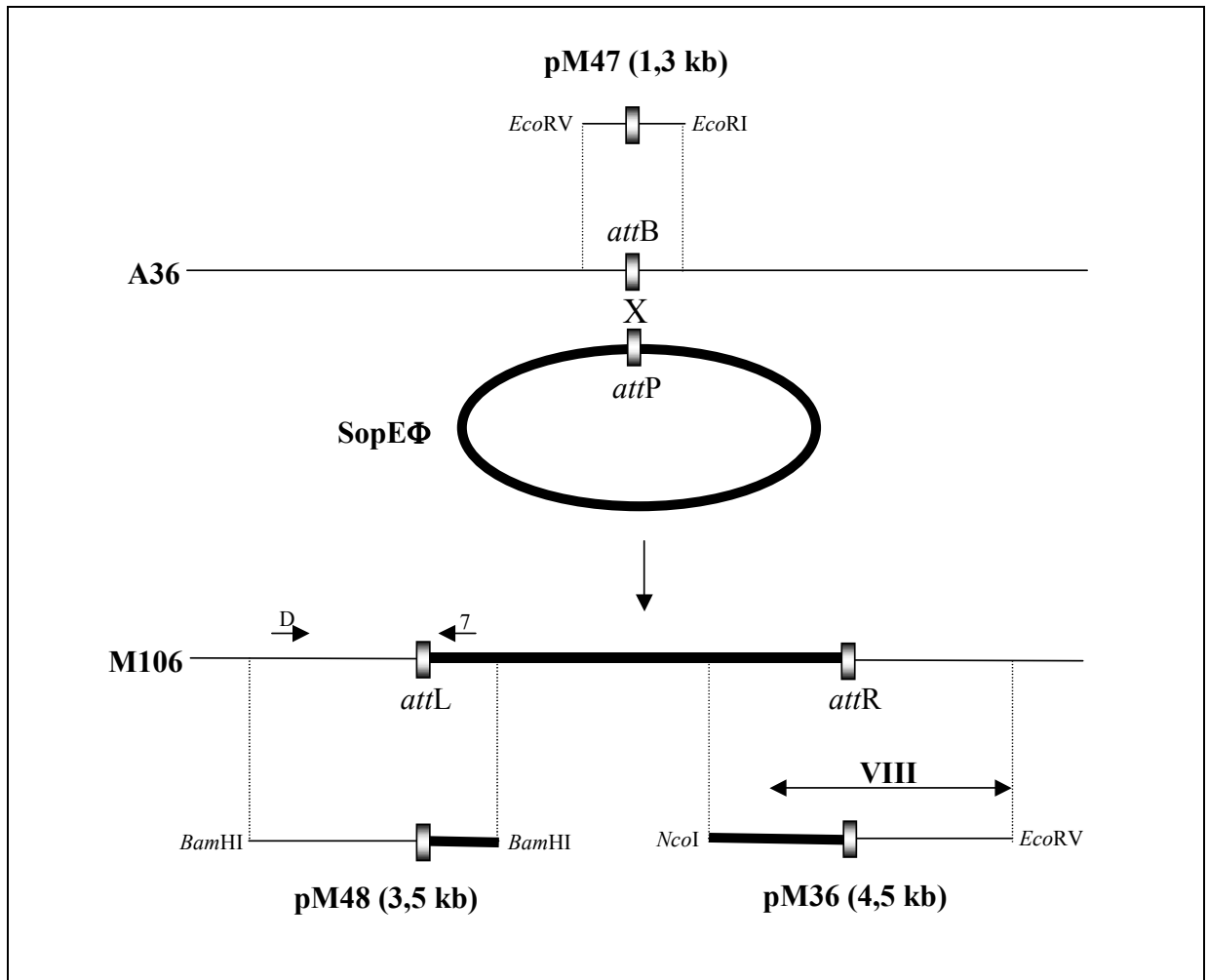


Abbildung 22: Schema der Phagenintegration über ortsspezifische Rekombination und Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Plasmide pM36, pM47 und pM48. Durch Rekombination der Phagen-*attP* mit der bakteriellen *attB*-Kernsequenz entstehen *attL* und *attR* an den jeweiligen Enden des integrierten Prophagen. VIII: Sonde VIII für Southernhybridisierungen. D: Oligonukleotid prM48-D; 7: Oligonukleotid prM48-7.

In Southernhybridisierungsanalysen mit Sonde VIII wurde gezeigt, daß die *attB*-Stelle im SopE Φ -negativen Typhimuriumstamm A36 auf einem ca. 1,3 kb großen *EcoRI/EcoRV*-Fragment lokalisiert ist (Abbildung 22, Daten nicht gezeigt). *AttB* und die angrenzenden Sequenzen wurden mit dem pM36-Insert als Sonde aus einer Plasmidbibliothek (pBluescript II SK+) chromosomaler 1- 1,5 kb *EcoRV/EcoRI*-Fragmente chromosomaler DNS von Typhimurium A36 isoliert (pM47). Zusätzlich zu der *attB*-Kernsequenz beinhaltet M47 auch bakterielle, chromosomale Sequenzen um diese Integrationskernstelle (Abbildung 22). In einer weiteren Southernanalyse wurden die klonierten Fragmente aus pM47 (homolog zu Sequenzen um die *attB*-Kernstelle) und von pM36 (homolog zur 3'-gelegenen, „rechten“ Seite von *attB*) als Sonde verwendet, um bei M106 (3351/78 (SopE Φ ^{*sopE::aphT*})) ein 3,5 kb großes *Bam*HI Fragment zu identifizieren, das der *attL*-Region des integrierten SopE Φ -Prophagen entspricht. 3-4 kb große *Bam*HI-Fragmente von M106 wurden anschließend in pBluescript II SK+ kloniert. Aus dieser Genbank wurde das 3,5 kb-Fragment durch Koloniehybridisierung mit dem klonierten Fragment aus pM47 als Sonde isoliert. 1,6 kb des klonierten, *attL* beinhaltenen Fragmentes aus pM48 wurden später sequenziert.

Southernhybridisierungsanalysen verifizierten, daß die Plasmide pM47 und pM48 tatsächlich *attB* und *attL* beinhalten (Abbildung 23).

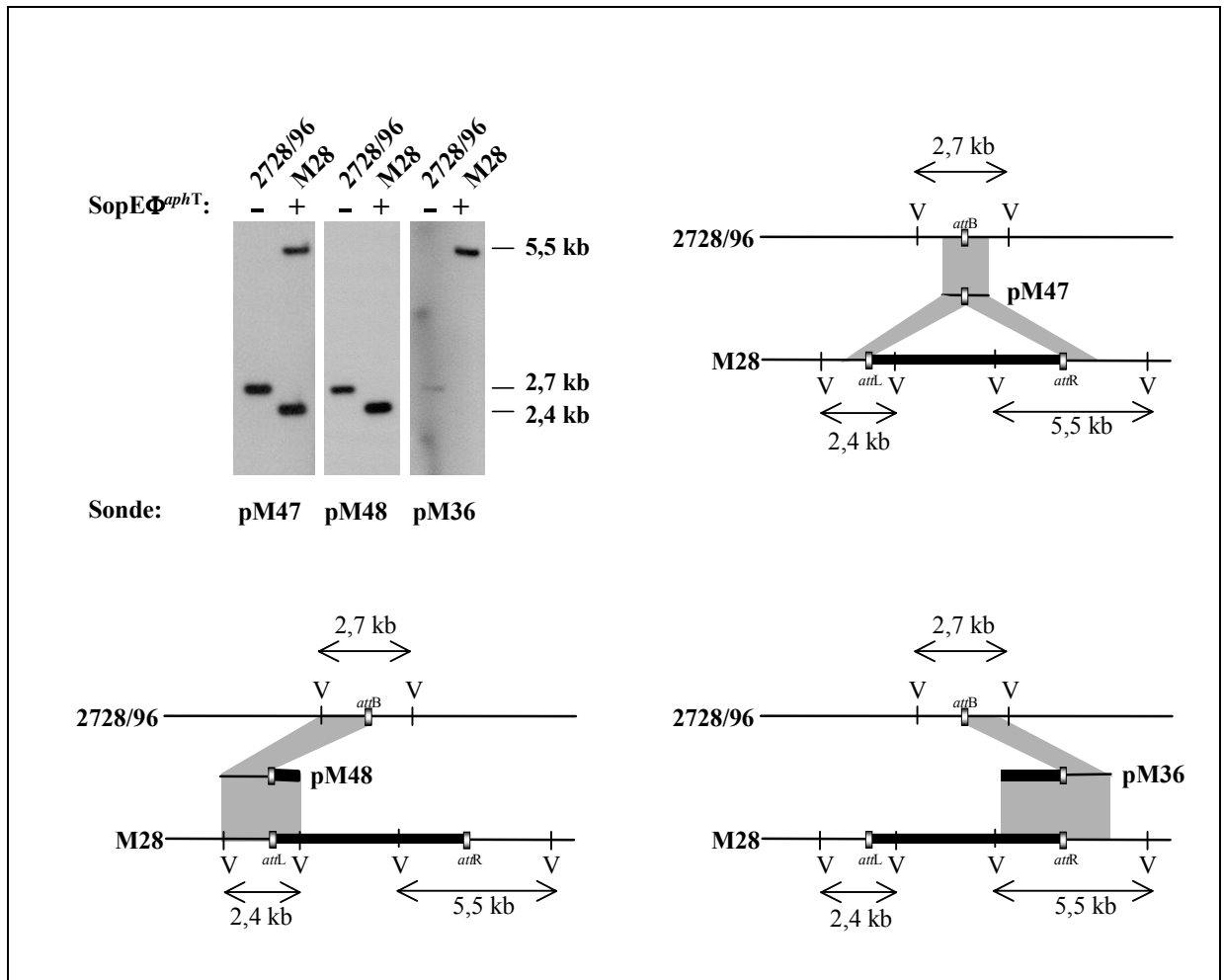


Abbildung 23: Überprüfung der Klone pM36, pM47 und pM48 mittels Southernhybridisierungsanalyse. *EcoRV*-gespaltene chromosomale DNS von M28 (2728/96 (*SopE Φ^{aphT}*)) und des isogenen Empfängerstammes 2728/96 wurde mit den angegebenen Sonden hybridisiert. Die Sonde aus pM36 erkennt dabei im Lysogen M28 den „rechten“ Übergang des Prophagen *SopE Φ* (*attR*-Region; 5,5 kb), Sonde pM48 den „linken“ Übergang (*attL*-Region; 2,4 kb) und die Sonde aus pM47 sowohl bakterielle Sequenzen „links und rechts“ von *attB*, die auch in pM36 und pM48 vorhanden sind (2,4 kb und 5,5, kb).

Über Sequenzvergleich der klonierten Fragmente von pM36, pM47 und pM48 konnte die homologe Kernsequenz von *SopE Φ* als ein 27 Nukleotide großer Block identifiziert werden (Abbildung 24). 26 von 27 Nukleotiden sind zwischen *attB* und *attR* konserviert. *AttL* weist zwei Nukleotiddeletionen und eine Nukleotidinsertion auf. Die Sequenzabweichungen in der *attL*-Kernsequenz können keine zufälligen Punktmutationen sein, denn Analysen der *attL* Sequenzen drei weiterer *sopE*-positiver Typhimuriumstäme (3351/78 (DT204), 1/82 (DT175) und 11635/98 (DT68)) ergaben dieselben Sequenzen (Daten nicht gezeigt; Tabelle 10, prM48-7, prM48-D).

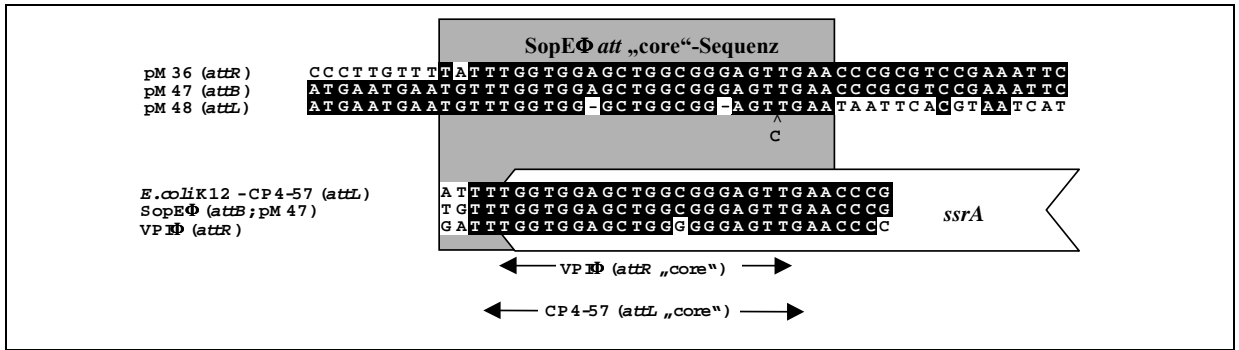


Abbildung 24: Die att-Kernsequenz von SopEΦ. *AttL* und *attR* weisen Punktmutationen im Vergleich zur *attB*-Sequenz auf. Die *attB*-Kernsequenz ist Teil des *ssrA*-Gens. **Oben:** Die klonierten Fragmente aus pM36, pM47 und pM48 wurden mit Hilfe des „ClustalW“-Programmes verglichen. Identische Nukleotidpositionen sind schwarz unterlegt. **Unten:** Vergleich der *att*-Kernsequenzen von CP4-57 (*E. coli*), SopEΦ (Typhimurium) und VPIΦ (*V. cholerae*). Grauer Kasten: SopEΦ *att*-Kernsequenz (= „core“-Sequenz). Weißer Pfeil: *ssrA*, 3'-Ende.

Nimmt man an, daß SopEΦ, ähnlich wie der Phage λ, über ortsspezifische Rekombination integriert (Kitts und Nash, 1987; Campbell 1992), dann muß sich die konservierte *attP*-Kernsequenz in der zirkulären, replikativen Form von SopEΦ von der *attB*-Kernsequenz in vier Positionen unterscheiden: drei Mutationen wie für *attL* und eine Mutation, wie für *attR* beschrieben (Abbildung 24) (*attP*=TATTTGGTGG_GCTGGCGGAGTGAACCCG). Legt man das Campbell-Modell der Phagenintegration zugrunde, muß während der Phagenintegration der Strangaustausch über eine Hollidaystruktur zwischen der Phagen *attP*- und der bakteriellen *attB*-Region innerhalb der Sequenz TTTGGTGG auf der linken Seite der Kernsequenz verlaufen (Abbildung 24). Auf diese Weise gelangt nach der Rekombination bzw. Integration das abweichende Nukleotid auf der linken Seite in die *attR*-Kernsequenz und die anderen drei Nukleotidabweichungen der *attP*-Kernsequenz in die *attL*-Sequenz (Abbildung 25).

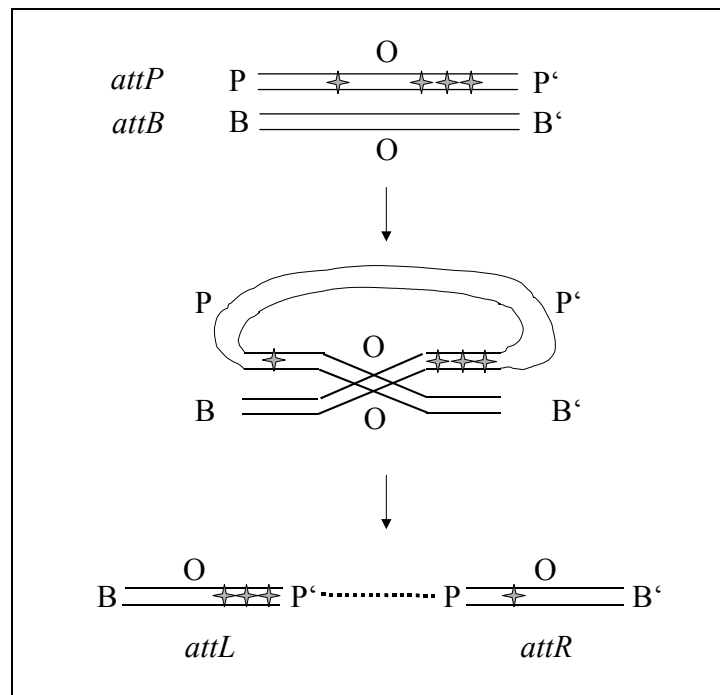


Abbildung 25: Ortsspezifische Rekombination zwischen attP und attB und darausfolgende Verteilung der Punktmutationen auf attR und attL. BOB' und POP': *att*-Regionen des Bakteriums und des Phagen. O: *att*-Kernsequenz. Gepunktete Linie: Integrierter Anteil des Bakteriophagen. Stern: Punktmutation.

AttB liegt zwischen *intA*, einem Gen mit Ähnlichkeit zu Integrasen der P4-Familie (z.B. CP4-57) und *ssrA* (Abbildung 26). Dabei beinhaltet *attB* die letzten 23 Nukleotide des 3'-Endes von *ssrA* (Abbildung 24, Abbildung 26). *SsrA* kodiert eine 363 nt große, stabile tmRNS (10SaRNS). tmRNS besitzt eine wichtige Funktion bei der Degradation partiell synthetisierter Proteine (Komine *et al.*, 1994; Keiler *et al.*, 1996, Karzai *et al.*, 2000). *SsrA* wurde bereits als Integrationspunkt für einen P4-ähnlichen Phagen (CP4-57, Kirby *et al.*, 1994) aus *E. coli*, für eine chromosomale virulenzassoziierte Region in *Dichelobacter nodosus* (Haring *et al.*, 1995) und für VPI Φ von *Vibrio cholerae*, einem filamentösen Bakteriophagen, der das Tcp-Adhäsion kodiert, identifiziert (Karaolis *et al.*, 1999; Abbildung 24 unten).

Diese Untersuchung zur SopE Φ -Integration gibt einen weiteren Hinweis darauf, daß *ssrA* (höchst wahrscheinlich sehr ähnlich zu den tRNS-Genen) als Integrationsstelle für Pathogenitätsinseln und Bakteriophagen dienen kann (Cheetham und Katz, 1995; Hacker und Kaper, 1999). Interessanterweise deutet die chromosomale Organisation der *attB*-Stelle darauf hin, daß es sich bei dieser Erkennungsstelle im Bakterienchromosom um die *attL*-Seite eines bereits in das 3'-Ende von *ssrA* integrierten CP4-57-ähnlichen Prophagen handeln könnte (Abbildung 24 und Abbildung 26). Die Untersuchungen der *att*-Kernsequenzen für die Integration von SopE Φ konnten weiterhin zeigen, daß sich *attB* und *attP* um 4 Punktmutationen unterscheiden. Dennoch konnte eine erfolgreiche Integration in das bakterielle Chromosom gezeigt werden (Kapitel 4.5.4).

4.7 Vergleiche von SopE Φ mit dem SopE Φ -verwandten Prophagen in Typhi

Sowohl die in Kapitel 4.4.5 besprochenen Sequenzhomologien der Schwanz- und Schwanzfaserregion als auch die für die SopE Φ -Kartierung beschriebenen Southernhybridisierungsergebnisse konnten zeigen, daß der SopE Φ -Prophage in Typhimurium 3351/78 einem Prophagen der P2-Familie in Typhi CT18-Genom sehr ähnlich ist. Durch Identifizierung der *attR*- und *attL*-Regionen von SopE Φ in Typhimurium M106 konnten nun Vergleiche der Randbereiche beider Phagen aus Typhi und Typhimurium vorgenommen werden.

Vergleicht man die Randregionen um *attL* und *attR* von SopE Φ mit denen des Prophagen in Typhi, so sind gewisse Übereinstimmungen zu finden (Abbildung 26). In den rechten Enden beider Prophagen ist das Schwanzproteing D, das Gen für Ogr (transkriptioneller Aktivator für die späte Genexpression) und weitere 109 nt, welche die *attR*-Kernsequenz mit einschließen, vorhanden (Abbildung 26). Allerdings sind auch größere Unterschiede zu beobachten: (1): Der Prophage bei Zentisom 93 des Typhi CT18-Chromosoms beinhaltet zwischen *ogr* und der *att*-Stelle ein weiteres offenes Leseraster, *orf1*, das keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen bzw. Genen aufweist. (2): Beim Prophagen aus Typhi CT18 ist an der rechten Integrationsstelle nur ein kleines 3'-terminales Bruchstück von *ssrA* vorhanden. Dieses Bruchstück enthält jedoch die vollständige *attR*-Kernsequenz. Der Prophage ist in das 3'-Ende von *samA* integriert. Dieses Gen kodiert ein Protein des UV-Reparatursystems (Abbildung 26). (3): Es bestehen keine Ähnlichkeiten zwischen dem linken Ende von SopE Φ (*attL* und Glykoprotein α (*gp\alpha*); der sequenzierte Anteil von *gp\alpha* ist ähnlich zu der ORI-Erkennungs- bzw. Helikasedomäne von *Gp\alpha* des Bakteriophagen P4) und den P2-ähnlichen Genen (*int* und *cI*) des Prophagen aus Typhi CT18. (4): Es gibt keine erkennbare *attL*-Kernsequenz auf der linken Seite des integrierten Bakteriophagen in Typhi CT18. Der Prophage kann deshalb vermutlich nicht induziert werden. Diese Unterschiede zwischen beiden Prophagen könnten erklären, warum es nicht möglich war, das linke Ende von SopE Φ mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion und Oligonukleotiden, die auf der Basis vom Typhi CT18-Genom entwickelt wurden, zu amplifizieren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der oben

erwähnten Unterschiede wurde der Prophage auf Zentisomposition 93 von Typhi CT18 als SopEΦ-Ty bezeichnet.

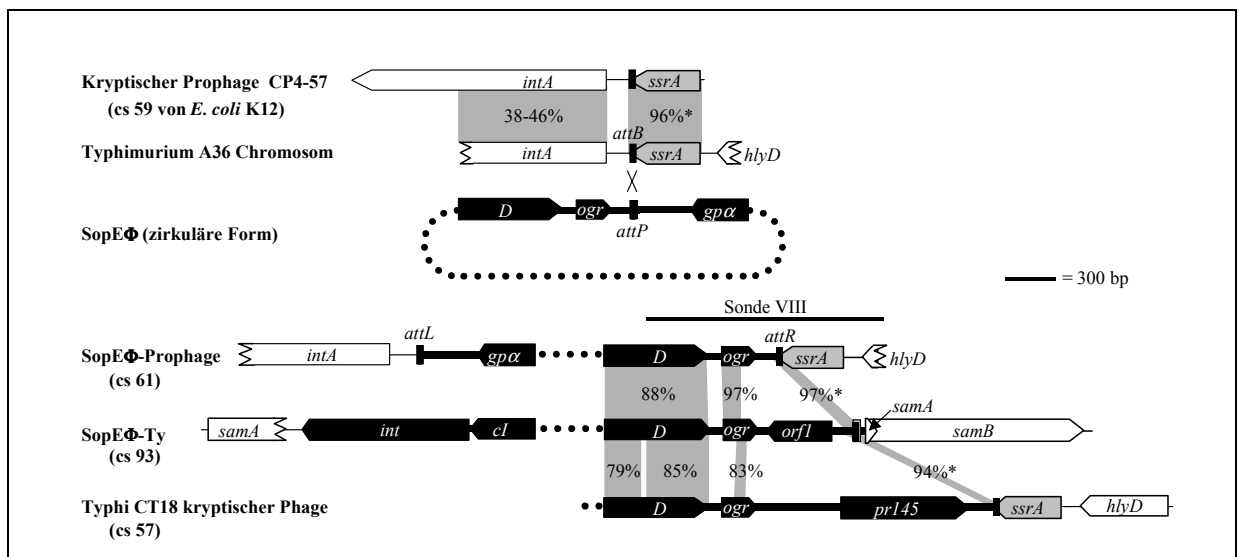


Abbildung 26: Integrations- / Anheftungsregion von ΦCP4-57, SopEΦ, SopEΦ-Ty und des kryptischen Phagen in Typhi CT18. SopEΦ scheint in die *attL*-Region eines bereits in das *ssrA*-Gen integrierten, kryptischen Prophagen integriert zu sein. Weitere Aminosäuresequenzvergleiche zeigen die Verwandtschaft der SopEΦ-ähnlichen Prophagen in Typhimurium bzw. Typhi. Schattierte Bereiche: Aminosäureübereinstimmung (%); *: Nukleinsäureübereinstimmung (%); schwarze Pfeile: offene Leseraster von SopEΦ und den homologen Sequenzen aus Typhi CT18; *attL*/*attR*: *att*-Kernsequenzen; gepunktete Linien: Zentrale Sequenzen von SopEΦ; Balken: Sonde VIII für die Southernhybridisierung.

Im Verlauf dieser Analysen konnte eine zweite Region in Typhi CT18 identifiziert werden, die hohe Sequenzähnlichkeit zu SopEΦ und SopEΦ-Ty zeigt. Diese Region liegt im Zentisombereich 57 und ist mehr als 78 % ähnlich zu dem rechten Ende von SopEΦ-Ty. Die Sequenzähnlichkeit erstreckt sich über die Phagenschwanzgene FII, T, U und D. Weiterhin sind homologe Bereiche zu *ogr* und zu einem offenen Leseraster (*pr145*) mit einer Ähnlichkeit zu dem *gag-pro-pol*-Gen des bovinen Leukämievirus (BLV) zu finden. Bei diesem Phagen fehlen allerdings sämtliche Abschnitte stromaufwärts von FII. Interessanterweise ist auch dieser kryptische Prophage im 3'-Ende des *ssrA*-Gens inseriert (Abbildung 26).

Im Genom von Typhi CT18 kommen also zwei Phagen bzw. kryptische Prophagen mit Ähnlichkeit zu SopEΦ vor.

4.8 Einfluß der lysogenen Konversion mit SopEΦ auf die Virulenz von *Salmonella* spp.

Die Assoziation von SopEΦ mit den epidemisch dominanten Typhimurium-Stämmen (vor allem DT49, DT204 und DT204c) führte zur Hypothese, daß die lysogene Konversion mit SopEΦ die Virulenz bzw. die epidemiologische Durchsetzungsfähigkeit der Empfängerbakterien erhöhen könnte. Diese Hypothese steht in Einklang mit der Beobachtung, daß die Inaktivierung von *sopE* in Typhimurium SL1344 die Invasionsfähigkeit halbierte (Hardt *et al.*, 1998a). Es gilt jedoch noch zu zeigen, daß der horizontale Transfer eines Virulenzfaktors über lysogene Konversion wirklich die Virulenz eines ohnehin virulenten Wildtyp-Stammes erhöhen kann.

Um SopE-produzierende, lysogene Typhimurium-Stämme zu erhalten, mußte zunächst ein rekombinanter Phage konstruiert werden, der *sopE* und eine 1,3 kb große *aphT*-Kassette (vermittelt Kanamycinresistenz) kodiert. Die Klonierung erfolgte durch allelen Austausch in Typhimurium 3351/78 mit dem Suizidvektor pM35 (Tabelle 4), so wie es bereits für die Herstellung von M106 (3351/78 (SopE $\Phi^{sopE::aphT}$)) beschrieben wurde (Kapitel 4.5.1). Der resultierende Bakterienstamm wurde als M25 (3351/78 (SopE Φ^{aphT})) bezeichnet (Abbildung 27A). Der rekombinante Prophage wurde mit Mitomycin C induziert, aufgereinigt und es wurde ein Lysat mit einem Titer von ca. 10^7 pfu/ml hergestellt (Kapitel 3.3.3, Abbildung 14).

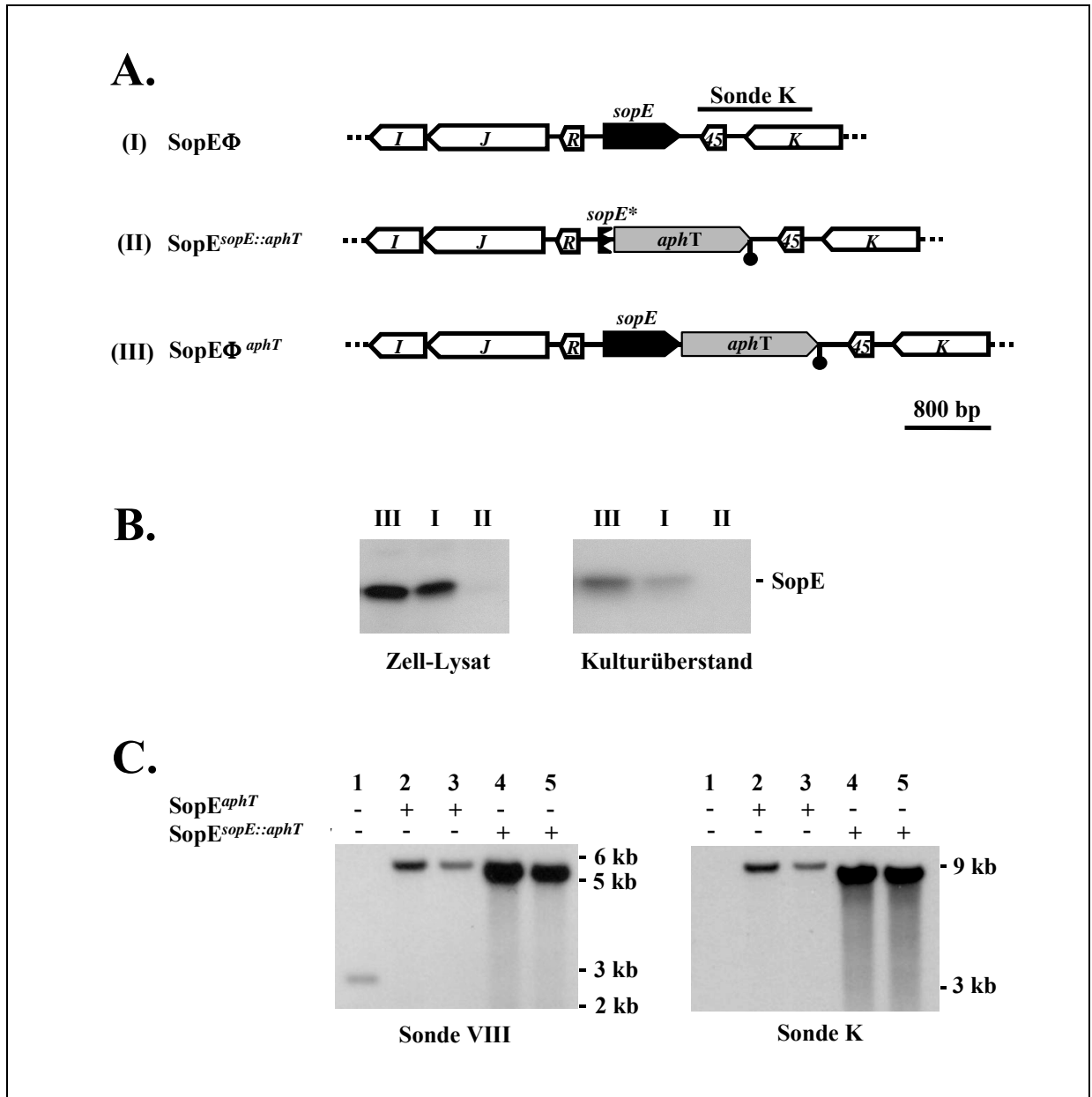


Abbildung 27: Rekombinante SopE Φ -Derivate. Die Prophagen aus diesen Stämmen wurden induziert und für die lysogene Konversion von Typhimurium ATCC14028s verwendet. **A.:** Genkarten von SopE Φ , SopE $\Phi^{sopE::aphT}$ und SopE Φ^{aphT} . **B.:** Westernblotanalyse der SopE-Sekretion. III: Stamm M25 (3351/78 (SopE Φ^{aphT})). I: Stamm 3351/78 (SopE Φ). II: Stamm M106 (3351/78 (SopE $\Phi^{sopE::aphT}$)). Zell-Lysate und Proteine der Kulturüberstände wurden analysiert (Kapitel 3.5.1 und 3.6.1). **C.:** Southernhybridisierungsanalyse chromosomaler DNS von ATCC14028s (1), zwei unterschiedliche Klone von M30 (2+3) und zwei unterschiedliche Klone von M31 (4+5) wurden mit *EcoRV* gespalten und mit Sonde VIII bzw. K hybridisiert. Sonde VIII erkennt bei allen Lysogenen

ein 5,5 kb großes Fragment, das auch im Lysogen M106 (3351/78 (SopEΦ^{sopE::aphT})) erkannt wird (Abbildung 21; Spur2). Sonde K hybridisiert hingegen nur mit chromosomaler DNS der Lysogenen).

Tabelle 18: Übersicht über hergestellte Mutanten des Stammes ATCC14028s.

Stamm	Genotyp		Beschreibung	Referenz
	<i>sopE</i>	<i>sopE2</i>		
ATCC14028s	-	+	Typhimurium Wildtypstamm; kein SopEΦ-Lysogen	Fields, 1986
M30	+	+	Typhimurium ATCC14028s (SopEΦ ^{aphT})	diese Arbeit
M31	-	+	Typhimurium ATCC14028s (SopEΦ ^{sopE::aphT})	diese Arbeit
M32	+	-	Typhimurium ATCC14028s (SopEΦ ^{aphT}); <i>sopE2::tet^r</i> ,	diese Arbeit
M119	-	-	Typhimurium ATCC14028s, <i>sopE2::tet^r</i>	diese Arbeit
M119 (pM149)	-	+	Typhimurium ATCC14028s, <i>sopE2::tet^r</i> , pM149	diese Arbeit

Dieses Lysat wurde für die lysogene Konversion des Typhimurium-Stammes ATCC14028s (Fields *et al.*, 1986) eingesetzt. ATCC14028s ist einer der klassischen Stämme für Untersuchungen der Pathogenese der Salmonellose. Doch besitzt dieser Stamm kein SopEΦ bzw. *sopE*-Gen. Allerdings weist er ein funktionelles *sopE2*-Gen auf (Abbildung 27C, Abbildung 28; Daten nicht gezeigt). Da SopE und SopE2 redundante Funktionen haben, war zu vermuten, daß die lysogene Konversion mit SopEΦ einen stärkeren Phänotyp in einem *sopE2*-negativen Hintergrund zeigt. Um dies zu untersuchen, wurden auch SopEΦ^{aphT}-Lysogene von M119 (ATCC14028s, *sopE2::tet^r*) hergestellt.

Southernanalysen der aufgereinigten Lysogene (Tabelle 18) verifizierten, daß SopEΦ^{aphT} bzw. SopEΦ^{sopE::aphT} im Chromosom des Typhimurium-Stammes ATCC14028 integriert waren (Abbildung 27C).

Die Invasion in Wirtszellen ist ein Maß für die Pathogenität (Galan und Collmer, 1999). SopE ist maßgeblich an der Invasion von *Salmonella* spp. in die Wirtszelle beteiligt (Wood *et al.*, 1996; Hardt *et al.* 1998a, Hardt *et al.*, 1998b, Zhou *et al.*, 1999a, Miroid *et al.*, 2001). Daher stellen Zellkulturinvasionsversuche eine sehr sensitive Methode dar, um eine Steigerung der Virulenz bei den ATCC14028s-Lysogenen zu untersuchen.

COS7-Zellkulturzellen wurden für 50 min mit einer Dosis von 10 Bakterien pro Wirtszelle infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, differentiell gefärbt und die Anzahl der internalisierten Bakterien pro infizierter Zelle bestimmt (siehe Kapitel 3.6.2). M30 (ATCC14028s (SopEΦ^{aphT})) ist mehr als 2,5-fach invasiver als Wildtyp ATCC14028s (Abbildung 28). M31 (ATCC14028s (SopEΦ^{sopE::aphT})) war hingegen genauso invasiv wie ATCC14028s. Dies zeigt, daß *sopE* und nicht etwa andere Gene in SopEΦ für die erhöhte Invasivität von M30 verantwortlich ist. In Übereinstimmung mit früheren Experimenten konnte gezeigt werden (Stender *et al.*, 2000, Bakshi *et al.*, 2000), daß die Inaktivierung des *sopE2*-Genes (M119 = ATCC14028s; *sopE2::tet^r*) zu einer 2-fach verminderten Invasivität im Vergleich zu einem isogenen Wildtypstamm (ATCC14028s) führt. Vergleicht man M30 (ATCC14028s (SopEΦ^{aphT})) mit M119 (ATCC14028s; *sopE2::tet^r*), so ist dieser Stamm sogar 5-fach weniger invasiv (Abbildung 28). Der Invasionsdefekt von M119 (ATCC14028s; *sopE2::tet^r*) konnte durch Transformation mit einem *sopE2*- Expressionsvektor (pM149; Ta-

belle 4) oder durch lysogene Konversion mit $\text{SopE}\Phi^{aphT}$ (M32 = ATCC14028s ($\text{SopE}\Phi^{aphT}$); $\text{sopE2}::\text{tet}^r$) komplementiert werden (Abbildung 28).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die lysogene Konversion mit $\text{SopE}\Phi$ (bzw. seines Derivates $\text{SopE}\Phi^{aphT}$) die Invasivität von Typhimurium ATCC14028s erhöht. Diese Ergebnisse belegen erstmals experimentell, daß die Virulenz eines „virulenten“ Wildtyp-Typhimurium-Stammes durch lysogene Konversion weiter gesteigert werden kann.

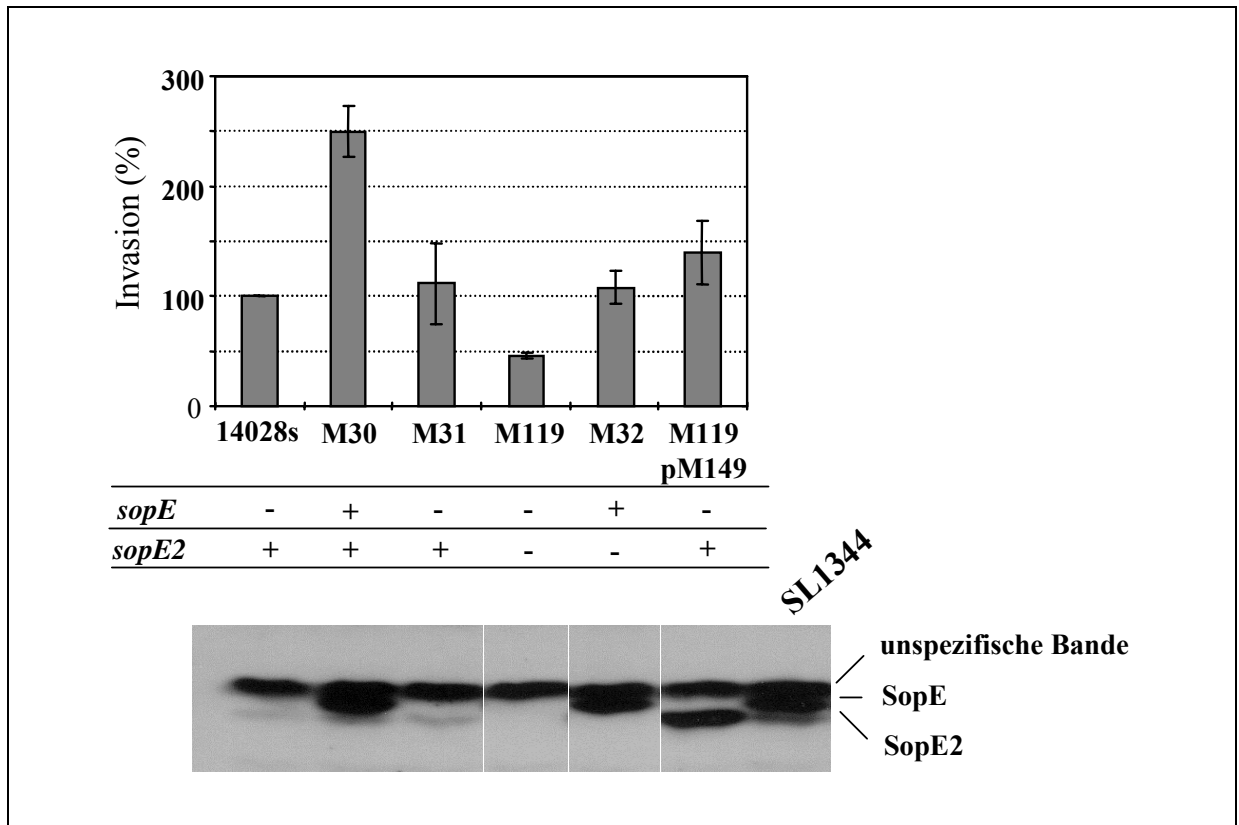


Abbildung 28: Einfluß von $\text{SopE}\Phi$ auf die Invasivität von ATCC14028s. Die lysogene Konversion mit einem *sopE*-tragenden Bakteriophagen kann die Invasion und somit die Virulenz von ATCC14028s steigern. **Oben:** Auswertung der differentiellen Immunfärbung zur Messung der bakteriellen Invasion in Zellkulturzellen (Kapitel 3.6.2). **Unten:** Westernblotanalyse bakterieller Lysate mit einem polyklonalen Antiserum (α -SopE2), mit Spezifität für SopE und SopE2, zeigen die Expression von SopE und SopE2 in den unterschiedlichen Mutanten. Als Positivkontrolle diente Lysat von Typhimurium SL1344 (*sopE*-positiv, *sopE2*-positiv). pM149: SopE2-Expressionsvektor (Stender *et al.*, 2000).

4.9 SopE kodierende Sequenzen bilden 3 Gruppen hoher Sequenzähnlichkeit

SopE ist nur in wenigen Stämmen, die zu *S. enterica*-Subspezies-I, -IV und -VII gehören, vertreten (Tabelle 13). In den *sopE*-positiven *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium- und Typhi-Stämmen ist *sopE* in der Schwanzfaserregion von SopEΦ bzw. SopEΦ-Ty gelegen. Es war jedoch bekannt, daß einige *sopE*-positive *S. enterica*-Stämme keine P2-ähnlichen Sequenzen kodieren (Hardt *et al.*, 1998a, siehe dazu auch Abbildung 35). Diese „P2-negativen“, aber *sopE*-tragenden Regionen deuten auf die Existenz weiterer genetischer Elemente hin, die am horizontalen Gentransfer von *sopE* beteiligt sein könnten.

Ein phylogenetischer Sequenzvergleich der *sopE*-kodierenden Region von *S. enterica*-Stämmen (Typhimurium SL1344 (Genbank AF043239), Typhi X3744 (eigene Sequenzierung, siehe Kapitel 4.4.5), Dublin (Genbank L78932), Gallinarum X3796 (pM16) und Hadar X3230 (pM19), SARC2 (pM64), SARC9 (pM65), SARC10 (pM66), SARC15 (pM67) und SARC16 (pM68); Tabelle 4) mit Hilfe des „SNAP“-Analyseprogrammes (Nei und Gojobori, 1986; Kapitel 3.7.2) ergab, daß sich die *sopE*-Sequenzen in drei Gruppen mit hoher Sequenzähnlichkeit aufteilen lassen (Abbildung 29; siehe auch Abbildung 12).

In Gruppe I befinden sich die *sopE*-Sequenzen des P2-ähnlichen Prophagen aus Typhimurium und Typhi. Zur Gruppe II gehören die *sopE*-Sequenzen von Gallinarum, Hadar und Dublin. Schließlich sind in Gruppe III die *sopE*-Sequenzen von *S. enterica*-Subspezies-IV (SARC9 und 10) und -VII (SARC15 und 16) gruppiert.

Diese Analyse deutete daraufhin, daß *Salmonella* spp. drei verschiedene Typen von SopE-kodierenden genetischen Elementen besitzen könnten. Die *sopE*-flankierenden Regionen von Gruppe II und III waren noch nicht bekannt.

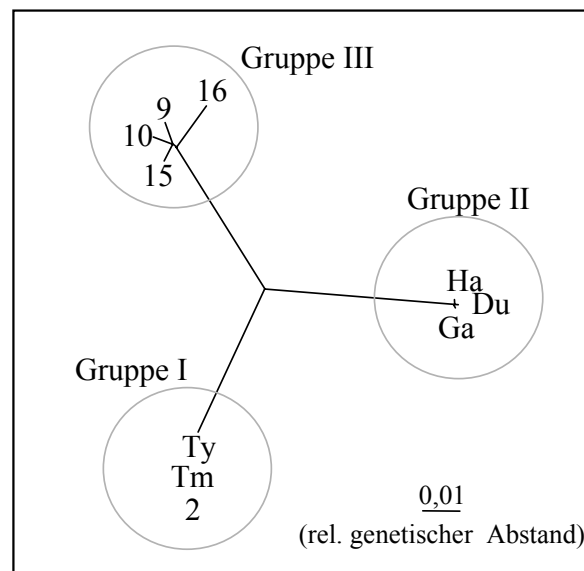


Abbildung 29: Phylogenetische Analyse der *sopE*-Sequenzen. Die Sequenzunterschiede an den synonymen Nukleotidpositionen der *sopE*-kodierenden Bereiche (nt 1-nt 720) wurden mit dem „SNAP“-Analyseprogramm (Nei und Gojobori, 1986) berechnet und in Form eines phylogenetischen Stammbaumes dargestellt. Dabei können drei phylogenetisch abgetrennte Gruppen unterschieden werden. 2, 9, 10, 15, 16: SARC2, SARC9, SARC10, SARC15, SARC16 (eigene Sequenzierung, pM64-pM68); Ty: Typhi X3744 (eigene Sequenzierung, pM6 und pM11); Tm: Typhimurium SL1344 (Genbank AF043239); Ha: Hadar X3230 (eigene Sequenzierung, pM19); Ga: Gallinarum X3796 (eigene Sequenzierung, pM16); Du: Dublin (Genbank L78932).

4.9.1 In Stämmen der Gruppe II ist *sopE* in einem kryptischen lambdoiden Bakteriophagen lokalisiert

Um die chromosomale Organisation des *sopE*-Locus von Gruppe II zu untersuchen, wurden die *sopE*-benachbarten Regionen von Gallinarum (X3796) und Hadar (X3230) kloniert und sequenziert (pM16, pM19; Tabelle 4). Beide Sequenzen und ein 3278 nt großer Sequenzabschnitt des Enteritidis-Genomprojektes (Kapitel 3.7.1) sind in ihren überlappenden Bereichen bis zu 99 % identisch (Abbildung 30). Durch PCR-Analysen konnte gezeigt werden, daß zumindest im Falle von Gallinarum X3796 der gesamte in Abbildung 30 gezeigte Bereich vorhanden ist (Kapitel 9.2).

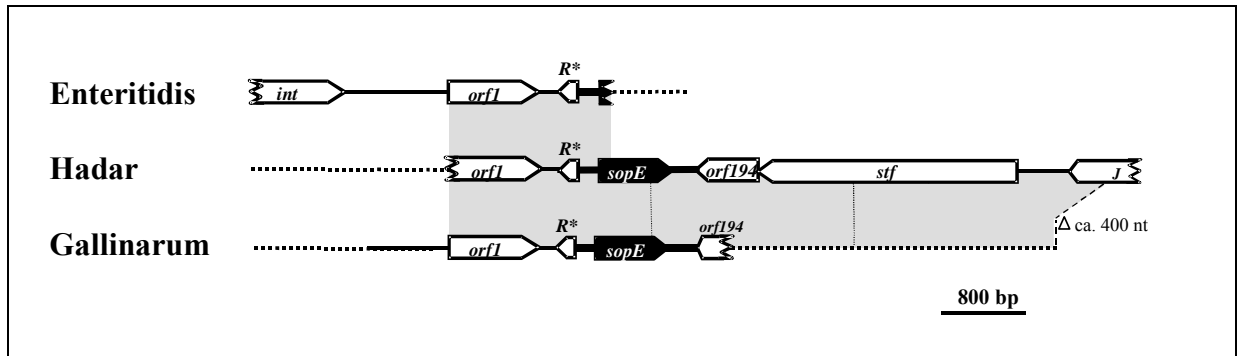


Abbildung 30: Gen-Kartierung der Gruppe II-Stämme. *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Enteritidis, Hadar, Gallinarum und Dublin zeigen die gleiche genomische Organisation in der *sopE*-Region. Dargestellt sind die *sopE*-subchromosomalen Regionen aus Enteritidis (Sequenz aus Genomsequenzierungsprojekt, Kapitel 3.7.1), Gallinarum X3796 und Hadar 3230 (pM16, pM19; eigene Sequenzierung); graue Kästchen: homologe Bereiche mit mehr als 99 % Sequenzübereinstimmung.; R*: Rekombinase-Pseudogen; kleine Pfeile: Oligonukleotide für PCR.

Ein Vergleich der *sopE*-Sequenz mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen der *sopE*-Region der Stämme der Gruppe II (Gallinarum, Enteritidis, Hadar) zeigte eine auffallende Ähnlichkeit zur Schwanz-, Schwanzfaser-, Integrasenregion des Bakteriophagen λ und anderer lambdoider Phagen, einschließlich der in *Salmonella* spp. gefundenen Bakteriophagen Gifsy-1 und Gifsy-2 (Abbildung 31, Figueroa-Bossi *et al.*, 1997; Figueroa-Bossi und Bossi, 1999; Figueroa-Bossi *et al.*, 2001).

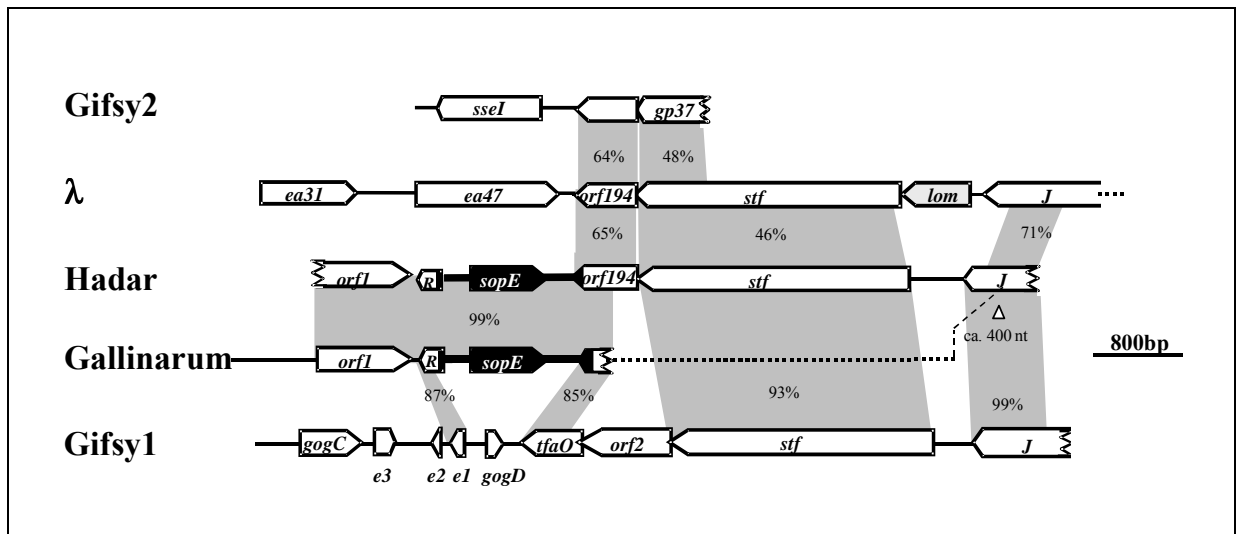


Abbildung 31: Sequenzhomologie der Gruppe II-Regionen zu den lambdoiden Phagen Gifsy-1 und Gifsy-2. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzvergleiche. Hellgraue Kästchen: Aminosäureübereinstimmung (%); schwarz: hochkonserviertes *sopE*-Element. (Gifsy-1 (Genbank AF254761) und Gifsy-2 (Genbank AF254763); Phage λ : Genbank NC_001416).

Das Integrasesgen *int*, das Schwanzfaserassemblierungsgen *194*, das Seitenschwanzfasergen (*side tail fiber*) *stf* und das Schwanzfasergen *J* sind in der gleichen Reihenfolge angeordnet wie bei Phage λ (Abbildung 31). *SopE*, das Rekombinasepseudogen *R* und *orf1* (keine bekannten Homologien) sind in einem 3142 nt langen DNS-Block gelegen, der keine Ähnlichkeit zum λ -Phagen hat. Diese Region ersetzt eine ungefähr 7 kb große, für λ nicht essentielle Region (inklusive der offenen Leserahmen: *ea59*, *ea31*, *ea47*), die auch in vielen anderen lambdoiden Bakteriophagen, wie beispielsweise in HK97 (Genbank NC_002167), fehlt.

Die Sequenzvergleiche belegen, daß *sopE* in Gallinarum-, Enteritidis-, Dublin- und Hadar-Stämmen in der Schwanz-, Schwanzfaser- und Integraseregion eines lambdoiden Phagen eingebettet ist. Da kein aktiver Bakteriophage detektiert werden konnte, wurde dieser Prophage als kryptischer Phage eingeordnet.

4.9.2 Die Organisation der *sopE*-flankierenden Region der Stämme aus Gruppe III

Um die Organisation der *sopE*-Region aus Gruppe III (Abbildung 29) zu untersuchen, wurde die chromosomale Region eines Vertreters, Stamm SARC16, kloniert und sequenziert (pM75; Tabelle 4). In SARC16 ist ein kleiner Bereich, sowohl stromaufwärts (409 nt) als auch stromabwärts (353 nt) von *sopE*, zu den entsprechenden *sopE*-flankierenden Sequenzen der Gruppen I und II sehr ähnlich (87-94 % Homologie; Abbildung 32A). Dieser konservierte Bereich, auch als *sopE*-Kassette bezeichnet, beinhaltet 0,2 kb des Pseudogens *R* und das 5'-verkürzte Ende eines offenen Leserahmens (*orf194*), der Ähnlichkeiten zu den Schwanzfaserassemblierungsproteinen der λ - und P2-Familien besitzt. Die angrenzenden Bereiche unterscheiden sich jedoch von denen der Gruppe I und II. Stromaufwärts liegen *orfA* und *orfB*, die 45 % bzw. 57 % identisch zu *yeaR* (Genbank AE000274) und *yccL* (Genbank D90736) sind. Dies sind zwei kleine offene Leserahmen mit unbekannter Funktion, die in der 1,8 bzw. 1,6 Mb Region des *E. coli*-Chromosomes liegen (Blattner *et al.*, 1997). Die Region, die stromabwärts von *sopE* gelegen ist, beinhaltet den 3'-terminalen Bereich eines offenen Leserahmens, der Ähnlichkeiten zu *E. coli ycgN* zeigt (1,2 Mb des *E. coli* K12 Chromosoms; Blattner *et al.*, 1997).

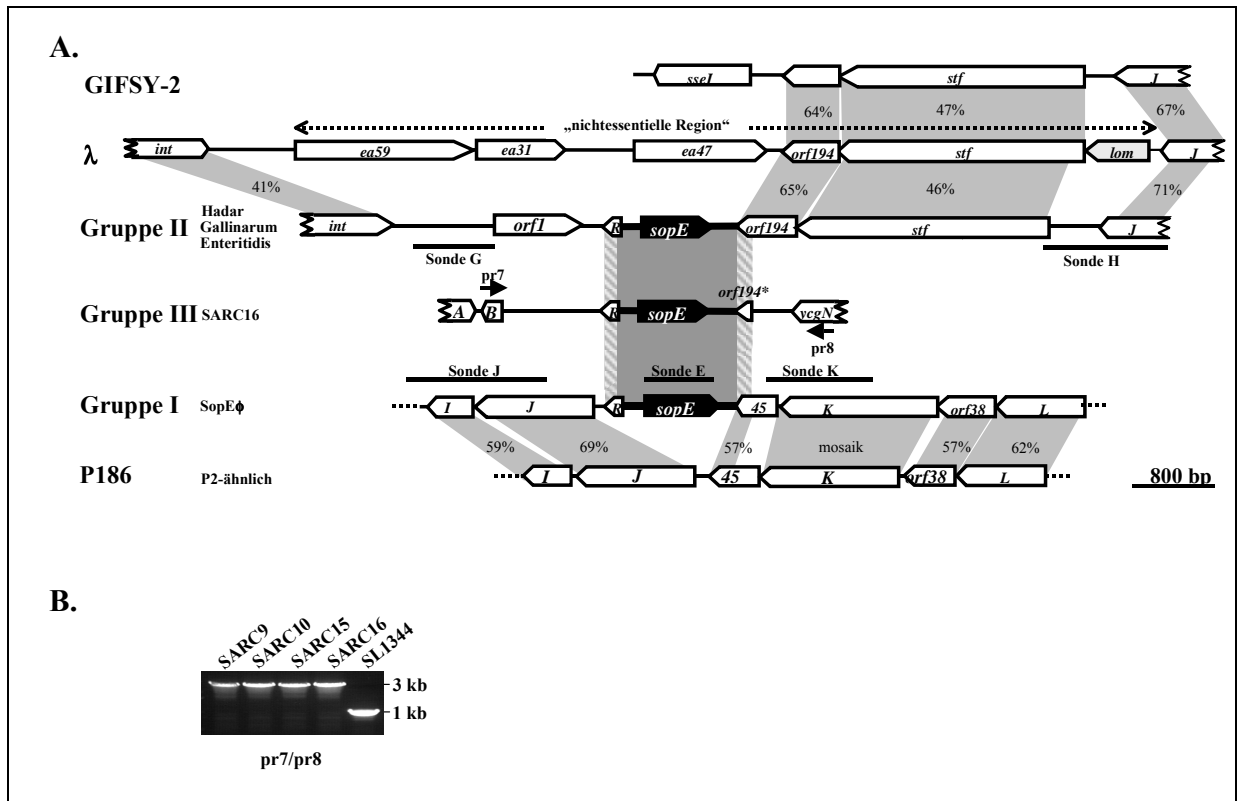


Abbildung 32: Vergleich der *sopE*-Regionen von Stämmen der Gruppe I, II und III. Obwohl die Stämme der unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen eine unterschiedliche chromosomale Organisation aufweisen, ist ihnen eine hochkonservierte Sequenz („*sopE*-Kassette“) gemein, in der auch SopE kodiert ist (schwarz). **A.:** Karten der *sopE*-Regionen der Gruppe I, II und III: Überblick. Schwarz/dunkelgrau: konservierte 1,2 kb *sopE*-Kassette; grau gestreift: Sequenzblöcke mit niedrigerer Sequenzähnlichkeit am Rand der *sopE*-Kassette; grau: Aminosäureübereinstimmung (%); kleine Pfeile: Oligonukleotide; schwarze Balken: Sonden für die Southernhybridisierung. Genbank#: Gifsy-2: AF254763 und B_STM2A (Typhimurium Genomprojekt); λ: NC_001416; Enteritidis: Sequenz aus dem Genomsequenzierungsprojekt; Gruppe I: Typhi: eigene Sequenzierung (pM6 und pM11; AF153829) und Typhimurium: AF043239; P186: NC_001317. Restliche Sequenzen aus Gruppe II und III: eigene Sequenzierung (pM16, pM19, pM75; Tabelle 4). **B.:** PCR-Analyse der *sopE*-Regionen aus Gruppe III. PCR-Oligonukleotide pr7 und pr8 wurden zur Analyse der chromosomalen DNS von SARC9, SARC10, SARC15, SARC16 und Typhimurium SL1344 (Kontrolle) verwendet.

Die *sopE*-Region der übrigen Stämme der Gruppe III (SARC9, SARC10, SARC15; vergleiche dazu Abbildung 29) wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden pr7 und pr8 (Abbildung 32A für Oligonukleotidpositionen) untersucht. Diese Analyse ergab ein ca. 3 kb großes Amplifikat mit SARC9, 10, 15 und 16, jedoch nur ein ca. 1 kb großes Produkt mit Typhimurium SL1344 (Abbildung 32B). Daraus kann geschlossen werden, daß *orfB* und *ycgN* in Typhimurium SL1344 direkt benachbart sind und daß die *sopE*-Kassette bei *S. enterica*-Stämmen der Gruppe III zwischen diese Gene inseriert wurde. Die flankierenden Bereiche zeigen für diese Stämme keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Bakteriophagen.

Es konnte somit gezeigt werden, daß in den *S. enterica*-Subspezies mindestens drei *sopE*-Elemente mit unterschiedlicher Organisation vorkommen. Gruppe I umfaßt dabei die Stämme, in denen SopE auf einem P2-ähnlichen Prophagen kodiert ist. Vertreter dieser Gruppe sind die *sopE*-positiven Stämme von *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare Typhimurium und Typhi. In Gruppe II ist SopE in einer nichtessentiellen Region (b2-Region) eines lambdoiden Prophagen kodiert. Vertreter dieser Gruppe II sind Stämme der *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare Dublin, Hadar, Gallinarum und Enteritidis. In Gruppe III ist *sopE* in einem chromosomalen Bereich integriert, der keine Homologien zu bekannten Bakteriophagen zeigt. Vertreter dieser Gruppe gehören *S. enterica* der Subspezies IV und VII an (SARC9, 10, 15, 16).

Alle drei Gruppen besitzen eine 1,3 kb große *sopE*-Kassette, in der neben *SopE* auch Teile des Rekombinasepseudogens *R* und Teile eines Phagenschwanzassemblierungsproteins kodiert sind. Die Analyse dieser konservierten Kassette und der direkt flankierenden Bereiche wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

4.10 Rolle der homologen Rekombination beim Transfer von *sopE* zwischen nicht-verwandten Bakteriophagen

Der genetische Mechanismus, der die Integration der bakteriellen Virulenzfaktoren in die Bakteriophagen Genome unterstützt und den Transfer solcher Gene zwischen verschiedenen Bakteriophagen beschleunigt, ist unbekannt (Hendrix *et al.*, 2000). *SopE* ist der erste Virulenzfaktor, der in dem Genom zweier unterschiedlicher, nicht verwandter Bakteriophagen identifiziert worden ist. Daher bieten die *sopE*-Regionen dieser Bakteriophagen erstmals die Gelegenheit, diese Transfermechanismen genauer zu untersuchen.

An jedem Ende der *sopE*-Kassette muß ein Rekombinationsereignis stattfinden, um nach horizontalem Transfer und Integration der Genkassette nicht die essentiellen Funktionen des Bakteriophagen zu beeinträchtigen. Die Analyse der *sopE*-flankierenden Regionen könnte daher Hinweise auf den genetischen Mechanismus der Rekombination bzw. *sopE*-Kassettenintegration geben.

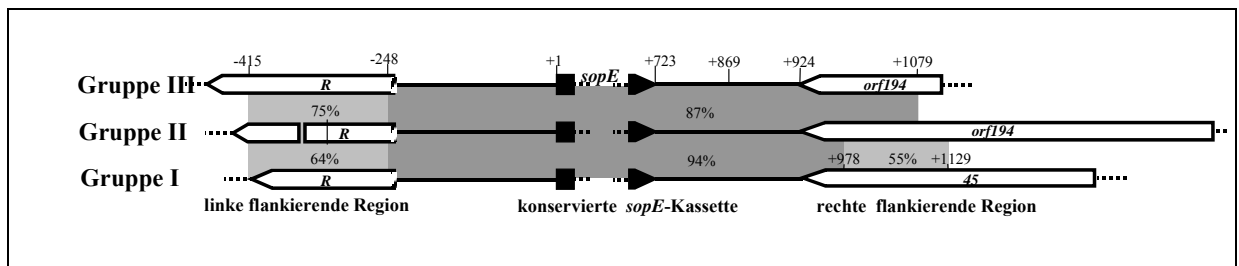


Abbildung 33: Die konservierte *sopE*-Region und flankierende Sequenzen der Gruppe I-III. Die hoch konservierte *sopE*-Kassette ist durch DNS-Bereiche mit 55-75 % Homologie flankiert, die als Rekombinationsbereiche für den horizontalen Transfer der Kassette dienen könnten. Dunkelgrau: >85 % Sequenzidentität; hellgrau: 55-75 % Sequenzidentität. Nukleotidpositionen wurden entsprechend dem ersten (+1) und letzten (+723) Nukleotid von *sopE* in *SopE*Φ (Gruppe I) nummeriert.

Während die Sequenzen weiter stromauf- und stromabwärts von *sopE* sich sehr stark voneinander unterscheiden (Abbildung 33), ist der Kern der *sopE*-Kassette hoch konserviert (Abbildung 33). Zur hochkonservierten *sopE*-Kassette gehören sowohl das 5'-Ende des Rekombinasegens *R* als auch das 3'-Ende des Schwanzfaserassemblierungsprotein-ähnlichen offenen Leserahmens *194* bzw. *45* (Abbildung 33).

Auf der rechten Seite verläuft die homologe Region zwischen Gruppe II und III bis Nukleotid +1079 und schließt den 3'-terminalen Bereich von *orf194* mit ein (Abbildung 33). Zwischen Gruppe I und II verläuft sie bis Nukleotidposition +978 und ist von einem Abschnitt mit geringer Sequenzhomologie (nt +978 bis +1129; Abbildung 33), der dem mittleren Bereich von *orf45* entspricht, begrenzt.

homologe Rekombination zwischen diesen Sequenzen den Transfer der *sopE*-Kassette zwischen zwei unterschiedlicher Bakteriophagenfamilien (λ und P2) vermittelt hat.

Geht man von einem Transfer der *sopE*-Kassette zwischen zwei Bakteriophagen aus, muß eine zweite Rekombination stromaufwärts von *sopE*, am linken Ende der Kassette postuliert werden. An diesem Ende wird die *sopE*-Kassette von einem Sequenzblock geringerer Homologie flankiert, der dem *R*-Pseudogen entspricht (Abbildung 33). *R*-ähnliche Sequenzen können jedoch nicht in dem Bakteriophagen P2 bzw. λ gefunden werden. Dies würde dafür sprechen, daß auch illegitime Rekombinationsereignisse am Transfer der Kassette beteiligt gewesen sind. Vor kurzem wurde eine Sequenz aus der Schwanzfaserregion des lambdoiden Phagen Gifsy-1 veröffentlicht (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001), die eine alternative Erklärung zuläßt. In der nichtessentiellen Region dieses Bakteriophagen ist *gogD* (auch *pagK* genannt) auf der einen Seite durch das Phagenassemblierungsgen (*tfaO*) und auf der anderen Seite durch ein verkürztes *R*-Pseudogen (*el*; Gunn *et al.*, 1998, Figuroa-Bossi *et al.*, 2001; Abbildung 34C) flankiert. Dies läßt vermuten, daß zwei homologe Rekombinationsereignisse zwischen *R*-Pseudogenen und Schwanzfaserassemblierungsprotein-Genen den Transfer zwischen *SopE* Φ und einem Gifsy-1-ähnlichen lambdoiden Bakteriophagen vermittelt haben könnten.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß das Gen eines Virulenzfaktors zwischen unterschiedlichen Bakteriophagen durch homologe Rekombination transferiert werden kann.

4.10.1 Die Verteilung P2- und λ -ähnlicher Sequenzen in *S. enterica*-Subspezies-I

Die Transferrate der *sopE*-Kassette zwischen verschiedenen Phagentypen hängt unter anderem von dem Vorkommen geeigneter Bakteriophagen ab. Neben dem Auftreten einer Vielzahl von P22-Varianten (Schmieger *et al.*, 1997), ist wenig über das Vorkommen anderer Bakteriophagen in *Salmonella* spp. bekannt. Daher wurde eine Southernhybridisierungsanalyse an Stämmen der SARB-Referenzstammsammlung durchgeführt. Die SARB-Referenzstammsammlung beinhaltet 72 phylogenetisch sehr gut charakterisierte Stämme der *S. enterica*-Subspezies-I (Boyd *et al.*, 1993). *EcoRV*-gespaltene chromosomale DNS dieser Stämme wurde in einer Southernhybridisierungsanalyse mit den in Abbildung 32 abgebildeten Sonden G, H, I und J hybridisiert. Zum Vergleich wurde das Hybridisierungsergebnis einer *sopE*-spezifischen Sonde in die Analyse miteinbezogen (Abbildung 35).

Insgesamt zeigen die Daten, daß λ - und P2-ähnliche Bakteriophagen bzw. kryptische Bakteriophagen sehr weit unter den *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare verbreitet sind. Die Verteilung der Hybridisierungssignale jeder einzelnen Sonde ist sehr heterogen und korreliert nicht mit der phylogenetischen Verwandtschaft der Stämme (Boyd *et al.*, 1996). Dies ist ein Zeichen für häufigen horizontalen Transfer.

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, daß *S. enterica*-Subspezies-I-Stämme, zusätzlich zu P22-ähnlichen Bakteriophagen, auch eine Vielzahl von λ - und P2-ähnlichen Bakteriophagen besitzen.

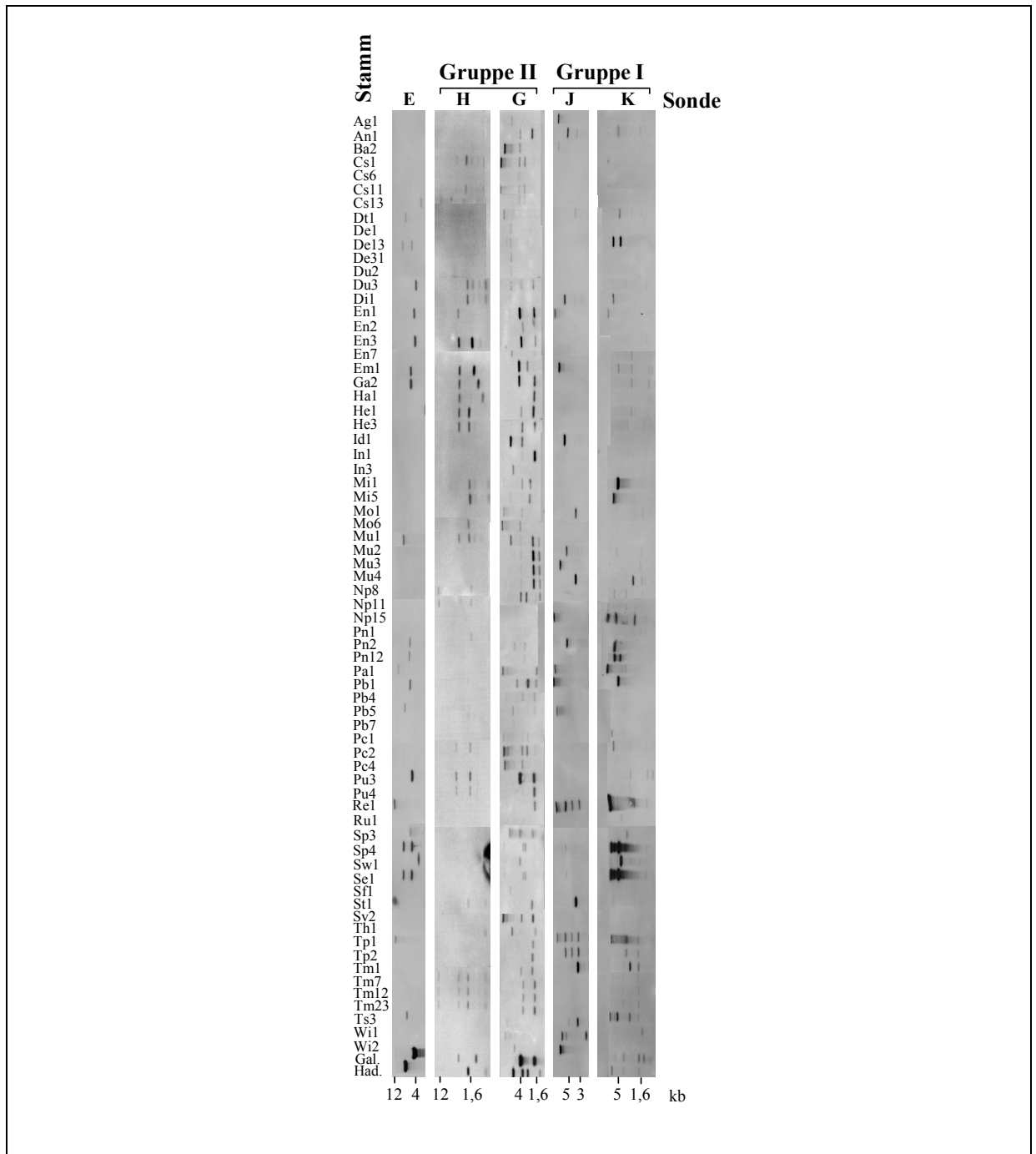


Abbildung 35: Verteilung der λ - und P2-ähnlichen Sequenzen, welche die *sopE*-Kassette bei *S. enterica* Subspezies-I-Stämmen Gallinarum, Hadar und Typhimurium flankieren. Eine Southernhybridisierungsanalyse der SARB-Referenzstammsammlung (Boyd *et al.*, 1993) unter der Verwendung von Sonden mit Spezifität zu lambdoiden bzw. P2-ähnlichen Bakteriophagen, zeigen, daß *Salmonella* spp. eine Vielzahl verschiedenster Bakteriophagen beinhalten können. *EcoRV*-gespaltene chromosomale DNS der Stämme der SARB-Referenzstammsammlung wurde mit den folgenden Sonden hybridisiert: E: *sopE*-kodierende Sequenz aus SL1344 (Abbildung 17, Tabelle 12); H: Sonde aus Hadar X3230 (Abbildung 32, Tabelle 12); G: Sonde aus Gallinarum X3796 (Abbildung 32, Tabelle 12); J: Sonde aus Typhimurium SL1344 (Abbildung 32, Tabelle 12); K: Sonde aus Typhimurium SL1344 (Abbildung 32, Tabelle 12). Die Größe der hybridisierenden Fragmente (kb) ist unten angegeben.

4.10.2 Der Austausch von Effektorproteinen zwischen Bakteriophagen kann Resistenzmechanismen umgehen.

Geht man davon aus, daß λ - oder P2-ähnliche Bakteriophagen potentielle Träger verschiedener Effektoren sind, so könnten Neukombinationen dieser Effektoren in *Salmonella* spp. über eine zufällige Kombination von lysogenen Konversionen mit Bakteriophagen geschaffen werden. Das Vorkommen bestimmter Resistenzmechanismen kann hierbei eine effiziente Neukombination des Effektorproteinrepertoires von *Salmonella* spp. unterbinden. Diese Resistenzmechanismen können auf der Ebene des Superinfektionsausschlusses oder aber durch die Besetzung von Phagenintegrationsstellen wirken (Susskind und Botstein, 1980). SopE Φ kann beispielsweise Stämme nicht effizient infizieren, die bereits einen SopE Φ -ähnlichen Prophagen beherbergen. Auch die Anwesenheit von Gifsy-Phagen interferiert mit der Infektion eines zweiten identischen Bakteriophagen (Figuroa-Bossi und Bossi, 1999, Figuroa-Bossi *et al.*, 2001). Daher stellt der Transfer der *sopE*-Kassette zwischen λ - und P2-ähnlichen Bakteriophagen möglicherweise einen Mechanismus dar, um Einschränkungen des horizontalen Transfers durch lysogene Konversion zu umgehen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden lysogene Konversionsexperimente mit SopE Φ ^{*sopE::aphT*}-Lysaten durchgeführt. Hadar, Gallinarum und Enteritidisstämme, die den kryptischen lambdoiden SopE-Prophagen beherbergen, konnten bereits mit SopE Φ lysogenisiert werden (Abbildung 21, Tabelle 19). Keine Lysogene konnten mit Typhi LTA oder *sopE*-positiven Typhimurium-Stämmen als Empfänger erhalten werden (Tabelle 19). Im Gegensatz dazu konnten Kontrollstämme des Serovars Typhimurium, die keinen SopE Φ -Prophagen beherbergen, erfolgreich mit SopE Φ ^{*sopE::aphT*} lysogenisiert werden (Tabelle 19). Southernhybridisierungsanalysen verifizierten, daß der SopE Φ ^{*sopE::aphT*}-Prophage in das Chromosom der Lysogene integriert war (Abbildung 21).

Die Anwesenheit von SopE Φ stellt also eine Barriere für den horizontalen Transfer durch lysogene Konversion mit SopE Φ dar. Im Gegensatz dazu interferiert die Anwesenheit eines kryptischen lambdoiden SopE-Prophagen nicht mit der lysogenen Konversion durch SopE Φ . Dies läßt vermuten, daß der Transfer einer *sopE*-Kassette zwischen λ - und P2-ähnlichen Bakteriophagen die Flexibilität des Effektorproteintransfers zwischen verschiedenen *Salmonella* spp. erhöhen könnte, indem er es erlaubt, Einschränkungen (durch eventuell auftretende Superinfektionsimmunität oder besetzte Integrationstellen) zu umgehen.

Tabelle 19: Der lambdoide SopE-Prophage inhibiert nicht die lysogene Konversion durch SopE Φ . Es wurden lysogene Konversionsstudien durchgeführt. Verschiedene *S. enterica*-Subspezies-I-Stämme, die entweder den lambdoiden SopE-Prophagen oder SopE Φ tragen, sind mit SopE Φ ^{*sopE::aphT*} infiziert worden. Dabei waren nur die Stämme lysogenisierbar, die keinen SopE Φ -Prophagen beherbergen (M3, M38, M4, M9, M6: hergestellte Lysogene). RKI: Robert Koch Institut Wenigerode.

<i>S. enterica</i> - Subspezies-I- Stamm	natürliche Lysogene		lysogene	
	lambdoider SopE-Prophage	SopE Φ	Konversion mit SopE Φ ^{<i>sopE::aphT</i>}	Herkunft
Gallinarum X3796	+	-	M3	diese Arbeit
Enteritidis LT1b/1	+	-	M38	RKI
Typhi LT A	-	+	nicht erfolgreich	RKI
Typhimurium A36	-	-	M4	diese Arbeit
Typhimurium 3739/96	-	-	M9	diese Arbeit
Typhimurium 3805/96	-	-	M6	diese Arbeit
Typhimurium 3351/78	-	+	nicht erfolgreich	diese Arbeit
Typhimurium 1/82	-	+	nicht erfolgreich	diese Arbeit
Typhimurium 11635/98	-	+	nicht erfolgreich	diese Arbeit

5 Diskussion

5.1 Evolution der Wirtszellinvasivität von *Salmonella* spp.

Phylogenetische Analysen hatten gezeigt, daß sich die Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* vor ca. 100 bis 160 Millionen Jahren gebildet haben (Ochman und Wilson, 1987). Ein wichtiger Schritt bei diesem Prozeß war der Erwerb der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1), die unter anderem einen sogenannten Typ-III-Sekretionsapparat kodiert (Groisman und Ochman, 1996). Dieses Typ-III-Sekretionssystem erlaubte es dem Bakterium erstmals, sogenannte Effektorproteine direkt in das Zytosol von Zellen des Wirtstieres zu translozieren und Signalübertragungsmechanismen im Inneren der Wirtszellen zu manipulieren. Mit Hilfe der translozierten Effektorproteine können *Salmonella* spp. z.B. den Zelltod in Makrophagen, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine oder die Invasion in normalerweise nicht phagozytotisch aktiven Zellen des Wirtes induzieren. Es war bereits bekannt, daß das Typ-III-Translokationssystem der SPI1 in sämtlichen heute vorkommenden *Salmonella* spp. hoch konserviert ist (Li *et al.*, 1995; Ochman und Groisman, 1996). In den letzten fünf Jahren sind neun Effektorproteine in verschiedenen *S. enterica*-Subspezies-I-Stämmen identifiziert worden. Einige Effektorproteine (SipA, SipB, SipC, SptP und AvrA) sind in SPI1 selbst und andere (SopB, SopD, SopE und SopE2) in entfernt gelegenen Regionen des Genoms kodiert. In einer Southernhybridisierungsanalyse mit Gen-spezifischen Sonden konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß es zwei Gruppen von Effektorproteinen gibt, die zwischen sämtlichen untersuchten Stämmen von *S. bongori* und *S. enterica*-Subspezies konserviert sind. Die erste Gruppe umfaßt die Effektorproteine SipA, SipB, SipC und SptP, die im Kern der SPI1 kodiert sind. Diese Effektoren sind vermutlich zusammen mit dem Typ-III-Translokationsapparat als eine Einheit (SPI1) horizontal erworben worden. Diese vier Effektorproteine haben wahrscheinlich bereits eine „basale“ Virulenzfunktion gehabt, die dazu beitrug, SPI1 im Genom von *Salmonella* spp. zu stabilisieren. Möglicherweise hat die Fähigkeit, den Zelltod in Makrophagen (durch SipB; Hersh *et al.*, 1999) zu induzieren, hierbei eine Rolle gespielt. Zur zweiten Gruppe hochkonservierter Effektorproteine zählen SopE2, SopB und SopD. Diese Proteine sind außerhalb von SPI1 in chromosomalen DNS-Abschnitten kodiert, die im *E. coli*-Genom vollständig fehlen (diese Arbeit; Hardt *et al.*, 1998a; Jones *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1998; Hück, 1998; Stender *et al.*, 2000; Bakshi *et al.*, 2000). Der G+C-Gehalt der Gene dieser Effektorproteine und auch der ihrer unmittelbar flankierenden Regionen ist erheblich geringer als der durchschnittliche G+C-Gehalt des Chromosoms von *Salmonella* spp. (ca. 40 % im Gegensatz zu 52 %). Dies wird als Indiz für horizontal erworbene Genabschnitte gesehen. SopB, SopD und SopE2 sind nicht nur konserviert, sondern auch immer an der gleichen chromosomalen Position integriert. Ebenso belegen phylogenetische Analysen, daß SopB, SopD und SopE2 in der Zeitspanne zwischen der Abspaltung von *Salmonella* spp. von den *Escherichia* spp. vor ca. 100 bis 160 Millionen Jahren und der Diversifizierung von *S. bongori* und der *S. enterica*-Subspezies vor ca. 50 Millionen Jahren erworben wurden (Doolittle *et al.*, 1996; Ochman und Wilson, 1987). Es bleibt dabei unklar, ob diese Effektorproteingene unabhängig voneinander oder in einem Block mit SPI1 erworben wurden. Im letzteren Fall müßte angenommen werden, daß es vor der Integration ins Genom zu einer Fragmentierung des transferierten DNS-Bereiches gekommen sein muß (Abbildung 36).

sopE-Gen. SopE und SopE2 sind G-Nukleotidaustauschfaktoren für Cdc42 und Transfektionsexperimente zeigten, daß eines dieser Proteine ausreichend ist, um bakterielle Invasion zu vermitteln (Hardt *et al.*, 1998b; Stender *et al.*, 2000). *SopE* scheint also im Falle von Typhi die Funktion des mutierten *sopE2*-Gens zu ersetzen.

SopE zeigt keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen anderer Bakterienspezies. SopE2 von *Salmonella* spp. ist das einzige bekannte Homolog. Die phylogenetische Analyse von *sopE*- und *sopE2*-Sequenzen zeigte, daß in einem Stammbaum die Gene beider G-Nukleotidaustauschfaktoren in getrennten phylogenetischen Gruppen (Ästen) gelegen sind (Abbildung 12). Dabei ist der Abstand zwischen der *sopE*- und der *sopE2*-Gruppe relativ groß im Vergleich zum Abstand der *sopE2*-Sequenzen untereinander. Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, diese relativen genetischen Abstände zu interpretieren. (1) *SopE2* und *sopE* könnten aus zwei verwandten aber unterschiedlichen Bakterienstämmen in zwei unabhängigen Ereignissen von horizontalem Gentransfer erworben worden sein. (2) Nimmt man an, daß *sopE* aus *sopE2* durch eine Genduplikation entstanden ist, dann muß dieses Duplikationsergebnis bereits relativ lange vor der Diversifizierung von *S. bongori* und den *S. enterica*-Subspezies stattgefunden haben. Im letzteren gemeinsamen Vorfahren der *S. enterica*-Subspezies könnten die beiden Allele dann bereits deutliche Sequenzunterschiede aufgewiesen haben. (3) Wenn *sopE* durch Genduplikation aus *sopE2* hervorgegangen ist, kann dies zu einer erhöhten Evolutionsrate führen. Schnelle Mutationsraten können durch die funktionelle Redundanz zweier Proteine gefördert werden, da der Verlust der Funktionalität eines dieser Allele kompensiert werden kann. Welches dieser Szenarien zutrifft, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Neben SopE ist AvrA ein zweites variables Effektorprotein. Homologe des variablen Effektorproteins AvrA wurden in anderen gram-negativen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien gefunden (Hardt und Galan, 1997). Da *avrA* in einigen entfernt verwandten *Salmonella*-Stämmen nachgewiesen werden konnte, muß dieses Gen mehrere Male horizontal zwischen *Salmonella* spp. transferiert worden sein. Experimente mit den in der SPI1 gelegenen Regulatoren HilA und InvF zeigten, daß die AvrA-Expression nicht unter der Kontrolle von SPI1 steht (Eichelberg und Galan, 1999). Die Funktion von AvrA ist völlig unklar (Schesser *et al.*, 2000).

Zusammenfassend wird die Wirtszellinvasion von verschiedenen, im Chromosom weit voneinander entfernten Genabschnitten kontrolliert. Dabei spielen der in SPI1 kodierte Typ-III-Sekretionsapparat und mehrere Effektoren (SopE2; SopB), die in anderen chromosomalen Regionen kodiert sind, eine wichtige Rolle. Da diese Loci im letzten gemeinsamen Vorfahren von *S. bongori* und den *S. enterica*-Subspezies bereits vorhanden waren, ist davon auszugehen, daß dieser bereits die Fähigkeit zur Wirtszellinvasion besessen hat. Während der Aufspaltung von *Salmonella* spp. in *S. bongori* und in die verschiedenen *S. enterica*-Subspezies und der dabei parallel verlaufenden Anpassung an neue Wirte, hat sich das Effektorproteinrepertoire durch variabel vorkommende Effektoren (SopE; eventuell auch AvrA) erweitert. Dies könnte aufgrund verschiedener genetischer Mechanismen, wie z.B. die Genduplikation oder den horizontalen Erwerb komplett neuartiger Effektorproteine, geschehen sein. Die modulare Organisation dieser Virulenzfunktion, d.h. die Möglichkeit mit Hilfe eines konservierten Typ-III-Sekretionsmoduls variabel vorkommende Effektorproteine in die Wirtszelle zu schleusen, mag eine entscheidende Triebfeder für die Evolution von *Salmonella* spp. gewesen sein. Sie erlaubt es, durch Neukombinationen der Effektorproteine schnell und flexibel auf neue Umweltbedingungen reagieren zu können bzw. sich an neue Wirte anzupassen. Diese Flexibilität kann möglicherweise auch eine Rolle in der Entstehung immer neuer Epidemiestämme spielen, die auch heute noch beobachtet wird.

5.2 Das Konzept der Pathogenitätsinsel und der „Selfish“-Operontheorie

Lawrence diskutierte 1996 die „Selfish“-Operontheorie. Mit diesem Modell sollte der Zusammenschluß von Genen, die nur gemeinsam einen bestimmten Phänotyp hervorrufen können, zu einem Operon erklärt werden. Dabei wird ein Operon als eine Gruppe kotranskribierter Gene definiert, die typischerweise eine einzige metabolische Funktion betreffen. Nach dieser Theorie ist der horizontale Gentransfer selbst die treibende Kraft, die zur Bildung von Gengruppen funktionell voneinander abhängiger Gene führt. Die physikalische Nachbarschaft dieser Gene bringt zwar keinen selektiven Vorteil für den Organismus mit sich, aber es erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß diese Gene nicht nur vertikal vererbt werden, sondern auch erfolgreich in neue Bakterienspezies über den horizontalen Weg übertragen werden können. Eine Pathogenitätsinsel kann als Spezialfall eines „Selfish“-Operons angesehen werden.

Der Begriff der Pathogenitätsinsel wurde eingeführt, um in uropathogenen *E. coli* zwei große, stabile chromosomale Bereiche, die für eine Reihe von Virulenzgenen kodieren, zu umschreiben (Hacker *et al.*, 1983; Knapp *et al.*, 1995). Eine genaue Definition der Pathogenitätsinsel wurde später von Hacker *et al.* (1997) geprägt. Pathogenitätsinseln stellen demnach Sequenzabschnitte dar, die nicht in apathogenen Bakterien gefunden werden. Die entsprechenden pathogenen Bakterien haben diese Sequenzabschnitte über horizontalen Transfer erworben. Sie besitzen oft einen unterschiedlichen G+C-Gehalt und sind meist in tRNS-Gene integriert. Pathogenitätsinseln müssen nicht stabil im Chromosom der Wirtsbakterie integriert sein. Sie besitzen jedoch ein Virulenzgen bzw. eine Gruppe von Genen, die eine funktionelle Einheit bilden. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, daß die Übertragung einer Pathogenitätsinsel in ein nahe verwandtes, apathogenes Bakterium die entsprechenden Virulenzeigenschaften verleiht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß dieses Inselkonzept bei *Salmonella* spp. erweitert werden muss. SPI1 und die außerhalb von SPI1 kodierten Effektoren SopB, SopE2 und SopE bilden eine Invasion-vermittelnde, funktionelle Einheit, das „Invasionsvirulon“. Es handelt sich dabei nicht um eine klassische Pathogenitätsinsel, da nicht alle beteiligten Proteine auf einem genetischen Element kodiert sind. Allerdings weist die SPI1 allein viele Merkmale einer Pathogenitätsinsel auf. Alle für die Translokation benötigten Apparategene sind auf der Insel kodiert und mögen wie in der „Selfish“-Operontheorie gefordert als eine funktionelle Einheit zusammengefaßt worden sein. Dieses „Operon“ wird jedoch funktionell durch Effektorproteine erweitert, die nicht auf der SPI1 kodiert sind. Möglicherweise ist der Zeitraum der seit dem Erwerb dieser Effektorproteingene verstrichen ist, zu kurz, um eine Zusammenlagerung mit SPI1 zu erreichen. Im Gegensatz zu den konservierten Effektorproteinen stehen die variabel verteilten, adaptiven Effektoren (*sopE* und *avrA*) wahrscheinlich unter keinem selektiven Druck, mit der Insel zu verschmelzen. Dadurch bleiben diese Effektorproteine frei kombinierbar, um über das konservierte Translokationsmodul in die Wirtszelle geschleust zu werden. Somit bleiben die *Salmonella* spp. höchst flexibel und anpassungsfähig. Bei *Shigella* spp., deren Typ-III-Sekretionssystem dem der *Salmonella* spp. sehr ähnlich ist, sind allerdings sämtliche für die Wirtszellinvasion benötigten Gene auf einem großen Plasmid zusammengefaßt. Dies deutet daraufhin, daß es sich bei der Organisation in *Salmonella* spp., im Sinne der „Selfish“-Operontheorie, um eine evolutionäre „Sackgasse“ handeln könnte. Die Übertragung eines vollständigen Invasion-vermittelnden Systems scheint bei *Shigella* spp. viel wahrscheinlicher.

5.3 Horizontaler Transfer von *sopE* durch lysogene Konversion mit SopE Φ

Die variable Verteilung von *sopE* in der SARC- und SARA-Referenzstammsammlung sowie in einer repräsentativen Sammlung von Patientenisolaten weist darauf hin, daß *sopE* auch in neuerer Zeit mit einer gewissen Frequenz horizontal transferiert wird (diese Arbeit; Hardt *et al.*, 1998a). Aus einem Typhimurium Patientenisolat (DT204, 3351/78) konnte SopE Φ induziert werden. Dieser Bakteriophage trägt *sopE* in der Schwanz- und Schwanzfaserregion seines Genoms. SopE Φ konnte sowohl aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften als auch über vollständige Restriktionskartierung und Southernhybridisierung der P2-Bakteriophagenfamilie zugeteilt werden. Southernhybridisierungsanalysen zeigten, daß alle natürlich vorkommenden *sopE*-tragenden Typhimurium-Stämme SopE Φ -Lysogene sind.

Ein Derivat von SopE Φ , das eine *aphT*-Kassette trägt, konnte durch lysogene Konversion den Resistenzmarker in verschiedene Typhimurium-Stämme und Stämme verschiedener anderer *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare übertragen. Diese Daten unterstreichen, daß die lysogene Konversion mit SopE Φ einen Mechanismus für den horizontalen Transfer von *sopE* zwischen verschiedenen *S. enterica*-Stämmen darstellt.

Von *Salmonella* spp. ist bekannt, daß sie eine Vielzahl von Bakteriophagen beherbergen können. Die meisten dieser Phagen gehören zur P22-Familie und können bakterielle Gene durch Transduktion horizontal transferieren (Schicklmaier und Schmieger, 1995; Schicklmaier *et al.*, 1998). Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob diese Bakteriophagen möglicherweise auch Faktoren in ihrem Genom kodieren, welche die Virulenz von *Salmonella* spp. modulieren können. Bisher liegen lediglich Daten zur Änderung der Lipopolysaccharidexpression durch ϵ -Phagen vor (Popoff, 1997). Interessanterweise sind in letzter Zeit mehrere virulenzassoziierte Gene in engem Verbund mit Phagen-ähnlichen Sequenzen gefunden worden (Farrant *et al.*, 1997; De Groote *et al.*, 1997; Conner *et al.*, 1998; Figueroa-Bossi und Bossi, 1999) und es konnten drei λ -ähnliche Phagen aus Typhimurium-Stämmen induziert werden, die Virulenzgene in ihrem Genom tragen (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001).

5.4 Lysogene Konversion mit SopE Φ moduliert die Virulenz von *Salmonella*-Stämmen

Im Vergleich zu anderen gut untersuchten Toxin-konvertierenden Bakteriophagen (Cheetham und Katz, 1995; Waldor und Mekalanos, 1996; Nakayama *et al.*, 1999), die einen starken Einfluß auf die Virulenz ihres Wirtsbakteriums haben, sind die Effekte von SopE Φ eher gering. Die Inaktivierung von *sopE* in Typhimurium SL1344 bewirkte beispielsweise in einem Zellkulturinvasions-Experiment lediglich eine zweifache Reduktion der Invasivität (Hardt *et al.*, 1998a). Allerdings war es auffällig, daß die meisten SopE Φ -lysogenen Typhimurium-Patientenisolat zu den Epidemiestämmen DT49, DT204 und DT204c gehören, die in den 70er und 80er Jahren in Großbritannien und Deutschland eine lang andauernde Epidemie ausgelöst haben (Kühn *et al.*, 1982; Threlfall *et al.*, 1978a; Threlfall *et al.*, 1978b; Wray *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu anderen *S. enterica*-Subspezies-I-Stämmen, die anfangs der 70er Jahre sehr stark in der Nutztierpopulation verbreitet waren, konnten diese Stämme für einen längeren Zeitraum persistieren und verursachten in dieser Zeit einen hohen Prozentsatz an Infektionen bei Rindern und Menschen (Abbildung 37; Kühn *et al.*, 1982; Threlfall *et al.*, 1978a; Threlfall *et al.*, 1978b; Wray *et al.*, 1998; Rabsch, persönliche Mitteilung).

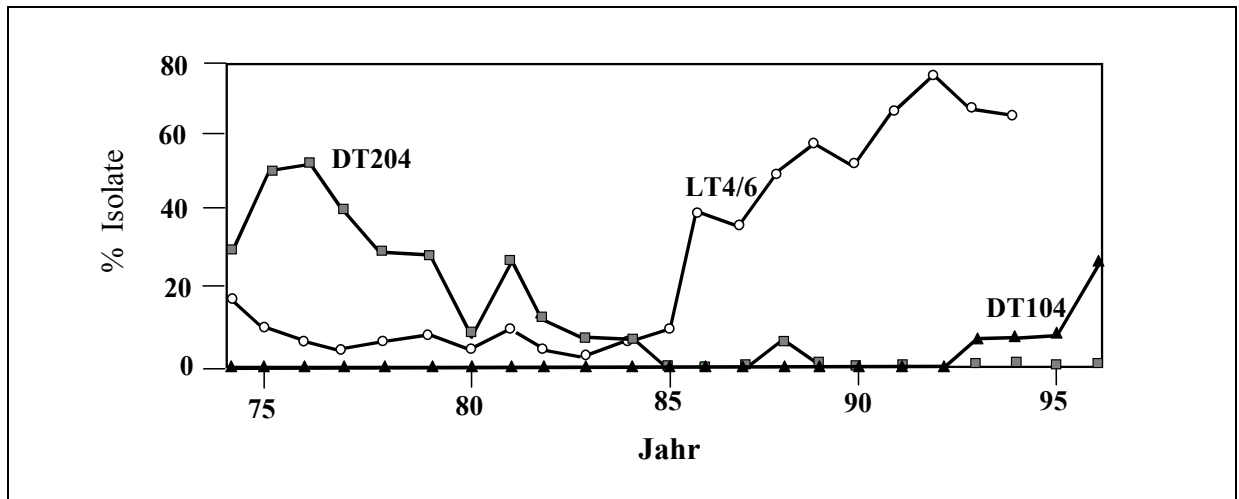


Abbildung 37: Vorkommen von Typhimurium DT204, DT104 und Enteritidis LT4/6 beim Menschen (Schema von Dr. W. Rabsch, RKI, Wernigerode). Diese auch in der Nutzviehpopulation stark verbreiteten Stämme konnten für einen längeren Zeitraum persistieren und verursachten im Beobachtungszeitraum von 1975-1995 einen hohen Prozentsatz an den humanen Salmonellosen.

Die Infektion eines Rindes mit DT204-Stämmen ist von schwerem Durchfall und der daraus folgenden starken Dehydrierung begleitet. Die Infektion verlief zum Teil tödlich (Threlfall *et al.*, 1978b). Basierend auf diesen Beobachtungen kann spekuliert werden, daß die lysogene Konversion mit SopE Φ einen der Faktoren darstellt, die zur Entstehung dieses Epidemiestammes beigetragen haben. Diese Hypothese wurde experimentell bestätigt.

Zu diesem Zweck wurde ein neues Derivat von SopE Φ (SopE Φ^{aphT}) hergestellt, das neben einem funktionellen *sopE*-Gen zusätzlich eine 1,3 kb *aphT*-Kassette trägt. Dieser Phage wurde für die Lysogenisierung des Typhimurium-Stammes ATCC14028s eingesetzt. ATCC14028s ist ein Isolat aus der „American Type Culture Collection (ATCC)“, das ein *sopE2*-Gen aber kein *sopE*-Gen trägt. In Zellkulturinvasions-Experimenten („*in vitro*“, diese Arbeit) aber auch über Rinderinfektionsversuche („*in vivo*“, Kollaboration mit Prof. A. Bäumler, University of Texas) konnte gezeigt werden, daß die lysogene Konversion mit SopE Φ^{aphT} die Virulenz eines voll virulenten Typhimuriumstammes weiter erhöhen kann. Im Rindermodell lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf der Durchfallssymptomatik (Einstrom von Flüssigkeit in das Darmlumen). Bezüglich dieses Phänotyps konnte man beim SopE Φ^{aphT} -Lysogen eine geringe, jedoch signifikante Steigerung der Virulenz messen (Zhang, zur Publikation eingereicht). Möglicherweise kann diese geringe Steigerung der Virulenz aber bereits einen entscheidenden selektiven Vorteil darstellen, der dazu führen kann, daß sich dieser Stamm gegenüber anderen Typhimurium-Stämmen während der Zirkulation von Typhimurium-Stämmen im Rinderreservoir durchsetzen kann.

Es sollte hervorgehoben werden, daß die lysogene Konversion mit SopE Φ nicht den einzigen Faktor darstellt, der das Auftreten neuer epidemiologisch dominanter Stämme fördert. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß der heutzutage dominierende Typhimurium DT104-Stamm (Threlfall *et al.*, 1994) kein SopE Φ -Lysogen ist und auch kein *sopE*-Gen trägt (7 Stämme wurden analysiert). Der epidemiologische Erfolg von DT104 liegt wohl eher in seiner multiplen Antibiotikaresistenz begründet (Threlfall *et al.*, 1994).

Abschließend kann festgestellt werden, daß die lysogene Konversion von Typhimurium mit SopE Φ , sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im Kalb einen meßbaren Anstieg der Virulenz zur Folge hat. Es können wahrscheinlich auch eine ganze Reihe weiterer Faktoren (unter anderem der Erwerb von Genen, die Resistenz gegen bestimmte Antibiotika vermitteln) eine Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, daß der Erwerb günstiger Kombi-

nationen von Effektorproteingenen einen wichtigen Faktor bei der Entstehung neuer Epidemiestämme sein kann.

5.5 Charakterisierung der SopEΦ-Integrationsstelle

SopEΦ kann verschiedene *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare lysogenisieren. Dabei war auffällig, daß SopEΦ immer in dieselbe chromosomale Region integrierte. Die bakterielle „Attachment“-Stelle (*attB*) für SopEΦ konnte am 3'-Ende von *ssrA*, dem Gen für die kleine stabile tmRNS, kartiert werden. 25 der 27 Nukleotide, die in der 3'-*ssrA*-Region von *E. coli* K12 liegen, sind identisch zu der *attB*-„Core“-Sequenz für SopEΦ (Genbank NC000913). *SsrA* konnte bereits als Integrationsstelle von VPIΦ, einem filamentösen Bakteriophagen aus *Vibrio cholerae*, der für das Tcp-Adhäsion kodiert (Karaolis *et al.*, 1999) und vom P4-ähnlichen kryptischen Phagen CP4-57 aus *E. coli* K12 (Kirby *et al.*, 1994) identifiziert werden. Außerdem liegt eine Pathogenitätsinsel in *Dichelobacter nodosus* in der *ssrA*-Region (Haring *et al.*, 1995). *SsrA* scheint, wie tmRNS-Gene als Integrationsstelle für Pathogenitätsinseln und Bakteriophagen zu dienen (Cheetham und Katz, 1995; Hacker und Kaper, 1999).

Stromabwärts von *ssrA* wurde eine Integrase mit Homologien zu Integrasen der P4-ähnlichen Bakteriophagen gefunden. Interessanterweise ist die *attB*-Sequenz in Bezug auf die Genorganisation als auch auf Sequenzebene sehr ähnlich zu dem linken Ende, *attL*, des kryptischen Bakteriophagen CP4-57, der in der 3'-*ssrA*-Region von *E. coli* K12 liegt (Kirby *et al.*, 1994; Retallack *et al.*, 1994). 22 Nukleotide der *attL* „Attachment“-Stelle von CP4-57 (Genbank U03737) sind identisch zu *attB* von SopEΦ. SopEΦ scheint somit also in die *attL*-Sequenz eines anderen (kryptischen, P4-ähnlichen, Pro-) Phagen zu integrieren.

Sequenzvergleiche zwischen *attL*, *attR* und *attB* von SopEΦ haben gezeigt, daß die *attP*-Kernsequenz von SopEΦ vier Mutationen im Vergleich zur bakteriellen *attB*-Kernsequenz aufweist. Diese Mutationen sind nicht ungewöhnlich. Sequenzunterschiede zwischen der *attL*- und der *attR*-Kernsequenz wurden schon bei P2-Prophagen beschrieben, die in alternative Stellen des *E. coli*-Chromosoms integriert sind (Barriero und Haggard-Ljungquist, 1992). Bei P2-Phagen scheinen somit die Anforderungen an die Sequenzidentität zwischen der Phagen-*attP*-Kernsequenz und der bakteriellen *attB*-Stelle reduziert zu sein, sodaß es selbst bei kleineren Sequenzvariationen noch zur Integration kommen kann.

5.6 Der SopEΦ-ähnliche Bakteriophage SopEΦ-Ty in Typhi

Neben dem P2-ähnlichen Bakteriophagen SopEΦ in Typhimurium konnte SopEΦ-Ty, ein zweiter P2-ähnlicher Bakteriophage, in Typhi identifiziert werden. Dazu standen eigene Sequenzdaten aus der Schwanz- und Schwanzfaserregion von Typhi X3744 zur Verfügung, mit deren Hilfe ein größerer chromosomaler Bereich in der Datenbank des Typhi CT18 Genomsequenzierungsprojekts (Sanger Center, England) identifiziert werden konnte. Dieser Bereich enthält das komplette Genom eines *sopE*-tragenden, P2-ähnlichen Bakteriophagen (SopEΦ-Ty).

Die *attR* und *attL*-Regionen dieses Bakteriophagen wurden mit den klonierten und sequenzierten „Randbereichen“ von SopEΦ aus Typhimurium 3351/78 verglichen. Es wurden Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede festgestellt. So kodiert der Prophage SopEΦ-Ty am rechten Ende einen zusätzlichen offenen Leserahmen *orf1* stromabwärts von *ogr*. Die linken Enden beider Prophagen unterscheiden sich weitaus stärker. Während SopEΦ einen offenen Leserahmen mit Homologie zu Glykoprotein α (*gpa*) des Bakteriophagen P4 trägt, sind in SopEΦ-Ty die P2-ähnlichen Gene *int* und *cI* zu finden. Außerdem ist am linken Ende von SopEΦ-Ty keine *attL*-Kernsequenz vorhanden, was darauf hinweist, daß dieser Prophage

nicht induzierbar ist. Weitere Untersuchungen der Integrationsstellen zeigten, daß SopE Φ -Ty in das *samAB* UV-Reparaturgen-Operon integriert ist. Auf der rechten Seite konnte nur ein kleines Fragment mit Ähnlichkeiten zu *ssrA* gefunden werden, das durch ein kleines Fragment mit Ähnlichkeiten zum 3'-terminalen Bereich von *samA* gefolgt wird. Diese Organisation läßt vermuten, daß SopE Φ -Ty wahrscheinlich über illegitime Rekombination in das *samA*-Gen integriert wurde.

SopE Φ und SopE Φ -Ty sind demzufolge ähnliche aber unterschiedliche Bakteriophagen und zeigen teilweise einen unterschiedlichen modularen Aufbau. Auf den modularen Aufbau von Bakteriophagen wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

5.7 Transfer von *sopE* zwischen verschiedenen Bakteriophagenfamilien

In dieser Arbeit wird die Arbeitshypothese aufgestellt, daß der horizontale Transfer bestimmter Virulenzfaktoren der Bildung neuer Effektorproteinkombinationen dient und so die Adaptation an neue Wirte oder Umweltbedingungen fördert. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann dieses Konzept sogar erweitert werden. Während *sopE* in Typhi und Typhimurium auf einem P2-ähnlichen Bakteriophagen gefunden wurde, ist dieses Effektorproteingen bei Hadar, Gallinarum, Enteritidis und Dublin in Sequenzen mit Homologie zur Integrase- und Schwanzfaserregion lambdoider Bakteriophagen eingebettet. Dies deutet darauf hin, daß *sopE* zwischen Phagen der P2- und λ -Familie transferiert worden ist.

Der Austausch bestimmter Genbereiche zwischen Bakteriophagen wurde erstmals über Heteroduplexanalysen bei lambdoiden Phagen nachgewiesen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß sich im Bakteriophagen genom homologe gepaarte Segmente mit ungepaarten Genomabschnitten abwechseln (Hershey, 1971; Highton *et al.*, 1990). Szybalski und Szybalski (1974) entwickelten daraufhin die Hypothese, daß der Austausch alleler Sequenzen (= ungepaarte Genomabschnitte) zu der schnellen Evolution von Bakteriophagen beitragen können. Sie bezeichneten diese allelen Sequenzen zum ersten Mal als Modul. Botstein hat die Modultheorie 1980 weiter ausgebaut. Module sind demnach als genetische Elemente definiert, die jeweils eine bestimmte biologische Funktionseinheit bilden. Demnach besteht ein Virus aus einer günstigen Kombination an Modulen, die auf optimale Zusammenarbeit selektioniert werden. Dieser Austausch einer phylogenetisch „alten“ Sammlung an Modulen konnte seither bei verschiedenen Bakteriophagen (auch über Speziesgrenzen hinweg!) nachgewiesen werden (Hershey, 1971; Schicklmaier *et al.*, 1999; Hendrix *et al.*, 1999; Juhala *et al.*, 2000; Brüssow und Desiere, 2001). Dabei wird für den horizontalen Transfer dieser Module entweder homologe Rekombination (Baker *et al.*, 1991; Casjens *et al.*, 1992; Botstein, 1980), die zufällige illegitime Rekombination (Casjens *et al.*, 1992), oder auch auch ortsspezifische Rekombinationsprozesse durch Phagen-kodierte Invertasen (Snyder und Wood, 1989; Sandmeier *et al.*, 1992) vorgeschlagen.

Die Modultheorie wurde von Hendrix wiederum aufgegriffen, um die allgemeine Evolution der Bakteriophagen zu beschreiben (Hendrix *et al.*, 2000). Danach entstanden sogenannte Protoviren, einfache Proteinkapseln, die zufälligerweise DNS einfingen. Die Kapseln erlangten später die Fähigkeit, die Wirtszelle zu verlassen und neue Wirte zu infizieren. Die Aufnahme neuer Funktionen (Module) während der Virusentwicklung erfolgte zunächst über illegitime Rekombination. Später wurden durch selektive Prozesse Verbindungselemente um diese Mosaikelemente herum geschaffen, sodaß homologe Rekombination den weiteren Austausch zwischen verschiedenen Phagen vermitteln konnte.

Auch heute noch findet die Aufnahme neuer funktionstragender Elemente, die einen Selektionsvorteil bieten, statt. Diese neuen Module werden als Morons („more“ DNA) bezeichnet und sind in ihrer Expression autonom von der Phagenregulation. *SopE* wird von einem sol-

chen Moron kodiert, das sowohl einen autonomen Promotor (Darwin und Miller, 2001) und wahrscheinlich auch durch einen Rho-unabhängigen Terminator kodiert (diese Arbeit). Während des SopE-Morontransfers zwischen lambdoiden- und P2-ähnlichen Phagen müssen zwei Rekombinationsereignisse stattgefunden haben. Sequenzvergleiche zeigen, daß die SopE-Morons von kurzen Sequenzabschnitten unterschiedlicher Homologie flankiert sind. Dies weist daraufhin, daß homologe Rekombinationsprozesse beim Transfer des SopE-Morons eine wichtige Rolle gespielt haben.

Läßt sich vermuten, zwischen welchen Phagen der Transfer des SopE-Morons ursprünglich stattgefunden hat? Die Sequenzen niederer Homologie am rechten Ende des SopE-Morons zeigen Ähnlichkeiten zu Genen der Phagen P2 und λ . Am linken Rand des SopE-Morons lassen sich solche Ähnlichkeiten zu Phage P2 und λ nicht feststellen. Allerdings wurde kürzlich ein λ -ähnlicher Phage (Gifsy-1) beschrieben, in dessen Schwanzfaserassemblierungsregion ein Gen (*gogD*) liegt, das von kurzen Sequenzabschnitten mit Ähnlichkeit zu den SopE-Moron-flankierenden Sequenzen umgrenzt wird. Vermutlich sind diese homologen Sequenzen zu kurz und auch der Grad der Homologie zu niedrig, um einen effizienten Austausch der *gogD*-Kassette gegen das SopE-Moron zu gewährleisten. Doch diese Beobachtung weist daraufhin, daß es Phagen gibt bzw. gegeben hat, die größere Bereiche mit ausgeprägter Homologie zu den *sopE*-flankierenden Bereichen aufweisen. Es ist zu vermuten, daß solche Phagen ursprünglich am Transfer des SopE-Morons zwischen P2-ähnlichen und lambdoiden Phagen beteiligt waren.

5.8 Rolle der Phagen für die Evolution der pathogenen Eigenschaften von *Salmonella* spp.

Von anderen Arbeitsgruppen wurden kürzlich weitere Gene für SPI2-abhängig translozierte Effektorproteine (*SspH2*, *SseI* und *GogB*) sowie weitere mögliche Virulenzfaktoren (*GtgA*; *GogA*, *GipA*, *NanH*) identifiziert, die auf temperenten Bakteriophagen kodiert sind oder von Phagen-ähnlichen Sequenzen flankiert sind (Miao *et al.*, 1999; Miao und Miller, 2000; Figueroa-Bossi *et al.*, 2001; Ali und Pallen, 1998). Die Umgebung eines dieser Gene, *sseI*, ist auffallend ähnlich organisiert wie die Umgebung des SopE-Morons in Gallinarum, Hadar, Enteritidis und Dublin. Berücksichtigt man die modulare Natur der Phagen Genome und die hohe Frequenz des Modulaustausches zwischen verschiedenen Bakteriophagen (Botstein 1980; Campbell, 1988; Schmieger, 1999; Schicklmaier *et al.*, 1999), dann scheint es naheliegend zu sein, daß Morons auch zwischen anderen Bakteriophagenfamilien transferiert werden.

Die Zahl der potentiell lysogenisierbaren Stämme ist unter anderem durch die Superinfektionssimmunität oder durch das Vorhandensein freier Phagenintegrationsstellen limitiert. So wird verhindert, daß zwei Bakteriophagen der gleichen Art ein Bakterium lysogenisieren können (Susskind und Botstein, 1980). Ist beispielsweise bereits ein P2-ähnlicher Prophage im Chromosom von *Salmonella* spp. integriert, so kann SopE Φ dieses Bakterium nicht mehr effizient infizieren. Durch den Transfer der *sopE*-Kassette in eine andere Bakteriophagenklasse, können diese Einschränkungen umgangen werden. Tatsächlich ist bekannt, daß *Salmonella* spp. eine Vielzahl von temperenten und kryptischen Bakteriophagen in ihrem Chromosom besitzen können. Bis zu 3 verschiedene Bakteriophagen können in einem *Salmonella*-Stamm induziert werden (Schmieger, persönliche Mitteilung) und sechs verschiedene P2- und λ -ähnliche Bakteriophagen sind aus verschiedenen Typhimurium-Stämmen isoliert und charakterisiert worden (diese Arbeit; Figueroa-Bossi und Bossi, 1999; Figueroa-Bossi *et al.*, 2001; Affolter, 1983).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *S. bongori* und *S. enterica* neben dem konservierten SPI1-Typ-III-Translokationsapparat konservierte Effektorproteine besitzen, die sowohl

innerhalb als auch außerhalb der Insel kodiert sind. Zusätzlich sind variable Effektorproteingene identifiziert worden (*sopE*; *avrA*). Es wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß Neukombinationen solcher Virulenzfaktoren durch lysogene Konversion entstehen können. So entstehen *S. enterica*-Stämme mit einem neuen Effektorproteinrepertoire, das der Adaptation von *S. enterica* an neue Wirte oder Umweltbedingungen dienen kann. Es ist anzunehmen, daß die Neukombination dieser Typ-III-Effektorproteine auch dazu beiträgt, daß neue epidemische Klone entstehen können. Dieses Konzept konnte nun erweitert werden. Neben der lysogenen Konversion stellt der Austausch von Morons zwischen Bakteriophagen möglicherweise einen wichtigen Mechanismus dar, um die Gene der Effektorproteine in *S. enterica*-Stämmen kombinieren zu können. Somit kann das Effektorproteinrepertoire höchst flexibel gestaltet werden. Dies mag dazu beitragen, daß *S. enterica*-Stämme ein äußerst breites Spektrum von Wirten infizieren können und daß neue Epidemieklone mit höherer Frequenz entstehen können.

6 Zusammenfassung

Salmonellosen gehören weltweit zu den drei häufigsten registrierten, lebensmittelbedingten bakteriellen Darmerkrankungen. Dabei sind bestimmte *S. enterica*-Subspezies-I-Serovare an einen speziellen Wirt adaptiert, andere Serovare zeigen hingegen ein breites Wirtsspektrum. Der Krankheitsverlauf einer Salmonellose wird aber auch von der Spezies des infizierten Wirtes bestimmt. Je nach infiziertem Wirt können beispielsweise milde bis akute Enterocolitis, aber auch schwere systemische Infektionen beobachtet werden.

Um sich im Laufe ihrer Evolution optimal an ihre Wirte anzupassen, haben *Salmonella* spp. nach der Abspaltung vom kommensalen *E. coli* schrittweise neue Virulenzeigenschaften erworben. Dies geschah vor allem über horizontalen Gentransfer (Ochman und Moran, 2001). Im ersten Schritt wurde die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1), später SPI2 erworben. Beide Inseln kodieren jeweils einen Typ-III-Translokationsapparat und dazu gehörende translozierte Effektorproteine, welche die Wirtszellreaktionen zum Vorteil des Pathogens modulieren. Die Inseln sind zu unterschiedlichen Phasen der Salmonellosen aktiv. Das für die Wirtszellinvasion verantwortliche Typ-III-Translokationssystem von SPI1 kann auch Effektoren in die Wirtszellen schleusen, die außerhalb der SPI1 kodiert sind. Der in SPI1 kodierte Translokationsapparat ist in *Salmonella* spp. hoch konserviert (Li *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der translozierten Effektorproteine bei der Evolution von *Salmonella* spp. hin zu tierpathogenen Erregern untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die meisten SPI1-abhängig translozierten Effektoren (SipA, SipB, SipC, SptP, SopB, SopD und SopE2), ob innerhalb oder außerhalb von SPI1 kodiert, ebenfalls hoch konserviert vorliegen. Phylogenetische Analysen zeigten, daß diese konservierten Effektoren früh in der *Salmonella*-Entwicklung, nämlich zwischen 50 und 160 Millionen Jahren (im Zeitrahmen der SPI1-Aufnahme), akquiriert wurden. So handelt es sich hierbei um Faktoren mit einer basalen bzw. zentralen Virulenzfunktion, die *Salmonella* spp. von kommensalen *Escherichia* spp. unterscheiden.

Es konnte gezeigt, daß die konservierten Effektorproteine SopE2 und SopB maßgeblich an der Wirtszellinvasion beteiligt sind (Miroid *et al.*, 2001). Diese Invasion-vermittelnden Effektoren sind weit entfernt von SPI1, in separaten chromosomalen Loci, kodiert. Diese Beobachtung steht in gewissem Widerspruch zur klassischen Definition der Pathogenitätsinsel. Die invasionsrelevanten Effektoren SopB und SopE2 bilden zusammen mit dem SPI1-Translokationsapparat eine funktionelle Einheit (ein sogenanntes „Invasionsvirulon“), obwohl sie nicht -wie für Pathogenitätsinseln postuliert- auf demselben chromosomalen Element kodiert sind. Zusammen mit den phylogenetischen Daten aus dieser Arbeit, deuten diese Ergebnisse daraufhin, daß der letzte gemeinsame Vorfahre aller heutigen *Salmonella* spp. bereits sämtliche für die Wirtszellinvasion benötigten Effektorproteine kodiert und daß die Modulation der Signaltransduktionswege in der Wirtszelle in *S. bongori* und in sämtlichen *S. enterica*-Subspezies konserviert sind. Es wird vielmehr ein Translokationsmodul durch die SPI1 bereitgestellt, durch das sowohl konservierte als auch variabel vorkommende Effektorproteine in die Wirtszelle geschleust werden können.

Es konnten jedoch auch Variationen festgestellt werden. Die beiden für die Effektorproteine SopE- und AvrA-kodierenden Gene sind variabel in der *Salmonella*-Population verteilt. AvrA ist am Rande der SPI1 kodiert und es wird vermutet, daß es nicht zum Kern der SPI1 gehört. Das variable SopE ist bei Zentisom 60 des *Salmonella*-Chromosoms, abgetrennt von SPI1 (Zentisom 63), kodiert. Das variable Effektorprotein SopE und wahrscheinlich auch AvrA tragen vermutlich als „Adaptationsproteine“ zur Feinmodulation der Wechselwirkung mit dem Wirt bei. Vermutlich existieren noch wesentlich mehr variable Effektorproteine, die zu dieser Feinanpassung beitragen.

In dieser Arbeit wurde weiterhin der horizontale Transfer von *sopE* detailliert untersucht. SopE ist in Typhimurium auf SopE Φ , einem Bakteriophagen der P2-Familie, kodiert. *SopE* ist das erste Effektorprotein, bei dem die horizontale Übertragung über den Mechanismus der lysogenen Konversion nachgewiesen werden konnte. Bisher war bei *Salmonella* spp. nur der Phagen-vermittelte horizontale Transfer durch Transduktion bekannt. Die spezifische Integrationsstelle von SopE Φ in das *Salmonella*-Chromosom wurde näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß SopE Φ in der *attL*-Region eines bereits integrierten kryptischen Prophagen (CP4-57) integriert ist, der seinerseits in *ssrA*, dem Gen für die kleine stabile tmRNS, integriert ist.

Epidemiologische Untersuchungen wiesen zudem darauf hin, daß der Erwerb des *sopE*-Gens durch lysogene Konversion mit SopE Φ einen selektiven Vorteil gegenüber *sopE*-negativen Typhimurium-Stämmen darstellen. *SopE*-tragende *S. enterica*-Subspezies-I-Serovar Typhimurium-Stämme lösten in den siebziger und achtziger Jahren verstärkt Epidemien aus. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß SopE Φ -Lysogene eine gesteigerte Virulenz aufweisen. Dies wurde sowohl in Zellkulturversuchen (diese Arbeit) als auch in Rinderinfektionsversuchen (Zhang, zur Publikation eingereicht) experimentell nachgewiesen.

Schließlich wurde in dieser Arbeit auf die Koevolution von *Salmonella* spp. und Virulenzfaktor-tragenden Bakteriophagen untersucht. Es wurde festgestellt, daß die genetischen Mechanismen, welche den Modulaustausch zwischen Bakteriophagen vermitteln, auch dazu führen, die Flexibilität der *Salmonella* spp. bezüglich der Wirtsanpassung zu steigern. Dieser Mechanismus stellt möglicherweise für die Bakterien und damit auch für die assoziierten Bakteriophagen einen Selektionsvorteil dar. Es wurde beobachtet, daß der Virulenzfaktor SopE in einigen Serovaren der *S. enterica*-Subspezies-I nicht auf einem P2-ähnlichen sondern auf einem lambdoiden Bakteriophagen kodiert ist. Es konnte demzufolge zum ersten Mal beobachtet werden, daß ein Virulenz-vermittelndes Effektorprotein in dem Genom zweier verschiedener Phagenfamilien kodiert ist und durch diese Phagen möglicherweise horizontal transferiert werden kann. Die ermittelten DNS-Sequenzen um *sopE* lassen vermuten, daß eine konservierte *sopE*-tragende Kasette (oder „Moron“) durch homologe Rekombination zwischen den zwei verschiedenen Bakteriophagenfamilien (P2- und lambdoid) transferiert worden ist. Diese Art des Transfers von Virulenzgen-Modulen zwischen verschiedenen Phagenfamilien erlaubt die flexible Neukombination von Phagen-kodierten Effektorproteinen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß variabel vorkommende translozierte Effektorproteine die Pathogen-Wirt-Beziehung optimieren können. Neukombinationen dieser Effektoren können über horizontalen Transfer hergestellt werden und somit die optimale Anpassung an die jeweiligen Wirte gewährleisten. Dabei spielt der horizontale Transfer von Virulenzgenen über konvertierende Bakteriophagen eine wesentliche Rolle. Günstige Kombinationen von variablen Effektorproteinen sind wahrscheinlich entscheidend an der Entstehung neuer Epidemiestämme beteiligt. Die effizienten horizontalen Transfermechanismen zwischen verschiedenen *Salmonella* spp. als auch zwischen verschiedenen Phagenfamilien tragen so dazu bei, daß *Salmonella* spp. ein äußerst breites Spektrum von Wirten infizieren können und daß neue Epidemiekclone mit höherer Frequenz entstehen können.

7 Abkürzungsverzeichnis

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	LPS	Lipopolysaccharid
Amp	Ampicillin	LT	Lysotyp
<i>att</i>	Phagen- <i>Attachment</i> -Stelle	MLEE	Multi-Locus-Enzymelektrophorese
bp	Basenpaare	MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
Cm	Chloramphenicol	nt	Nukleotid
cs	Zentisom	OD	Optische Dichte
DT	Differenzierungstyp	PAI	Pathogenitätsinsel
EAEC	Enter aggregative <i>Escherichia coli</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
EBU	<i>Evans Blue Uranine</i>	PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
EHEC	Enterohemorrhagische <i>Escherichia coli</i>	pfu	<i>plaque forming units</i> (Plaque bildende Einheiten)
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	SARA	<i>Salmonella</i> -Referenzsammlung A
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	SARB	<i>Salmonella</i> -Referenzsammlung B
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	SARC	<i>Salmonella</i> -Referenzsammlung C
GEF	G-Nukleotidaustauschfaktor	SPI	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	spp.	nur bis auf die Genus-Ebene typisierte Bakterienstämme
kb	Kilobasenpaare	Tet	Tetracyclin
Km	Kanamycin	v/v	Volumen/Volumen
LB	Luria Bertani Medium	w/v	Masse/Volumen
LD50	50 % letale Dosis	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

Internationale Standardabkürzungen wurden nach Empfehlungen der IUBMB verwendet (Eur. J. Biochem. 243: 5-7; 1997).

8 Literaturverzeichnis

- Affolter, M.**, Parent-Vaugeois, C. & Anderson, A. (1983) *Mutat. Res.* 110, 243-62.
- Ali, T. R.** & Pallen, M. J. (1998) *Mol. Microbiol.* 28, 1039-1041.
- Anderson, T. F.** (1960) in *Proceedings of the European regional conference on electronmicroscopy*, Delft, Holland), Vol. 2, pp. 1008-1011.
- Anderson, E. S.**, Ward, L. R., Saxe, M. J. & de Sa, J. D. (1977) *J. Hyg. (Lond)* 78, 297-300.
- Bajaj, V.**, Hwang, C. & Lee, C. A. (1995) *Mol. Microbiol.* 18, 715-27.
- Baker, J.**, Limberger, R., Schneider, S. J. & Campbell, A. (1991) *New. Biol.* 3, 297-308.
- Bakshi, C. S.**, Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (2000) *J. Bacteriol.* 182, 2341-4.
- Barreiro, V.** & Haggard-Ljungquist, E. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 4086-93.
- Bäumler, A. J.**, Tsolis, R. M. & Heffron, F. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 279-83.
- Bäumler, A. J.**, Kusters, J. G., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. (1994) *Infect. Immun.* 62, 1623-30.
- Bäumler, A. J.** (1997) *Trends Microbiol.* 5, 318-22.
- Bäumler, A. J.**, Tsolis, R. M., Ficht, T. A. & Adams, L. G. (1998) *Infect. Immun.* 66, 4579-87.
- Beltran, P.**, Plock, S. A., Smith, N. H., Whittam, T. S., Old, D. C. & Selander, R. K. (1991) *J. Gen. Microbiol.* 137, 601-6.
- Bertani, L. E.** & Six, E. (1988) in *The Bacteriophages*, ed. Calendar, R. (Plenum, New York), Vol. 1, pp. 73-143.
- Bishop A. L.** & Hall, A. (2000) *Biochem. J.* 348, 241-55.
- Blanc-Potard, A. B.** & Groisman, E. A. (1997) *Embo J.* 16, 5376-85.
- Blattner, F. R.**, Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) *Science* 277, 1453-74.
- Bochner, B. R.** (1984) *Biotechniques* 2, 234-240.
- Botstein, D.** (1980) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 354, 484-90.
- Bourne, H. R.**, Sanders, D. A. & McCormick, F. (1990) *Nature* 348, 125-32.
- Boyd, E. F.**, Wang, F. S., Beltran, P., Plock, S. A., Nelson, K. & Selander, R. K. (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139, 1125-32.
- Boyd, E. F.**, Wang, F. S., Whittam, T. S. & Selander, R. K. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 804-8.
- Boyd, E. F.**, Li, J., Ochman, H. & Selander, R. K. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 1985-91.
- Braun, V.** (1995) *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 295-307.
- Brüssow, H.** & Desiere, F. (2001) *Mol. Microbiol.* 39, 213-223.
- Buchmeier, N.**, Bossie, S., Chen, C. Y., Fang, F. C., Guiney, D. G. & Libby, S. J. (1997) *Infect. Immun.* 65, 3725-30.
- Burrows, W.** (1959) *Textbook of microbiology* (The W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA).
- Campbell, A.** (1988) in *The Bacteriophages*, ed. Calendar, R. (Plenum Press, pp. 1-14.
- Campbell, A. M.** (1992) *J. Bacteriol.* 174, 7495-9.
- Casjens, S.**, Hatfull, G. & Hendrix, R. (1992) *Semin. Virol.* 3, 383-397.

- Cheetham, B. F. & Katz, M. E. (1995)** *Mol. Microbiol.* 18, 201-8.
- Chen, L. M., Hobbie, S. & Galan, J. E. (1996)** *Science* 274, 2115-8.
- Cheng, L. W., Anderson, D. M. & Schneewind, O. (1997)** *Mol. Microbiol.* 24, 757-65.
- Collazo, C. M. & Galan, J. E. (1996)** *Infect. Immun.* 64, 3524-31.
- Collazo, C. M. & Galan, J. E. (1997)** *Mol. Microbiol.* 24, 747-56.
- Conner, C. P., Heithoff, D. M., Julio, S. M., Sinsheimer, R. L. & Mahan, M. J. (1998)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 4641-5.
- Crosa, J. H., Brenner, D. J., Ewing, W. H. & Falkow, S. (1973)** *J. Bacteriol.* 115, 30715.
- Darwin, K. H. & Miller, V. L. (2001)** *Embo J.* 20, 1850-62.
- Davies, J. (1996)** *Microbiologia* 12, 9-16.
- De Groote, M. A., Ochsner, U. A., Shiloh, M. U., Nathan, C., McCord, J. M., Dinauer, M. C., Libby, S. J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y. & Fang, F. C. (1997)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 13997-4001.
- Doolittle, R. F., Feng, D. F., Tsang, S., Cho, G. & Little, E. (1996)** *Science* 271, 4707.
- Dreiseikermann, B. (1994)** *Microbiol. Rev.* 58, 293-316.
- Eckmann, L., Kagnoff, M. F. & Fierer, J. (1993)** *Infect. Immun.* 61, 4569-
- Eichelberg, K., Ginocchio, C. C. & Galan, J. E. (1994)** *J. Bacteriol.* 176, 4501-10.
- Eichelberg, K., Hardt, W. D. & Galan, J. E. (1999)** *Mol. Microbiol.* 33, 139-52.
- Eichelberg, K. & Galan, J. E. (1999)** *Infect. Immun.* 67, 4099-105.
- Ewing, W. H. (1986)** *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae* (Elsevier, New York. N. Y.).
- Fang, F. C., Libby, S. J., Buchmeier, N. A., Loewen, P. C., Switala, J., Harwood, J. & Guiney, D. G. (1992)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 11978-82.
- Farrant, J. L., Sansone, A., Canvin, J. R., Pallen, M. J., Langford, P. R., Wallis, T. S., Dougan, G. & Kroll, J. S. (1997)** *Mol. Microbiol.* 25, 785-96.
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. & Heffron, F. (1986)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83, 5189-93.
- Fields, P. I., Groisman, E. A. & Heffron, F. (1989)** *Science* 243, 1059-62
- Figuroa-Bossi, N., Coissac, E., Netter, P. & Bossi, L. (1997)** *Mol. Microbiol.* 25, 161-73.
- Figuroa-Bossi, N. & Bossi, L. (1999)** *Mol. Microbiol.* 33, 167-76.
- Figuroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. & Bossi, L. (2001)** *Mol. Microbiol.* 39, 260-272.
- Fu, Y. & Galan, J. E. (1999)** *Nature* 401, 293-7.
- Galan, J. E. & Curtiss, R., 3rd (1989)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86, 6383-7.
- Galan, J. E. (1999)** *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 46-50.
- Galan, J. E. & Collmer, A. (1999)** *Science* 284, 1322-8.
- Galyov, E. E., Wood, M. W., Rosqvist, R., Mullan, P. B., Watson, P. R., Hedges, S. & Wallis, T. S. (1997)** *Mol. Microbiol.* 25, 903-12.
- Garcia Vescovi, E., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. (1996)** *Cell* 84, 165-74.
- Gericke, B., Claus, H., Voigt, M., Tschäpe, H., Rasch, G., Holler, H. & Wagner, H. (1999)** in *Bundesgesundheitsblatt*, Springer Verlag, Vol. 42, pp. 196-205.
- Germanier, R. & Furer, E. (1971)** *Infect. Immun.* 4, 663-73.
- Groisman, E. A. & Ochman, H. (1993)** *Embo J.* 12, 3779-87.
- Groisman, E. A. & Ochman, H. (1996)** *Cell* 87, 791-4.

- Guan, K. L. & Dixon, J. E. (1991)** *Anal. Biochem.* 192, 262-7.
- Gulig, P. A., Doyle, T. J., Hughes, J. A. & Matsui, H. (1998)** *Infect. Immun.* 66, 2471-85.
- Gunn, J. S., Belden, W. J. & Miller, S. I. (1998)** *Microb. Pathog.* 25, 77-90.
- Hacker, J., Knapp, S. & Goebel, W. (1983)** *J. Bacteriol.* 154, 1145-52.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997)** *Mol. Microbiol.* 23, 1089-97.
- Hacker, J. & Kaper, J. B. (1999)** in *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*, eds. Hacker, J. & Kaper, J. B. (American Society for Microbiology, Washington, D. C.), pp. 1-32.
- Hall, R. M. & Collis, C. M. (1995)** *Mol. Microbiol.* 15, 593-600.
- Hardt, W. D. & Galan, J. E. (1997)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 9887-92.
- Hardt, W. D., Urlaub, H. & Galan, J. E. (1998a)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, -2574-2579.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galan, J. E. (1998b)** *Cell* 93, 815-26.
- Haring, V., Billington, S. J., Wright, C. L., Huggins, A. S., Katz, M. E. & Rood, J. I. (1995)** *Microbiology* 141, 2081-9.
- Hayward, R. D. & Koronakis, V. (1999)** *Embo J.* 18, 4926-34.
- Hayward, R. D., McGhie, E. J. & Koronakis, V. (2000)** *Mol. Microbiol.* 37, 727-39.
- Heller, K. J. (1992)** *Arch. Microbiol.* 158, 235-48.
- Hendrix, R. W., Smith, M. C., Burns, R. N., Ford, M. E. & Hatfull, G. F. (1999)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 2192-7.
- Hendrix, R. W., Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. & Casjens, S. (2000)** *Trends Microbiol.* 8, 504-8.
- Hensel, M. (2000)** *Mol. Microbiol.* 36, 1015-23.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. & Zychlinsky, A. (1999)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 2396-401.
- Hershey, A. D. (1971)** in *Yearbook 1970* (Carnegie Institute Washington, Washington), pp. 3-7.
- Highton, P. J., Chang, Y. & Myers, R. J. (1990)** *Mol. Microbiol.* 4, 1329-40.
- Hobbie, S., Chen, L. M., Davis, R. J. & Galan, J. E. (1997)** *J. Immunol.* 159, 5550-9.
- Hoise, S. K. & Stocker, B. A. (1981)** *Nature* 291, 238-9.
- Hotchin, N. A. & Hall, A. (1996)** *Cancer Surv.* 27, 311-22.
- Hueck, C. J. (1998)** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 379-433.
- Janakiraman, A. & Slauch, J. M. (2000)** *Mol. Microbiol.* 35, 1146-55.
- Jiang, S. C. & Paul, J. H. (1998)** *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2780-7.
- Johnson, K., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Miller, I. & Hormaeche, C. (1991)** *Mol. Microbiol.* 5, 401-7.
- Johnston, C., Pegues, D. A., Hueck, C. J., Lee, A. & Miller, S. I. (1996)** *Mol. Microbiol.* 22, 715-27.
- Jones, M. A., Wood, M. W., Mullan, P. B., Watson, P. R., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (1998)** *Infect. Immun.* 66, 5799-804.
- Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. (2000)** *J. Mol. Biol.* 299, 27-51.
- Karaolis, D. K., Somara, S., Maneval, D. R., Johnson, J. A. & Kaper, J. B. (1999)** *Nature* 399, 375-9.
- Karzai, A. W., Roche, E. D. & Sauer, R. T. (2000)** *Nat. Struct. Biol.* 7, 449-55.

- Keiler, K. C., Waller, P. R. & Sauer, R. T. (1996)** *Science* 271, 990-3.
- Kingsley, R. A. & Baumber, A. J. (2000)** *Mol. Microbiol.* 36, 1006-14.
- Kirby, J. E., Trempy, J. E. & Gottesman, S. (1994)** *J. Bacteriol.* 176, 2068-81.
- Kitts, P. A. & Nash, H. A. (1987)** *Nature* 329, 346-8.
- Klaus, S., Krüger, D. H. & Meyer, J. (1992)** *Bakterienviren* (Gustav Fischer Verlag Jena).
- Knapp, S., Then, I., Wels, W., Michel, G., Tschäpe, H., Hacker, J. & Göbel, W. (1985)** *Mol. Gen. Genet.* 200, 385-92.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Inokuchi, H. (1994)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 9223-7.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. & Aizawa, S. I. (1998)** *Science* 280, 602-5.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. & Galan, J. E. (2000)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 10225-30.
- Kühn, H., Rabsch, W., Tschäpe, H. & Tietze, E. (1982)** *Z. Arztl. Fortbild. (Jena)* 76, 607-10.
- Kühn, H. & Tschäpe H. (1995)** *Salmonellose des Menschen* (RKI-Schriften; MMV Medizin Verlag, München)
- Kukral, A. M., Strauch, K. L., Maurer, R. A. & Miller, C. G. (1987)** *J. Bacteriol.* 169, 1787-1793.
- Kuo, T.-T. & Stocker, B. A. D. (1970)** *Virology* 42, 621-632.
- Kutsukake, K., Minamino, T. & Yokoseki, T. (1994)** *J. Bacteriol.* 176, 7625-9.
- Lämmli, U. K. (1970)** *Nature* 227, 680-5.
- Lan, R. & Reeves, P. R. (1996)** *Mol. Biol. Evol.* 13, 47-55.
- Lawrence, J. G. & Ochman, H. (1997)** *J. Mol. Evol.* 44, 383-97.
- Lawrence, J. G. (1997)** *Trends Microbiol.* 5, 355-9.
- Le Minor, L., Popoff, M. Y., Laurent, B. & Hermant, D. (1986)** *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 137B, 211-7.
- Leclerc, G. J., Tartera, C. & Metcalf, E. S. (1998)** *Infect. Immun.* 66, 682-91.
- Lee, C. A., Silva, M., Siber, A. M., Kelly, A. J., Galyov, E. & McCormick, B. A. (2000)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 12283-8.
- Li, J., Ochman, H., Groisman, E. A., Boyd, E. F., Solomon, F., Nelson, K. & Selander, R. K. (1995)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 7252-6.
- Lindberg, A. A. (1973)** *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 205-41.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (2001)** *Mol. Microbiol.* 39, 520-31.
- Lorenz, M. G. & Wackernagel, W. (1994)** *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
- Luckey, M. & Neilands, J. B. (1976)** *J. Bacteriol.* 127, 1036-7.
- Macnab, R. M. (1996)** in *Escherichia coli and Salmonella*, ed. Neidhardt, F. C. (ASM Press, Washington, D. C.), Vol. 1, pp. 123-45.
- Manoil, C. & Beckwith, J. (1985)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 8129-33.
- Masters, M. (1996)** in *Escherichia coli and Salmonella*, ed. Neidhardt, F. C. (ASM Press, Washington, D. C.), Vol. 2, pp. 2421-2441.
- McCormick, B. A., Colgan, S. P., Delp-Archer, C., Miller, S. I. & Madara, J. L. (1993)** *J. Cell. Biol.* 123, 895-907.
- Mecenas, J. J. & Strauss, E. J. (1996)** *Emerg. Infect. Dis* 2, 270-88.
- Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Bäumlner, A. J. & Miller, S. I. (1999)** *Mol. Microbiol.* 34, 850-64.
- Miao, E. A. & Miller, S. I. (1999)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 9452-54.

- Miao, E. A. & Miller, S. I. (2000)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 7539-44.
- Miller, J. H. (1972)** *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).
- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1988)** *J. Bacteriol.* 170, 2575-83.
- Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. (1989)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5054-58.
- Miller, S. I., Hohmann, E. L. & Pegues, D. A. (1995)** in *Principles and practice of infectious diseases*, eds. Mandell, G. L., Bennett, J. E. & Dolin, R. (Churchill Livingstone, New York, N. Y.), Vol. 2, pp. 2013-2033.
- Mills, D. M., Bajaj, V. & Lee, C. A. (1995)** *Mol. Microbiol.* 15, 749-59.
- Miold, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E. & Hardt, W. D. (1999)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 9845-50.
- Miold, S., Ehrbar, K., Weissmüller, A., Prager, R., Tschäpe, H., Rüssmann, H. & Hardt, W. D. (2001)** *J. Bacteriol.* 183, 2348-2358.
- Monack, D. M., Raupach, B., Hromockyj, A. E. & Falkow, S. (1996)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 9833-8.
- Nakayama, K., Kanaya, S., Ohnishi, M., Terawaki, Y. & Hayashi, T. (1999)** *Mol. Microbiol.* 31, 399-419.
- Nei, M. & Gojobori, T. (1986)** *Mol. Biol. Evol.* 3, 418-26.
- Nelson, K. & Selander, R. K. (1992)** *J. Bacteriol.* 174, 6886-95.
- Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E. & Majerus, P. W. (1998)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 14057-9.
- Ochman, H. & Wilson, A. C. (1987)** *J. Mol. Evol.* 26, 74-86.
- Ochman, H. & Groisman, E. A. (1995)** *Can. J. Microbiol.* 41, 555-61.
- Ochman, H. & Groisman, E. A. (1996)** *Infect. Immun.* 64, 5410-2.
- Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. (2000)** *Nature* 405, 299-304.
- Ochman, H. & Moran, N. A. (2001)** *Science* 292, 1096-9.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J. & McWhorter-Murlin, A. (1992)** *Res. Microbiol.* 143, 807-11.
- Popoff, M. Y. & Le Minor, L. (1992)** *Antigenic formulas of the Salmonella serovars. WHO Collaboration Centre for Reference and Research on Salmonella.* (Institute Pasteur, Paris, France).
- Popoff, M. Y., LeMinor, L. (1997)** *Antigenic Formulas of the Salmonella serovars* (Institut Pasteur, Paris), 7th. Edition.
- Porter, S. B. & Curtiss III, R. (1997)** *Avian Diseases* 41, 45-57.
- Rabsch, W. (1997)** in *38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene"* (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, e. V., Garmisch-Partenkirchen).
- Randall-Hazelbauer, L. & Schwartz, M. (1973)** *J. Bacteriol.* 116, 1436-46.
- Rayssiguier, C., Thaler, D. S. & Radman, M. (1989)** *Nature* 342, 396-401.
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D. & Farmer, J. J., 3rd (1989)** *J. Clin. Microbiol.* 27, 313-20.
- Retallack, D. M., Johnson, L. L. & Friedman, D. I. (1994)** *J. Bacteriol.* 176, 2082-9.
- Rudolph, M. G., Weise, C., Miold, S., Hillenbrand, B., Bader, B., Wittinghofer, A. & Hardt, W. D. (1999)** *J. Biol. Chem.* 274, 30501-9.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M. & Li, L. Y. (1995)** *Microbiol. Rev.* 59, 579-90.

- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Sanderson, K. E.**, Hessel, A. & Stocker, B. A. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella*, ed. Neidhardt, F. C. (ASM Press, Washington, D. C.), Vol. 2, pp. 2496-2503.
- Sanderson, K. E.** (1996) in *Escherichia coli and Salmonella*, ed. Neidhardt, F. C. (ASM Press, Washington, D. C.), Vol. 2, pp. 2406-2412.
- Sandmeier, H.**, Iida, S. & Arber, W. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 3936-44.
- Schesser, K.**, Dukuzumuremyi, J. M., Cilio, C., Borg, S., Wallis, T. S., Pettersson, S. & Galyov, E. E. (2000) *Microb. Pathog.* 28, 59-70.
- Schicklmaier, P.** & Schmieger, H. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1637-40.
- Schicklmaier, P.**, Moser, E., Wieland, T., Rabsch, W. & Schmieger, H. (1998) *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 49-54.
- Schicklmaier, P.**, Wieland, T. & Schmieger, H. (1999) *J. Biotechnol.* 73, 185-94.
- Schmieger, H.** (1972) *Mol. Gen. Genet.* 119, 75-88.
- Schmieger, H.** (1982) *Mol. Gen. Genet.* 187, 516-8.
- Schmieger, H.**, Schicklmaier, P. & Zimmer, A. (1997) *Salmonella and Salmonellosis*, 23-27.
- Schmieger, H.** (1999) *J. Bacteriol.* 181, 1630-5.
- Schwartz, M.** (1975) *J. Mol. Biol.* 99, 185-201.
- Shea, J. E.**, Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2593-7.
- Shen, P.** & Huang, H. V. (1986) *Genetics* 112, 441-57.
- Snyder, M.** & Wood, W. B. (1989) *Genetics* 122, 471-9.
- Stender, S.**, Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Mirolid, S. & Hardt, W. D. (2000) *Mol. Microbiol.* 36, 1206-21.
- Stocker, B. A.**, Hoiseth, S. K. & Smith, B. P. (1983) *Dev. Biol. Stand.* 53, 47-54.
- Susskind, M. M.** & Botstein, D. (1978) *Microbiol. Rev.* 42, 385-413.
- Susskind, M. M.** & Botstein, D. (1980) *Virology* 100, 212-6.
- Szybalski, W.** & Szybalski, E. H. (1974) in *Viruses, Evolution and Cancer* (Academic Press Inc., New York, USA), pp. 563-582.
- Takeuchi, A.** (1967) *Am. J. Pathol.* 50, 109-36.
- Threlfall, E. J.**, Ward, L. R. & Rowe, B. (1978a) *Br. Med. J.* 2, 997.
- Threlfall, E. J.**, Ward, L. R. & Rowe, B. (1978b) *Vet. Rec.* 103, 438-40.
- Threlfall, E. J.**, Frost, J. A., Ward, L. R. & Rowe, B. (1994) *Vet. Rec.* 134, 577.
- Tschäpe, H.** (2000) in *Bundesgesundheitsblatt* (Springer Verlag, Vol. 43, pp. 758-769).
- Tsolis, R. M.**, Baumler, A. J., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 4628-37.
- Tsolis, R. M.**, Baumler, A. J., Heffron, F. & Stojiljkovic, I. (1996) *Infect. Immun.* 64, 4549-56.
- Tsolis, R. M.**, Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G. & Bäumlner, A. J. (1999a) *Infect. Immun.* 67, 6385-93.
- Tsolis, R. M.**, Adams, L. G., Ficht, T. A. & Baumler, A. J. (1999b) *Infect. Immun.* 67, 4879-85.
- Tsolis, R. M.**, Kingsley, R. A., Townsend, S. M., Ficht, T. A., Adams, L. G. & Bäumlner, A. J. (1999c) *Adv. Exp. Med. Biol.* 473, 261-74.
- Vieira, J.** & Messing, J. (1982) *Gene* 19, 259-68.

- Waldor, M. K.** & Mekalanos, J. J. (1996) *Science* 272, 1910-4.
- Wallis, T. S.** & Galyov, E. E. (2000) *Mol. Microbiol.* 36, 997-1005.
- Ward, L. R.**, de Saxe, J. D. & Rowe, B. (1987) *Epidemiol. Infect.* 99, 291-4.
- Weeks, C. R.** & Ferretti, J. J. (1984) *Infect. Immun.* 46, 531-6.
- Weisberg, R. A.** (1996) in *Escherichia coli and Salmonella*, ed. Neidhardt, F. C. (ASM Press, Washington, D. C.), Vol. 1, pp. 1169-1176.
- Wood, M. W.**, Rosqvist, R., Mullan, P. B., Edwards, M. H. & Galyov, E. E. (1996) *Mol. Microbiol.* 22, 327-38.
- Wood, M. W.**, Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (1998) *Mol. Microbiol.* 29, 883-91.
- Wood, M. W.**, Jones, M. A., Watson, P. R., Siber, A. M., McCormick, B. A., Hedges, S., Rosqvist, R., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (2000) *Cell. Microbiol.* 2, 293-303.
- Wray, C.**, McLaren, I. M. & Jones, Y. E. (1998) *J. Med. Microbiol.* 47, 483-7.
- Yu, A.**, Bertani, L. E. & Haggard-Ljungquist, E. (1989) *Gene* 80, 1-11.
- Yu, A.** & Haggard-Ljungquist, E. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 1239-49.
- Zhang, S.**, Santos, R. L., Tsohis, R. M., Miroid, S., Hardt, W.-D., Adams, L. G. & Bäumlner, A. J. (2001), zur Publikation eingereicht.
- Zhou, D.**, Mooseker, M. S. & Galan, J. E. (1999a) *Science* 283, 2092-5.
- Zhou, D.**, Mooseker, M. S. & Galan, J. E. (1999b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 10176-81.
- Zhou, D.**, Hardt, W. D. & Galan, J. E. (1999c) *Infect. Immun.* 67, 1974-81.
- Zhou, D.**, Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B. & Galan, J. E. (2001) *Mol. Microbiol.* 39, 248-260.
- Zinder, N. D.** & Lederberg, J. (1952) *J. Bacteriol.* 64, 679-699.

9 Anhang

9.1 Verteilung der Gene der SPI1-abhängig translozierten Proteine in *Salmonella* spp.

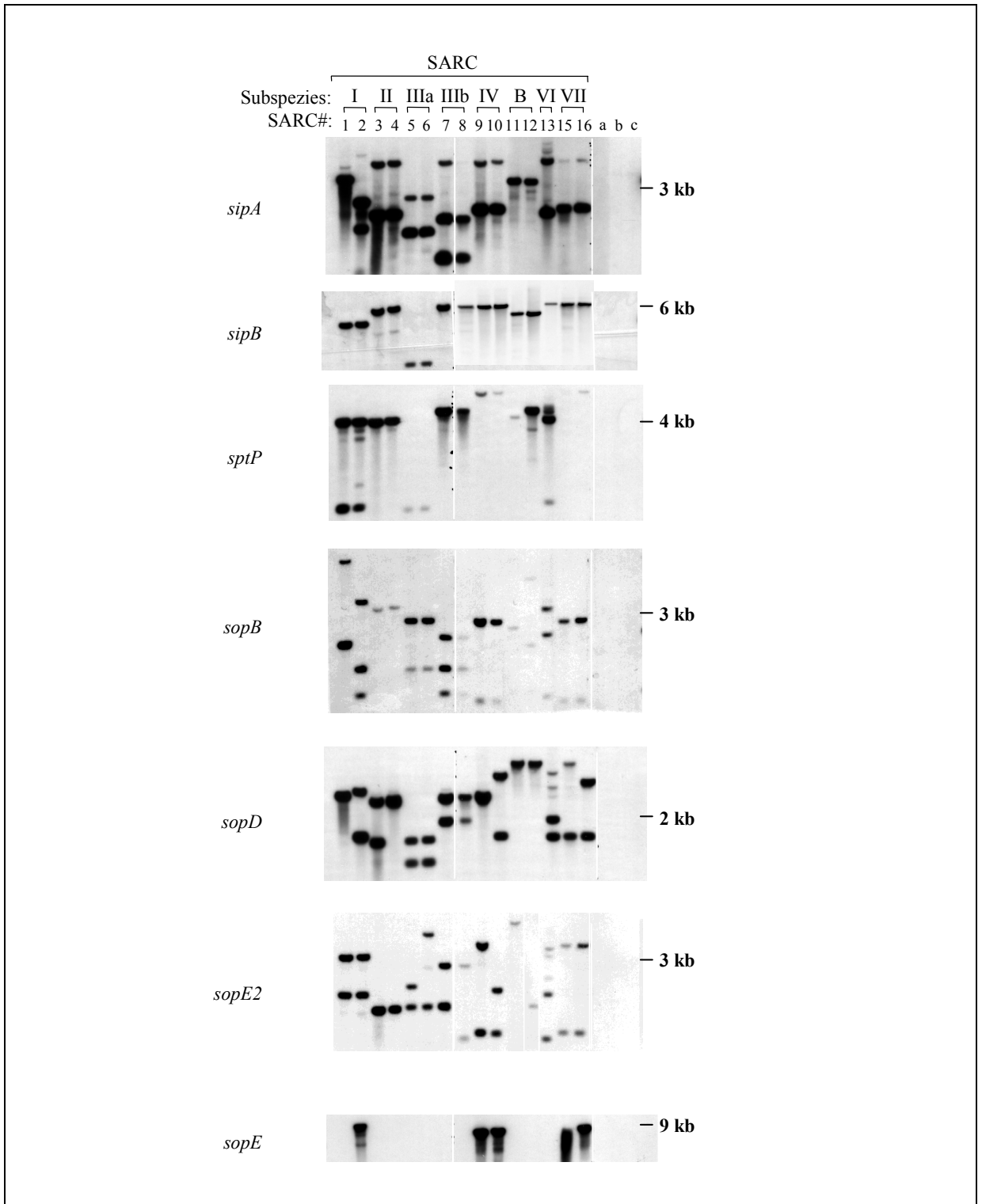


Abbildung 38: Southernhybridisierungsanalyse der Verteilung von *sipA*, *sipB*, *sptP*, *sopB*, *sopD*, *sopE2* und *sopE* innerhalb der SARC-Referenzstammsammlung; Chromosomale DNS wurde mit *EcoRV* gespalten und mit

den jeweiligen Sonden hybridisiert; a: *Yersinia enterocolitica* WA-C (pYV08); b: *Shigella flexneri* S1227; c: *E. coli* 2348/69; B. *S. bongori*.

9.2 Analyse der λ -ähnlichen Sequenzen, die *sopE* in Gallinarum, Hadar und Enteritidis flankieren

Keine der in Kapitel 4.9.1 untersuchten Sequenzen von Enteritidis, Hadar und Gallinarum überspannt die gesamte Länge von 8,3 kb. Daher wurden PCR Analysen angeschlossen, um zu untersuchen, ob der gesamte 8,3 kb Bereich in allen Stämmen (Hadar, Gallinarum, Enteritidis und auch in Dublin (vgl. dazu Abbildung 30) vorhanden ist. PCR-Oligonukleotide, die auf Basis der *orfJ*- und *orfI*-Gene von Hadar konzipiert wurden (pr1 und pr2; Abbildung 30; Tabelle 9, Tabelle 10), ergaben mit der chromosomalen DNS von Stämmen des *S. enterica*-Subspezies-I-Serovars Gallinarum (SARB21, X3796), Hadar (X3230) und Dublin (SARB12, SARB13) ein ungefähr 6 kb großes Produkt (Daten nicht gezeigt). Kein PCR Produkt konnte mit Enteritidis 136/87 und WR1455 erhalten werden. Die PCR-Produkte von Gallinarum, Hadar und Dublin wurden weiterhin mit *HincII* gespalten und in einer Southernanalyse mit einer *sopE*-spezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 39B). Die *sopE* Sonde hybridisierte in allen Fällen mit Restriktionsfragmenten identischer Länge. Dies zeigt zusammenfassend, daß die Regionen stromabwärts von *sopE*, einschließlich *orf194*, *stf* und *orfJ* in Gallinarum, Hadar und Dublin sehr ähnlich sind. Das verkürzte PCR- bzw. 2 kb große *HincII*-Fragment von Gallinarum zwingt jedoch, daß in diesem Stamm ca. 400 nt in der *sopE* stromabwärts gelegenen Region deletiert sind (Abbildung 39A und B).

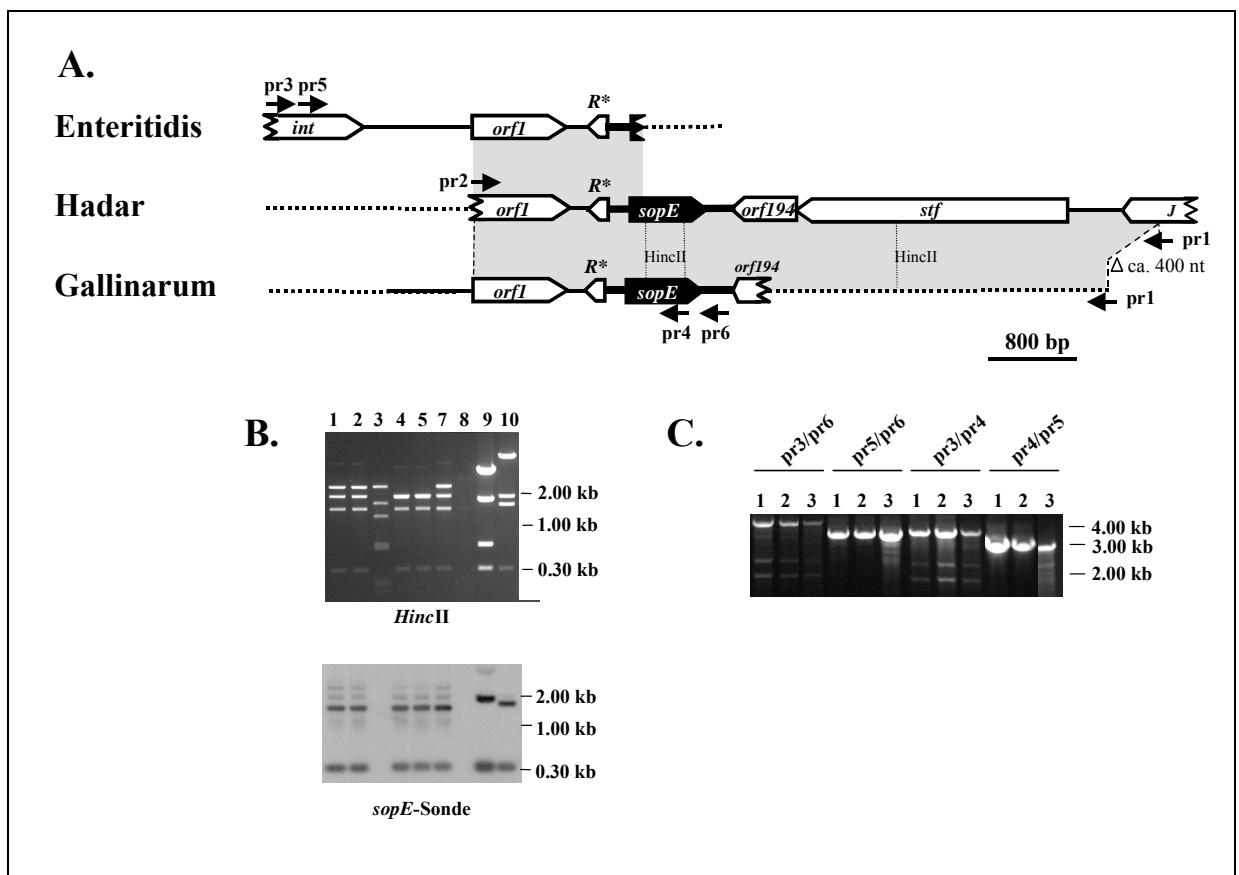


Abbildung 39: A und B: PCR-Analyse der stromabwärts von *sopE* gelegenen Region mit pr1/pr2 und anschließende *sopE*-Southernanalyse *HincII*-gespaltenen PCR-Produkte. (Spuren: 1: SARB12 (Dublin); 2: SARB13 (Dublin); 3: SARB14 (Dublin); 4: SARB21 (Gallinarum); 4: X3796 (Gallinarum); 5: X3230 (Hadar); 8: 3351/78 (Typhimurium) als Kontrolle; 9: pM16 DNS (siehe Abbildung A); 10: pM19 DNS (siehe Abbildung A)). **C:**

PCR-Analyse der stromaufwärts gelegenen, *sopE*-flankierenden Region mit Kombinationen der Oligonukleotide pr3, pr4, pr5 und pr6. (Spuren: 1: 136/87 (Enteritidis, LT2/10); 2: WR1455 (Enteritidis; LT4/6); 3: X3796 (Gallinarum)).

Die *sopE*-stromaufwärts gelegene Region wurde ebenfalls in einer PCR-Analyse mit vier verschiedenen Oligonukleotidkombinationen überprüft (pr3, pr4, pr5, pr6, Abbildung 39C, Tabelle 9, Tabelle 10). Gallinarum X3796 und Enteritidisstämme 136/87 und WR1455 ergaben in allen Oligonukleotidkombinationen PCR-Fragmente der erwarteten Größe (pr3/pr6: 3940 nt; pr5/pr6: 3323 nt; pr3/pr4: 3606 nt; pr4/pr5: 2989 nt). Mit chromosomaler DNS von Hadar X3230 konnte in dieser Analyse kein PCR-Produkt erhalten werden. Es ist unklar, ob dieses negative PCR-Ergebnis aufgrund von Mutationen im Oligonukleotid-Bindebereich aufgetreten ist oder aber eine unterschiedliche Organisation des Chromosoms der *sopE*-stromaufwärts gelegenen Region dafür verantwortlich ist. Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß die *sopE*-Regionen, einschließlich der offenen Leserahmen *int*, *orf1*, *sopE*, *orf194*, *stf* und *orfJ*, der Gruppe II Stämme (Gallinarum, Enteritidis, Hadar und Dublin) sehr ähnlich zueinander sind.

9.3 Die *Salmonella*-Referenzstammsammlung C

Die folgende Tabelle ist aus Boyd *et al.*, 1996 entnommen.

SARC#	Spezies/Subspezies	Quelle	Herkunft	Datum
SARC1	<i>S. enterica</i> /Subspezies I	Mensch	England	1958
SARC2	<i>S. enterica</i> /Subspezies I		Dakar	1988
SARC3	<i>S. enterica</i> /Subspezies II	Mensch	Massachusetts	1985
SARC4	<i>S. enterica</i> /Subspezies II			1964
SARC5	<i>S. enterica</i> /Subspezies IIIa	Schlange	Oregon	1986
SARC6	<i>S. enterica</i> /Subspezies IIIa	Mensch	Kalifornien	1985
SARC7	<i>S. enterica</i> /Subspezies IIIb	Mensch	Oregon	1987
SARC8	<i>S. enterica</i> /Subspezies IIIb	Mensch	Kalifornien	1984
SARC9	<i>S. enterica</i> /Subspezies IV	Tier	Kanalzone	1968
SARC10	<i>S. enterica</i> /Subspezies IV	Mensch	Illinois	1986
SARC11	<i>S. bongori</i>	Frosch		1972
SARC12	<i>S. bongori</i>	Sittich	USA	1976
SARC13	<i>S. enterica</i> /Subspezies VI		Indien	1965
SARC14	<i>S. enterica</i> /Subspezies VI			1978
SARC15	<i>S. enterica</i> /Subspezies VII		Tonga-T1	1964
SARC16	<i>S. enterica</i> /Subspezies VII	Mensch	Florida	1968

10 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. J. Heesemann und Dr. Wolf-Dietrich Hardt bedanken. Wolf, der meine Doktorarbeit über die letzten Jahre mit Rat und Tat betreute, sprühte regelrecht vor neuen Ideen, so daß ich eigentlich nie über den Fortschritt meiner Arbeit bangen mußte.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. V. Müller, der als externer Betreuer dieser Arbeit immer ein offenes Ohr für mich hatte. Es freute mich, einen so engagierten und interessierten Begleiter meiner Arbeit zu haben.

Nicht zu vergessen meine Mitstreiter im Labor. Nachdem ich mit Wolf im Februar 1998 die Laborarbeit im Max von Pettenkofer Institut aufnahm, kamen nach und nach neue Mitarbeiterinnen dazu, so daß wir neben unserem Wolf einen richtigen Hühnerstall formierten. Dabei hatten wir sehr viel Spaß miteinander. Silke Stender zeigte uns neben ihrer Arbeit ihre besten Stunts, die in jeder Verfilmung (wie „Das Labor im Zentrum der Stadt“) Platz gefunden hätten. Andrea Friebel zeigte mir, daß man neben fleißiger Arbeit im Labor auch in der restlichen Zeit noch in vielen Bereichen engagiert sein kann. Kristin Ehrbar hat mir im Labor als „Benchnachbarin“ so oft ausgeholfen und war für jeden Spaß zu haben. Manja Barthel, unsere Super-MTA, hat die Organisation unseres Labors auf Vordermann gebracht und war in ihrem Arbeitseifer kaum zu bremsen. Zu guter letzt wurde unser Hühnerdasein durch Sigi Hapfelmeier gesprengt.

Bei den übrigen Leuten der BAF (bakteriellen Forschung) möchte ich mich genauso recht herzlich bedanken. Alle haben für ein wirklich gutes Institutsklima beigetragen und bei Fragen hatte jeder immer Zeit für den anderen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Cosima Pelludat, die für das Korrigieren dieser Arbeit zur Verfügung stand, obwohl sie in dieser Zeit selbst viel zu tun hatte.

Unseren Mitstreitern Dr. Wolfgang Rabsch und Prof. Tschäpe (Robert Koch Institut, Wernigerode) als auch Dr. Manfred Rohde (GBF, Braunschweig) möchte ich für die fruchtbare Zusammenarbeit danken.

Zum Schluß möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Doris, meinen Freunden und bei meinem Mann Michael bedanken, ohne die das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an Alle.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Susanne Miroid-Mei
Geburtstag 2. Juli 1968
Geburtsort Saarlouis
Familienstand verheiratet

Ausbildung und Beruf

1978-1987 *Staatliches Gymnasium am Stadtgarten Saarlouis*
Allgemeine Hochschulreife

1987-1989 *Lehranstalt zur Ausbildung von Medizinisch Technischen Laboratoriumsassistenten (MTLA) bei den Universitätskliniken, Homburg (Saar)*
Diplom

1989-1991 *Klinisch Mikrobiologisches Labor der Universitätshautklinik Homburg (Saar)*
Berufstätigkeit als MTLA

1992 *Universität Konstanz, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Genetik*
Berufstätigkeit als MTLA

Studium

1991-1996 *Universität Konstanz*
Studium der Biologie; 1993 Vordiplom

1994-1995 *State University of New York at Stony Brook, USA*
Department of Microbiology
Austauschstudium

1995-1996 *State University of New York at Stony Brook, USA*
Department of Microbiology
Externe Diplomarbeit,
Thema: "Creating an Adenovirus Vector System for the Gene Therapy of Hemophilia A"

1996 *Universität Konstanz*
Diplomprüfung

1996-1997 *Universität Zürich, Institut für Molekularbiologie*
Wissenschaftliche Angestellte
Herstellung und Charakterisierung transgener Mauslinien

seit 1998 *Ludwig-Maximilians-Universität München*
Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Bearbeitung der vorliegenden Dissertation