

**Evolution mikrobieller Pathogenität:  
*Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 als Paradigma  
für horizontalen Gentransfer**

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

vorgelegt von  
Imke Hansen-Wester  
aus Bremen

---

Erlangen 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Soll

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Oktober 2002

## Aus dieser Arbeit gingen folgende Publikationen hervor:

1. Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* **3**, 549-559.
2. Hansen-Wester, I., Stecher, B. and Hensel, M. (2002). Type III secretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG. *Infect. Immun.* **70**, 1403-1409.
3. Hansen-Wester, I., Stecher, B. and Hensel, M. (2002). Analyses of the evolutionary distribution of *Salmonella* translocated effectors. *Infect. Immun.* **70**, 1619-1622.
4. Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2002). Genome-based identification of chromosomal regions specific for *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **70**, 2351-2360.
5. Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2002). *Salmonella* Pathogenicity Island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J. Exp. Med.* **195**, 1155-1166.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Salmonella</i> als Krankheitserreger	1
1.1.1	Die Pathogenese von <i>Salmonella</i> -Infektionen	2
1.1.2	Zelluläre Grundlagen der Pathogenese von Salmonellosen	3
1.1.3	Überleben und Replikation von <i>Salmonella</i> innerhalb von Wirtszellen	4
1.2	<i>Salmonella</i> besitzt fünf Pathogenitätsinseln	5
1.3	Typ III-Sekretionssysteme in <i>Salmonella</i>	6
1.4	Die molekulare Struktur von SPI2	9
1.5	Funktion von SPI2 und SPI2-Substratproteinen	10
1.6	TTSS als Paradigma der Evolution von Virulenzfaktoren in Gram-negativen Bakterien	11
1.7	Mechanismen des horizontalen Gentransfers	12
1.8	Wirtsspezifität innerhalb der Gattung <i>Salmonella</i>	14
1.9	Ziel dieser Arbeit	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1	Bakterienstämme und Kulturbedingungen	18
2.1.1	Minimalmedien zur Bakterienanzucht	21
2.1.2	Phagen-Medien	22
2.2	Genetische Methoden	23
2.2.1	DNA-Standardmethoden	23
2.2.2	Erzeugung einer Cosmidbank	23
2.2.3	P22-Transduktion	24
2.2.4	Phagen-Isolierung	24
2.2.5	Amplifikation von DNA durch PCR	25
2.2.6	Deletionen mit dem „One-Step Inactivation System“ (Dat-senko & Wanner, 2000)	28
2.2.7	DNA-Sequenzierungen	29
2.2.8	Southern-Blot-Hybridisierungen	29
2.2.9	Kolonie-Blot	30

2.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	31
2.3.1	Western-Blot-Analyse	31
2.3.1.1	SDS-PAGE	31
2.3.1.2	Protein-Transfer und Immunodetektion	31
2.3.1.3	Entfernung von membrangebundenen Antikörpern	31
2.3.2	Abwasch und Fällung von Protein-Oberflächenstrukturen	32
2.4	Zellkultur	33
2.4.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen und Infektionsversuche	33
2.4.2	Evaluierung der intrazellulären Replikation	33
2.4.3	Detektion von Protein-Translokation durch Immunfluoreszenz	34
2.4.3.1	In Western-Blot und Immunfluoreszenz eingesetzte Primärantikörper	34
2.5	Mausinfektionsmodell	35
2.6	Bioinformatik	36
2.6.1	Datenbankrecherchen und Sequenzabgleiche	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
3.1	Identifizierung <i>Salmonella</i> -spezifischer chromosomaler Regionen	37
3.1.1	Identifizierung neuer <i>Salmonella</i> -spezifischer DNA-Elemente	37
3.1.2	Charakterisierung der neuen tRNA-assozierten genomischen Insertionen in <i>Salmonella</i>	38
3.1.2.1	Die genetische Organisation der tRNA <sup>ProL</sup> -Region	39
3.1.2.2	Die genetische Organisation der tRNA <sup>ArgU</sup> -Region	40
3.1.2.3	Die genetische Organisation der tRNA <sup>ArgW</sup> -Region	41
3.1.2.4	Die genetische Organisation der tRNA <sup>PheU</sup> -Region	43
3.1.3	Die Basenzusammensetzung der neuen tRNA-assozierten Genominsertionen in <i>S. enterica</i> Serovar Typhi	44
3.1.4	Die phylogenetische Verteilung der tRNA-assozierten Genom-Insertionen	45
3.1.5	Insertionsstellen der tRNA-assozierten Elemente	49
3.1.6	Die Rolle der tRNA-assozierten Elemente bei der Virulenz von <i>Salmonella</i>	51

3.2	Unterschiedliche Verteilung von Virulenz-Faktoren als Ursache der Wirtsspezifität von <i>Salmonella</i> spp.?	53
3.2.1	Verbreitung von Virulenz-Determinanten innerhalb der Spezies <i>S. bongori</i>	53
3.2.1.1	Verteilung Virulenz-assoziiierter Gene	53
3.2.2	Verteilung von SPI2-Effektoren innerhalb der Gattung <i>Salmonella</i> als möglicher Hinweis auf Wirtsspezifität	55
3.2.2.1	Genetische Organisation der STE-Loci	56
3.2.2.2	Phylogenetische Verteilung der STE-Gene	58
3.2.2.3	Verteilung der STE-Gene innerhalb von <i>S. enterica</i> Subspezies I	59
3.3	Klonierung und funktioneller Transfer des Virulenz-relevanten Teils von <i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel 2 (SPI2)	61
3.3.1	Versuche zu möglichen DNA-Transfermechanismen innerhalb der Gattung <i>Salmonella</i>	61
3.3.2	Identifikation der Insertionsstelle von SPI2 in verschiedenen <i>Salmonella</i> -Subspezies	62
3.3.2.1	SPI2 ist stabil im Genom von <i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium integriert	63
3.3.3	Klonierung des SPI2-Sekretionssystems	64
3.3.4	Analyse des Wachstums diverser Rezipientenstämme in SPI2-induzierenden Bedingungen	65
3.3.5	Transfer und Regulation der Expression des Cosmid-kodierten SPI2-Sekretionsapparates in SPI2-negativen Wirten	66
3.3.6	Umklonierung der SPI2-Gene von p1-H4 in einen Vektor mit einfacher Kopienzahl	68
3.3.7	Regulation von Genexpression und Sekretion pB6-kodierter SPI2-Proteine in <i>S. bongori</i>	70
3.3.8	Sekretion der Cosmid-kodierten SPI2-Proteine	71
3.3.9	Vermittelt der Transfer von SPI2 die Fähigkeit von <i>S. bongori</i> zur Replikation im Makrophagen?	73
3.3.9.1	Mikroskopische Analyse der intrazellulären Replikation von <i>S. bongori</i> [pB6] in J774.A1-Makrophagen	74
3.3.9.2	Analyse des intrazellulären Überlebens und Replikation von <i>S. bongori</i> [pB6]	75
3.3.10	Suche nach weiteren für die intrazelluläre Replikation relevanten Proteinen außerhalb SPI2	76

---

3.3.11	Translokation von SPI2-Effektorproteinen aus <i>S. bongori</i> in eukaryontische Zielzellen	77
3.3.11.1	Klonierung von <i>sifA</i> und Etablierung in <i>S. bongori</i>	77
3.3.11.2	<i>S. bongori</i> [pB6]-vermittelte SIF-Bildung in Epithelzellen	80
3.3.11.3	Translokation eines STE-Proteins durch den heterolog exprimierten SPI2-Sekretionsapparat	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>89</b>
4.1	Horizontal transferierte Elemente in <i>Salmonella</i>	89
4.2	tRNA-Gene als Ankerpunkte für Pathogenitätsinseln	91
4.3	Gibt die Verteilung von Virulenz-Genen in <i>Salmonella</i> spp. Einen Hinweis auf die Wirtsspezifität?	95
4.4	Kann das SPI2-TTSS den SPI2-Phänotyp im heterologen Wirt vermitteln?	98
4.4.1	Das SPI2-TTSS als heterolog exprimierte Sekretionsmaschine	101
4.5	Das Typ III-Sekretionssystem der SPI2 als Kern eines variablen Virulenzmoduls	104
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	

## Abkürzungen

Amp	Ampicillin
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cfu	„colony-forming units“ (Kolonie-bildende Einheiten)
Cm	Chloramphenicol
Cs	Centisom (1/100 des Gesamtgenoms)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	„Dulbeccos modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-Tetraessigsäure
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FCS	„fetal calf serum“ (Fötale Kälberserum)
GFP	„green fluorescent protein“ (Grün-fluoreszierendes Protein)
HRP	„horse raddish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
i.p.	intraperitoneale (Infektion)
Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani Medium
LD <sub>50</sub>	50% der letalen Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOI	„Multiplicity of infection“ (Quotient aus infizierendem Bakterium und infizierter Wirtszelle)
MOPS	2-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mTn	Mini-Transposon
MW	Molekulargewicht

---

Nal	Nalidixinsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	“phosphate buffered saline” (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	„plaque forming units“ (Plaque-bildende Einheiten)
PMN	polymorphkernigen Leukozyten
p.o.	per os (orale Infektion)
RT	Raumtemperatur
SARA/B/C	<i>Salmonella</i> -Referenzsammlung A, B bzw. C
SDS	“sodium dodecyl sulphate” (Natrium-Dodecylsulfat)
SPI	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel
spp.	Spezies
STE	<i>Salmonella</i> -translozierte Effektoren
STM	“signature-tagged mutagenesis” (Signatur-markierte Mutagenese)
Sm	Streptomycin
TCA	Trichloressigsäure
TTSS	Typ III-Sekretionssystem
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen-Prozent bei Lösungen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent bei Lösungen

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Salmonella* als Krankheitserreger

*Salmonella* spp. sind stäbchenförmige, Gram-negative Enterobakterien, die in Tieren und Menschen häufig unterschiedliche Krankheiten auslösen können. Die Krankheitsbilder reichen dabei von einer mild verlaufenden, selbstlimitierenden Diarrhö bis hin zu schweren systemischen Infektionen wie Typhus. Nach Schätzungen der WHO treten jährlich ca. 16,6 Millionen Fälle von Typhus auf, 600 000 davon mit tödlichem Verlauf. Zusätzlich werden ca. 1,3 Milliarden Fälle von Diarrhö durch nicht-typhöse Salmonellosen verursacht, die im Jahr zu weiteren 3 Millionen Todesfällen führen (Pang *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1998). Insbesondere in Entwicklungsländern Asiens und Afrikas sind Salmonellosen stark verbreitet, jedoch auch in industrialisierten Ländern stellen *Salmonella*-Infektionen ein erhebliches Problem dar. Neben den gesundheitlichen spielen auch die ökonomischen Gesichtspunkte eine wichtige Rolle. So wurden die Kosten für Nahrungsmittel-bedingte Bakterieninfektionen in den USA 1989 von der WHO auf 6,8 Mrd. US-Dollar geschätzt.

Zusätzlich zur klinischen Bedeutung bietet sich *Salmonella* als Modellorganismus zur Studie von Interaktionen zwischen Erreger und Wirt an. *S. enterica* Serovar Typhimurium ist ein molekularbiologisch gut manipulierbarer Organismus, der beim Menschen gastrointestinale Infektionen bewirkt, im Mausmodell jedoch ein Typhusartiges Krankheitsbild hervorruft, was ihn zu einem gut nutzbaren Modellorganismus für Typhus macht.

Eine große Anzahl von Virulenzgenen, die für die Pathogenese von *Salmonella*-Infektionen erforderlich sind, wurden mittlerweile identifiziert (Groisman & Ochman, 1997). Hierzu gehören zwei komplexe Virulenzmodule, durch deren Funktion *Salmonella* mit der Wirtszelle interagiert und Wirtszell-Funktionen modifiziert. Die Fähigkeit zur Invasion nicht-phagozytischer Zellen und das intrazelluläre Überleben und Replizieren sind zwei wichtige Kennzeichen der *Salmonella*-Pathogenese (Abb. 1). Sie werden durch die Funktion von Virulenzgenen vermittelt, die auf sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI) lokalisiert sind und als *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI1 bis SPI5) bezeichnet werden.

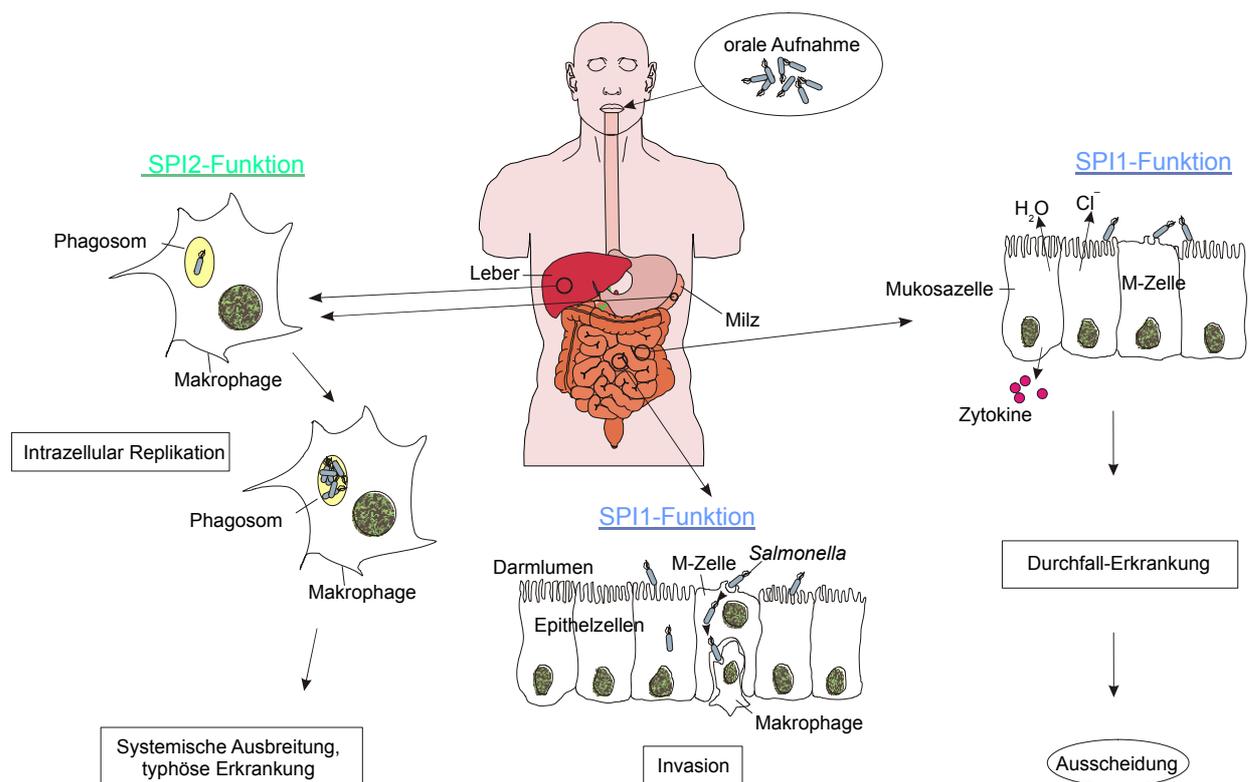


Abb. 1: Schema der Wechselwirkung zwischen Wirt und Erreger während einer *Salmonella*-Infektion.

Die von SPI1 kodierten Proteine sind für die frühe Phase der Salmonellose notwendig, d.h. für den Eintritt von *Salmonella* in nicht-phagozytische Zellen durch Invasion des gastrointestinalen Epithels. Des Weiteren sind SPI1-Proteine für das Auslösen von Durchfällen während einer lokal begrenzten gastrointestinalen Infektion verantwortlich. SPI2-kodierte Proteine sind dagegen zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion notwendig. Sie bewirken die systemische Verbreitung der Erreger und die Kolonisierung von Wirtsorganen wie Milz und Leber. In dieser Phase der Pathogenese spielt SPI2 für das Überleben und Replizieren der Bakterien in phagozytischen Wirtszellen eine bedeutende Rolle.

### 1.1.1 Die Pathogenese von *Salmonella*-Infektionen

Die durch *Salmonella* ausgelösten Krankheitsbilder lassen sich in typhöse und enteritische Salmonellosen unterscheiden. Es bedarf nur einer geringen oralen Infektionsdosis von 100-1000 Bakterien, um typhöse Salmonellosen, die durch die Erreger *S. enterica* Serovar Typhi und *S. enterica* Serovar Paratyphi A, B und C verursacht werden, auszulösen. Im Verlauf einer Typhus- oder Paratyphus-Erkrankung kommt es zu einem Anstieg der Körpertemperatur auf 39-41°C, häufig zusammen mit breiartigen Stuhlentleerungen. Diese Symptome werden von starken Kopfschmerzen begleitet, der Patient befindet sich in einem umnebelten Zustand

(griechisch „typhos“ = Rauch, Nebel). Pneumonien, Myokarditiden und toxische Kreislaufkollapse können zum Tode führen, ebenso wie immunbedingte Nekrosenbildungen, die massive Darmblutungen sowie Perforationsperitonitiden zur Folge haben. Dieses Krankheitsbild manifestiert sich für ungefähr eine Woche. Bei unbehandelten Fällen ist Typhus zu 15% letal, doch auch 1-2% der therapierten Fälle führen zum Tod des Patienten.

Die enteritische Salmonellose wird durch alle *Salmonella*-Stämme außer den zuvor beschriebenen Typhuserregern ausgelöst. Die Infektionsdosis ist mit  $10^5$  Bakterien deutlich höher, da sich die Erreger vor Aufnahme in den Körper schon im Lebensmittel vermehren können. Wenige Stunden bis einige Tage nach der Infektion kommt es zu Brechdurchfällen, kolikartigen Bauchschmerzen oder auch Diarrhö, die häufig von hohem Fieber bis zu  $40^{\circ}\text{C}$  begleitet werden. Nach ungefähr einer Woche ist der Patient wieder beschwerdefrei. In der Regel bleibt die Infektion lokal beschränkt, kann sich jedoch bei abwehrgeschwächten Personen, alten Menschen und Kleinkindern auch ausbreiten und durch Kreislaufversagen zum Tode führen (Hof *et al.*, 2000).

Die bakteriellen Funktionen, die zu diesen unterschiedlichen Krankheitsverläufen führen, sind bisher nicht geklärt.

### 1.1.2 Zelluläre Grundlagen der Pathogenese von Salmonellosen

Als enteroinvasiver Erreger von Lebensmittelinfektionen wird *Salmonella* oral aufgenommen und gelangt mit der Nahrung in den Magen-Darm-Trakt. Im Bereich des Dünndarms werden die Bakterien primär über die Peyer'schen Plaques (lymphatisches Gewebe auf der Dünndarm-Oberfläche) aus dem Darmlumen in das Gewebe eingeschleust. Bei systemischen Krankheitsverläufen stellen die M-Zellen der Peyer'schen Plaques, die sich vereinzelt im Epithel zwischen den Saumzellen befinden, die Eintrittspforte für die Erreger dar. Die Bakterien können bei Zellkontakt die Expression spezifischer Gene induzieren, die eine Umlagerung des eukaryontischen Zytoskeletts verursachen. Durch Membranausstülpungen („membrane ruffles“) gelangen die Bakterien in die Zelle, stimulieren innerhalb der Epithelzellen eine Reihe von Signaltransduktions-Kaskaden und induzieren die zelluläre Immunantwort in Form von Zytokin-Produktion. Die Bakterien werden von der apikalen zur basolateralen Seite der Zelle transloziert, wo sie von Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten (PMN's) und dendritischen Zellen zur Antigenprä-

sensation und Eliminierung aufgenommen werden (Siebers & Finlay, 1996, vgl. Abb. 1). Die Bakterien gelangen daraufhin in das Retikulo-endotheliale System und können sich anschließend systemisch in Organen wie Milz und Leber ausbreiten. Eine alternative Aufnahme von *Salmonella* läuft unabhängig von der Funktion der SPI1-Gene und der Invasion durch die M-Zellen der Peyer'schen Plaques. In der Darmmucosa können CD18-exprimierende Phagozyten *Salmonella* aufnehmen, über die Lamina propria ins Blut transportieren und so zu einer systemischen Ausbreitung der Bakterien in Milz und Leber führen (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus dieser Dissemination ist jedoch noch nicht bekannt.

### 1.1.3 Überleben und Replikation von *Salmonella* innerhalb von Wirtszellen

Pathogene Bakterien haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um in eukaryontischen Zellen zu überleben und sich zu replizieren (Garcia del Portillo & Finlay, 1995). Während sich *Shigella* spp. und *Listeria monocytogenes* nur vorübergehend in Vakuolen befinden, nach Lyse der Vakuolenmembran aus dem Phagosom austreten und sich im Zytoplasma vermehren, verbleiben *Mycobacterium tuberculosis* und *Legionella pneumophila* im Phagosom. Dort modifizieren sie die Phagosomenreifung dahingehend, dass sie entweder die Ansäuerung des Phagosoms oder seine Fusion mit Lysosomen blockieren. Die intrazelluläre Überlebensstrategie von *Salmonella* ist dagegen bisher noch nicht vollständig geklärt. Der fakultativ intrazelluläre Erreger kann sich innerhalb von Wirtszellen replizieren und der Immunantwort des Wirtes widerstehen. Er dringt dabei nicht in das Zytoplasma ein, sondern bleibt in der phagosomalen Vakuole, die ein Umfeld mit niedrigem pH-Wert und limitierten Nährstoffen darstellt. Phagozytierte Bakterien, die keinen Verteidigungsmechanismus haben, werden nach der Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen in dem daraus resultierenden Phagolysosom abgebaut. Sie kommen mit antimikrobiellen Enzymen wie Proteasen und Lysozym ebenso in Kontakt wie mit kationischen Peptiden (Defensinen). Zusätzlich sind sie im Verlauf des „oxidative burst“ den reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (Superoxid-Radikale, Hydroxylradikale) und reaktiven Stickstoff-Verbindungen ( $\text{NO}^*$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) ausgesetzt. Zahlreiche Gene, die in *Salmonella* bei der Verteidigung gegen die antimikrobiellen Aktivitäten der eukaryontischen Wirtszelle eine Rolle spielen, sind mittlerweile identifiziert worden. Es herrscht jedoch noch Uneinigkeit darüber, durch welche Mechanismen *Salmonella* intrazellulär überleben kann. Die Hypothesen reichen von (a) einer Inhibierung der

Ansäuerung des Phagosoms durch *Salmonella* und damit verbunden die Unterbindung der optimalen Aktivität saurer Hydrolasen (Alpuche Aranda *et al.*, 1992) über (b) die Inhibierung der Fusion von *Salmonella*-haltigen Vakuolen mit Lysosomen bis hin zu (c) der Annahme, dass *Salmonella*-haltige Vakuolen eine andere Zusammensetzung haben als normale Phagosomen und die Bakterien so dem intrazellulären „Trafficking“ entgehen können (Rathman *et al.*, 1997).

## 1.2 *Salmonella* besitzt fünf Pathogenitätsinseln

Bei der Untersuchung der genetischen Anordnung vieler Virulenzgene kam es zu der Beobachtung, dass diese häufig in dichten Gruppen von Virulenzmodulen lokalisiert sind, den sogenannten Pathogenitätsinseln (PAI). Pathogenitätsinseln wurden erstmals von Hacker *et al.* in pathogenen *E. coli* beschrieben (Hacker *et al.*, 1990) und zeichnen sich im allgemeinen durch folgende Charakteristika aus: Sie stellen meistens relativ große Insertionen von über 30 kBp im Genom dar, die sich im G+C-Gehalt vom übrigen Genom unterscheiden. Auf PAI sind zumeist mehrere Virulenzproteine kodiert, die in pathogenen Bakterien zu finden sind, nicht aber in einer weniger pathogenen oder apathogenen verwandten Spezies. Als mobile genetische Einheiten sind PAI häufig von direkten Wiederholungssequenzen („direct repeats“) flankiert und sehr oft an tRNA-Genen inseriert. Auffallend ist die Häufung von teilweise kryptischen Mobilitätselementen wie Integrasen, Transposasen und IS-Elementen. In vielen Fällen haben sich PAI als relativ instabil erwiesen (Hacker *et al.*, 1997).

In *Salmonella* spp. sind bisher fünf Pathogenitätsinseln beschrieben worden. Die *Salmonella* Pathogenitätsinseln 1 und 5 (SPI1 und SPI5) spielen bei der Invasion der Erreger in die Darmepithelzellen eine Rolle und ermöglichen damit den ersten Schritt einer Infektion. Die Pathogenitätsinseln SPI2, SPI3 und SPI4 sind primär für das Überleben und Replizieren der Bakterien innerhalb eukaryontischer Zellen und die systemische Ausbreitung von *Salmonella* im Wirtsorganismus verantwortlich. Zusätzlich zu den auf den PAI kodierten Proteinen sind auch Proteine des Virulenzplasmids für das Wachstum von Bakterien innerhalb von Makrophagen und das Überleben im murinen Infektionsmodell notwendig (Fields *et al.*, 1986; Libby *et al.*, 1997).

Interessanterweise sind auf SPI1 und SPI2 jeweils Gene lokalisiert, die unabhängig voneinander zwei Typ III-Sekretionssysteme kodieren. Durch die Translokation bak-

terieller Proteine (Effektorproteine) in das Wirtszell-Zytosol werden die jeweiligen Virulenz-Phänotypen vermittelt.

### **1.3 Typ III-Sekretionssysteme in *Salmonella***

Typ III-Sekretionssysteme (TTSS) sind komplexe molekulare Apparate in zahlreichen Gram-negativen pathogenen Erregern von Menschen, Tieren und Pflanzen (Hueck, 1998). Sie sind strukturell und funktionell eng mit dem Flagellen-Apparat verwandt, sind aus über 20 verschiedenen Proteinen aufgebaut und umspannen vom Zytoplasma über das Periplasma bis an die Bakterienoberfläche beide Membranen Gram-negativer Bakterien (Abb. 2). Es wird zwischen zwei Formen des Proteintransports über das TTSS unterschieden: Als Sekretion wird die Ausschleusung von Substratproteinen aus dem Zytoplasma über beide bakteriellen Membranen in das umgebende Medium bezeichnet. Sie ist unter spezifischen Umweltbedingungen auch *in vitro* induzierbar. Dagegen erfolgt der Transport von Substratproteinen *in vivo* aus dem Bakterium in die eukaryontische Zielzelle vermutlich kontaktabhängig und wird als Translokation bezeichnet (Hueck, 1998).

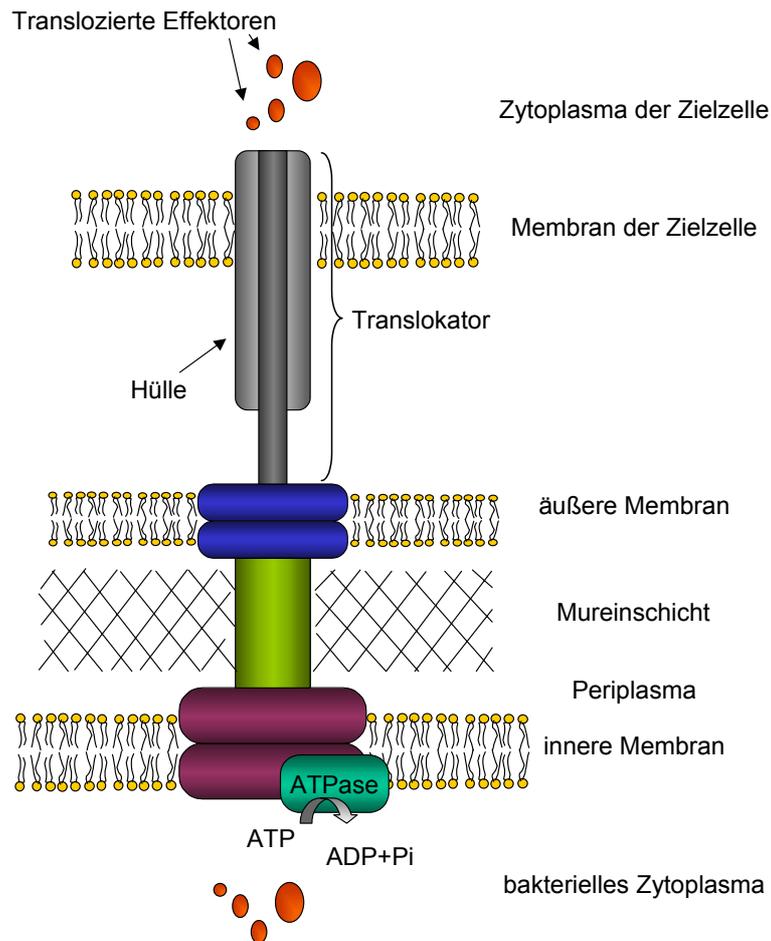


Abb. 2: Modell eines Typ III-Sekretionssystems.

Der Sekretionsapparat besteht aus mehreren Proteinuntereinheiten, die sich über beide bakteriellen Membranen und die Membran der Zielzelle verteilen. Die Substratproteine (orange) liegen im Bakterien-Zytoplasma vor und werden unter induzierenden Bedingungen über beide Bakterienmembranen auf die Bakterienoberfläche sekretiert und mittels der Translokator-Struktur in die eukaryontische Zielzelle transloziert. Dieser Prozess wird durch eine membranassoziierte ATPase energetisiert.

Die Präsenz von mehr als einem TTSS mit Virulenzfunktionen innerhalb eines Bakteriums wurde bisher nur für *Yersinia* spp. und *S. enterica* beschrieben. Die drei humanpathogenen *Yersinia*-Stämme *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* besitzen alle ein auf dem Virulenzplasmid kodiertes TTSS, das für die Sekretion der Yop-Effektorproteine verantwortlich ist (Hueck, 1998). In *Y. enterocolitica* wurde zudem ein chromosomal kodiertes TTSS gefunden, das ebenfalls zur Virulenz des Bakteriums beiträgt (Haller *et al.*, 2000). Auch die kürzlich publizierte Genomsequenz von *Y. pestis* gibt Hinweise auf die Existenz eines weiteren chromosomal kodierten TTSS, das eine erstaunliche Ähnlichkeit mit dem TTSS der SPI2 in *Salmonella* aufweist (Parkhill *et al.*, 2001). Es liegen dazu bisher jedoch keine funktionelle

Daten vor. Bei *Y. enterocolitica* wurde gezeigt, dass der in Enterobakterien weit verbreitete Flagellen-Apparat in diesem Organismus auch zur Sekretion des heterologen Proteins YpIA befähigt ist. Diese Virulenz-assoziierte Phospholipase ist nicht am Aufbau oder der Funktion des Flagellums beteiligt (Young *et al.*, 1999; Young & Young, 2002). Möglicherweise stellt die Typ III-Sekretion über das Flagellen-System einen generellen Mechanismus des Proteintransports auch in anderen bakteriellen Spezies dar.

In *S. enterica* sind die beiden Typ III-Sekretionssysteme für unterschiedliche Phasen der Pathogenese von *Salmonella*-Infektionen verantwortlich, jedoch sind die molekularen Mechanismen beider Virulenzfaktoren sehr ähnlich. Zahlreiche Proteine sind den Komponenten der gut charakterisierten TTSS aus *Yersinia* spp. und *Shigella* spp. sowohl funktionell als auch in der Sequenz sehr ähnlich (Hueck, 1998) und lassen daher auf eine Beteiligung am Aufbau der Sekretionsapparate schließen (vgl. Abb. 3).

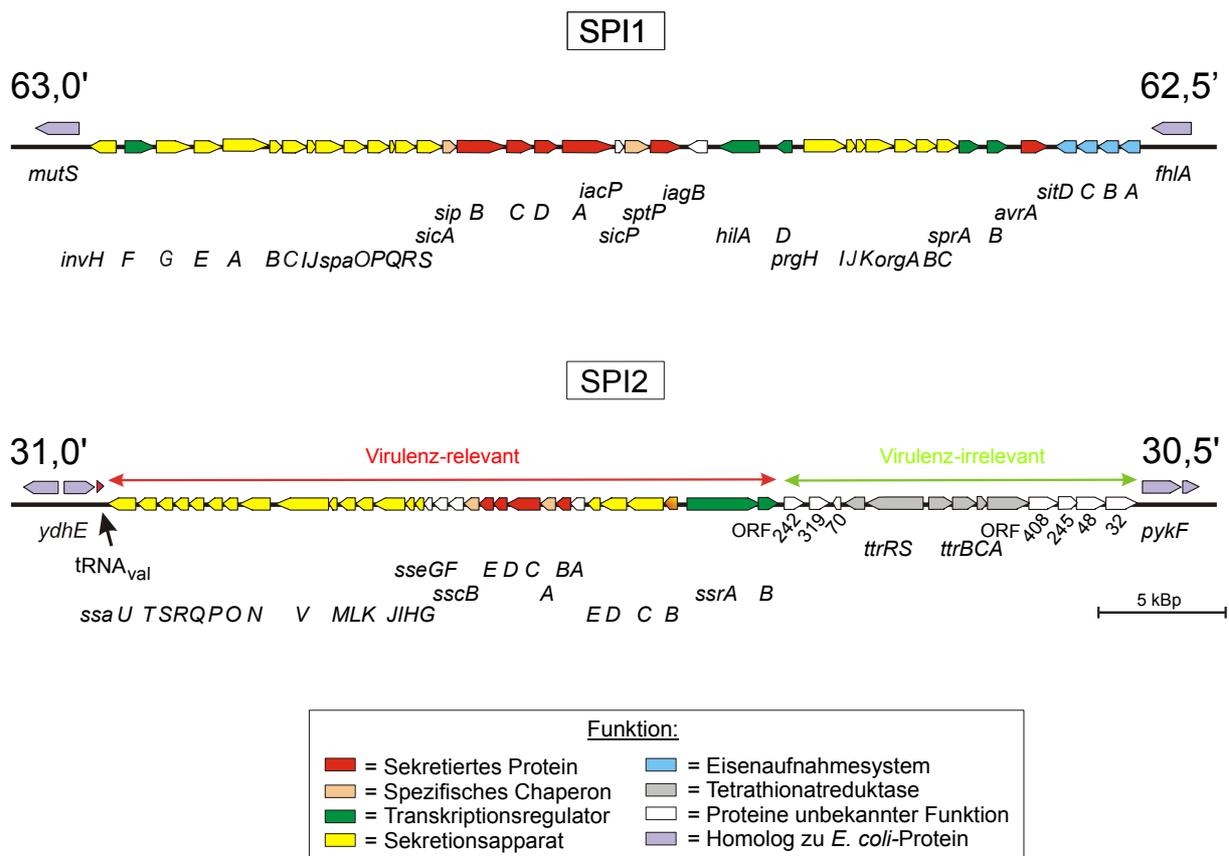


Abb. 3: Die genetische Struktur von SPI1 und SPI2.

Die Funktion der SPI1- und SPI2-Gene ist durch unterschiedliche Farbgebung dargestellt.

In elektronenmikroskopischen Analysen konnte die Struktur des SPI1-kodierten TTSS als Membran-gebundener Komplex mit einer nach außen gerichteten Nadelstruktur aufgedeckt werden (Kubori *et al.*, 1998). Dies wurde nachfolgend auch für *Shigella* spp. (Tamano *et al.*, 2000) und *E. coli* (Sekiya *et al.*, 2001) gefunden. Während die Strukturgene für beide *Salmonella*-Sekretionsapparate sehr ähnlich sind, hat eine Reihe der auf SPI1 und SPI2 kodierten Proteine keinerlei Homologe im anderen System, so dass die Proteine vermutlich mit der spezifischen Funktion des jeweiligen Systems im Zusammenhang stehen.

#### 1.4 Die molekulare Struktur von SPI2

Der SPI2-Locus enthält 44 *Salmonella*-spezifische ORFs, die funktionell in zwei Bereiche aufgeteilt sind: Das 25 kBp große Fragment bei Cs 31,0 kodiert für die Komponenten des TTSS sowie einige translozierte Effektorproteine und ist für die systemische Pathogenese relevant. Dagegen sind auf dem 15 kBp großen Fragment bei Cs 30,5 Gene für ein Tetrathionatreduktase-System lokalisiert (vgl. Abb. 3), die für die Virulenz von *Salmonella* unerheblich sind (Hensel *et al.*, 1999b). Innerhalb des 25 kBp-Fragments sind eine Reihe von Strukturgenen lokalisiert, deren Proteine den Typ III-Sekretionsapparat bilden (*ssa*-Gene) sowie diverse vermutliche Substrat- und Effektorproteine des TTSS (*sse*-Gene) und ihre dazugehörigen Chaperone (*ssc*-Gene) darstellen. Auch das Zwei-Komponenten-System SsrAB befindet sich innerhalb dieses Locus. Das 15 kBp-Fragment umfasst Gene, welche die Strukturkomponenten einer Tetrathionatreduktase (*ttrABC*) und ihres Zwei-Komponenten-Systems (*ttrRS*) kodieren (Hensel *et al.*, 1999a). Mit Hilfe dieses Genkomplexes ist *Salmonella* in der Lage, Tetrathionat als Elektronenakzeptor in der anaeroben Atmung zu nutzen. Mutationen innerhalb der *ttr*-Gene führen zu keiner Attenuierung der Virulenz im Mausmodell (Hensel *et al.*, 1999a). Den sieben weiteren ORFs innerhalb des 15 kBp-Fragments konnte bisher keine Funktion zugeschrieben werden. Die Organisation der SPI1-Gene gleicht der der *spa/mxilipa*-Gene auf dem *Shigella*-Virulenzplasmid, während die Anordnung der SPI2-Gene eher eine Ähnlichkeit mit der der TTSS-Gene von enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und Virulenzplasmiden aus *Yersinia* spp. zeigt (Hueck, 1998). Insbesondere Gene für Substrat- und Regulatorproteine sind jedoch sowohl für SPI1 als auch für SPI2 spezifisch und bestimmen die beson-

deren Charakteristika der einzelnen TTSS, wobei ihre Funktion zum Teil noch unbekannt ist.

## 1.5 Funktion von SPI2 und SPI2-Substratproteinen

Neben der Invasion nicht-phagozytischer eukaryontischer Zellen stellt die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben und Replizieren ein weiteres Kennzeichen der *Salmonella*-Pathogenese dar. Dieser Phänotyp wird der Funktion des auf SPI2 kodierten Typ III-Sekretionsapparates zugeschrieben (Shea *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1999). SPI2-Mutanten sind im Mausmodell der systemischen Infektion stark attenuiert und können nicht in Wirtsorganen wie Leber und Milz proliferieren. *In vitro*-Studien zeigen eine reduzierte Überlebensfähigkeit von SPI2-Mutanten in primären Makrophagen und einen Replikationsdefekt in monozytären Zelllinien (Hensel *et al.*, 1998; Ochman *et al.*, 1996). Aus diesen *in vivo*- und *in vitro*-Befunden resultiert, dass *Salmonella* offensichtlich den intrazellulären Abtötungsmechanismen der Zellen entkommen kann. Vazquez-Torres *et al.* (2000) zeigten, dass die Funktion von SPI2 nötig ist, um eine Interaktion von *Salmonella*-haltigen Vesikeln mit NADPH-Oxidase zu vermeiden und somit eine Abtötung durch oxidativen Stress zu unterbinden. Kürzlich wurde der Einfluss von SPI2-Proteinen auf die Inaktivierung intrazellulärer Bakterien durch reaktive Stickstoff-Intermediate (RNI) gezeigt. In den eukaryontischen Zellen kann die induzierbare Stickstoffoxid-Synthase („inducible nitric oxide synthase“, iNOS) RNI synthetisieren und damit zum Schutz der Zelle gegen intrazelluläre Erreger beitragen. Durch die Funktion von SPI2 wird eine Interaktion von intrazellulären *Salmonella* mit dem eukaryontischen iNOS inhibiert und der damit verbundene antimikrobiellen Effekt unterbunden (Chakravorty *et al.*, 2002).

Zahlreiche Substratproteine des SPI2-TTSS sind mittlerweile identifiziert worden. So wird gezeigt, dass SseB unter sauren Medienbedingungen sekretiert wird (Beuzon *et al.*, 1999). Das zu SseB ähnliche EspA wird in enteropathogenen *E. coli* (EPEC) ebenfalls sekretiert und bildet dort beim Aufbau des TTSS eine Art Umhüllung des Translokators (Sekiya *et al.*, 2001; vgl. Abb. 2). Auch die Proteine SseC und SseD, die Sequenzähnlichkeiten zu den Sekretionsapparats-Proteinen EspB und EspD aus *E. coli* bzw. YopB und YopD aus *Yersinia* haben, werden in saurem Medium *in vitro* sekretiert und bilden zusammen mit SseB eine komplexe Struktur auf der Bakterienoberfläche (Klein & Jones, 2001; Nikolaus *et al.*, 2001). Neben diesen sekretierten

Translokatorproteinen befinden sich auf SPI2 noch zwei putative Effektorproteine, SseF und SseG, die ebenfalls aus dem Bakterium über SPI2 ausgeschleust werden (Hansen-Wester *et al.*, 2002). Ihnen wird eine Funktion bei der Ausbildung von eukaryontischen *Salmonella*-induzierten Filamenten (SIF) in infizierten Epithelzellen zugeschrieben (Guy *et al.*, 2000). Zusätzlich zu den auf SPI2 befindlichen sekretierten Proteinen ist eine Anzahl von sogenannten „*Salmonella*-translozierten Effektoren“ (STE) identifiziert worden, die außerhalb der SPI2 kodiert sind und ebenfalls über das TTSS von SPI2 transloziert werden (Miao *et al.*, 1999; Miao & Miller, 2000; Hansen-Wester *et al.*, 2002; Knodler *et al.*, 2002). Außer für SifA, das ebenfalls bei der Bildung von SIF-Strukturen in Epithelzellen eine Rolle spielt (Garcia del Portillo *et al.*, 1993), SlrP, das einen geringen Einfluss auf die Virulenz von *Salmonella* im Maus-Infektionsmodell zeigt (Tsolis *et al.*, 1999b), sowie für SspH1 und SspH2, die zusammen eine Attenuierung der Virulenz im Kälbermodell hervorrufen (Miao *et al.*, 1999), konnte bisher keinem der STE-Proteine ein Virulenz-Phänotyp zugeschrieben werden. Die funktionelle Charakterisierung dieser und anderer SPI2-Effektoren bleibt somit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 1.6 TTSS als Paradigma der Evolution von Virulenzfaktoren in Gram-negativen Bakterien

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten wird angenommen, dass sich TTSS aus dem Flagellen-Apparat Gram-negativer Bakterien entwickelt haben könnten (Hueck, 1998). Während der Evolution der bakteriellen Virulenz gab es eine Aufspaltung der TTSS-Entwicklung. Es kam zum einen zur funktionellen Etablierung des TTSS bei der Invasion nicht-phagozytischer Zellen (repräsentiert durch das SPI1-System in *Salmonella* spp. und das Virulenz-Plasmid in *Shigella* spp.), zum anderen zur Ausbildung eines TTSS-Komplexes, der zur Modifikation von Wirtszell-Funktionen mit Ausnahme der Invasion in der Lage ist. Dazu gehören die Paralyse von Phagozyten durch *Yersinia* spp., die Adhäsion und der Verlust des Bürstensaums von Enterozyten durch EPEC („enterocyte effacement“) und die intrazelluläre Replikation durch die SPI2 von *Salmonella*. Wahrscheinlich ist die Präsenz beider TTSS in *Salmonella* spp. auf einen horizontalen Transfer von DNA zurückzuführen. Die Frage nach der Herkunft dieser DNA-Elemente bleibt jedoch ungeklärt. SPI1 und SPI2 zeigen einige für PAI typische Charakteristika. Sie stellen große chromosomale

Insertionen von jeweils ca. 40 kBp dar, die mehrere Virulenzgene tragen und in der nahe verwandten Spezies *E. coli* nicht nachweisbar sind (Hensel, 2000). Auch ist die Basenzusammensetzung beider PAI anders als die des restlichen Genoms. SPI2 ist zusätzlich direkt an einem tRNA-Gen inseriert, einem häufigen Ankerpunkt für PAI (Hacker *et al.*, 1997; Hensel *et al.*, 1997), SPI1 dagegen nicht. Im Gegensatz zu anderen PAI haben sich SPI1 und SPI2 als sehr stabile chromosomale Insertionen erwiesen. Der Verlust einer der beiden Inseln ist bisher nicht beobachtet worden, und nur wenige Umweltisolate von *Salmonella* spp. zeigten Deletionen in bestimmten Regionen der SPI1 (Ginocchio *et al.*, 1997). Die Analyse der Verteilung von SPI1 und SPI2 innerhalb der Gattung *Salmonella* ergab, dass SPI1 sowohl in *S. enterica* als auch in der phylogenetisch älteren Spezies *S. bongori* zu finden war. SPI2 dagegen ließ sich nur in *S. enterica*-Isolaten nachweisen (Ochman & Groisman, 1996; Hensel *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass SPI1 weitaus früher erworben wurde als SPI2. Eine genauere Analyse von SPI2 deckte außerdem auf, dass dieser Locus kein Resultat eines einzelnen Aufnahme-Ereignisses sein kann, da dieser Locus eher eine mosaikartige Struktur hat. Die Gene des für die Virulenz irrelevanten Tetrathionatreduktase-Komplexes bei Cs 30,5 weisen einen G+C-Gehalt von 55,5% auf, der damit höher ist als der G+C-Gehalt des restlichen Genoms von ca. 52%. Diese Region ist in allen *Salmonella*-Spezies einschließlich *S. bongori* nachweisbar und repräsentiert damit eine phylogenetisch ältere Insertion innerhalb von SPI2. Dagegen hat das bei Cs 31,0 lokalisierte 25 kBp-Fragment, welches das TTSS kodiert und damit für die Virulenz eine Rolle spielt, einen G+C-Gehalt von 44%. Es ist nur in *S. enterica*, nicht aber in *S. bongori* zu finden und ist deshalb vermutlich eine neuere Insertion innerhalb von *S. enterica* (Hensel *et al.*, 1997; Hensel *et al.*, 1999b).

## 1.7 Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Die Übertragung komplexer Virulenzmodule von einem Organismus auf den anderen kann die Evolution von Pathogenität in einem erheblich schnelleren Maße vorantreiben als eine *de novo*-Entwicklung. Der horizontale Transfer von Pathogenitätsinseln stellt solche sogenannten „Quantensprünge der Evolution“ dar (Groisman & Ochman, 1996). Experimentelle Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die entsprechenden DNA-Bereiche plasmidkodiert durch konjugativen Transfer, durch phagen-

vermittelte Transduktion oder durch Transfer und Einbau freier DNA übertragen werden. Insbesondere die DNA-Übertragung von Virulenzdeterminanten durch Bakteriophagen konnte mehrfach gezeigt werden (Cheetham & Katz, 1995; Waldor & Mekalanos, 1996; Miroid *et al.*, 1999; Ruzin *et al.*, 2001). So konnten Waldor und Mekalanos nachweisen, dass die Strukturgene des auf dem Phagen CTX $\Phi$  aus *Vibrio cholerae* kodierten Cholera-Toxins CT innerhalb des Gastrointestinaltrakts von Mäusen auf andere *V. cholerae*-Stämme übertragen werden. Diese Form des horizontalen Gentransfers wird offenbar *in vivo* induziert (Waldor & Mekalanos, 1996). Ein weiteres Beispiel für den horizontalen Transfer von Virulenzgenen durch lyso-gene Konversion stellt der *Salmonella*-Phage SopE $\Phi$  dar. Dieser Phage kodiert das Virulenzprotein SopE, ein SPI1-Effektorprotein, das bei der Zellinvasion durch *Salmonella* an der Umlagerung des eukaryontischen Zytoskeletts beteiligt ist (Miroid *et al.*, 1999). Durch SopE $\Phi$  kann das *sopE*-Gen innerhalb verschiedener *Salmonella*-Stämme transduziert und dadurch die Virulenzleistung von *Salmonella*-Isolaten durch horizontalen Gentransfer verändert werden (Miroid *et al.*, 1999). Auch in Gram-positiven Organismen ist der phagenvermittelte Transfer von Virulenzfaktoren gezeigt worden. So kann die 15 kBp große PAI aus *Staphylococcus aureus*, SaPI1, mittels Phagen auf andere Stämme übertragen werden (Lindsay *et al.*, 1998).

Pathogenitätsinseln sind in ihrem evolutionären Potential vergleichbar mit dem von Lawrence beschriebenen „Selfish Operon“ (Lawrence, 1997). Danach setzt sich ein Operon aus ko-transkribierten Genen zusammen, die für eine bestimmte (metabolische) Funktion kodieren. Das Ziel dieses genetischen Zusammenschlusses in Operone ist jedoch nicht die geregelte Transkription der Gene, sondern die Ermöglichung eines schnellen und wirksamen horizontalen Gentransfers innerhalb von Organismen. Während eine auf Nukleotid-Austausch basierende Evolution in *E. coli* zu langsam wäre, um neue bakterielle Funktionen zu vermitteln, sind die meisten bisher beschriebenen phänotypischen Unterschiede von *Salmonella* und *E. coli* (Laktose-Verwertung, Citrat-Verwertung, Indol-Produktion) auf den Gewinn oder Verlust von ganzen Genen oder Genkomplexen zurückzuführen. So ermöglichen diese egoistischen Operone eine rapide und effiziente Eroberung neuer ökologischer Nischen wie beispielsweise die des menschlichen Darms durch die Fähigkeit der Laktose-Verwertung (Lawrence, 1997; Ochman *et al.*, 2000). SPI2 stellt ebenfalls ein Beispiel eines solchen egoistischen Operons dar. Es wird davon ausgegangen, dass SPI2 durch Mechanismen des horizontalen Gentransfers in das Genom von *S. enterica*

gelangt ist, zusammen mit zahlreichen außerhalb der PAI kodierten STE-Proteinen. Ob jedoch das gesamte SPI2-Virulenz-Modul mit der darin kodierten Sekretionsmaschine und allen Effektor-Genen „en bloc“ oder sukzessive im Laufe der Evolution in das Genom von *Salmonella* gelangt ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

## 1.8 Wirtsspezifität innerhalb der Gattung *Salmonella*

Die taxonomische Bezeichnung einzelner *Salmonella*-Stämme richtete sich früher danach, aus welchem Wirt bzw. von welchem Ort der jeweilige Stamm isoliert wurde. Mittlerweile sind sich die meisten Forscher darüber einig, dass es nur eine oder zwei Spezies innerhalb der Gattung *Salmonella* gibt, da die einzelnen Stämme sehr eng verwandt sind. Die meisten Bakteriologen richten sich inzwischen nach dem von Popoff und Le Minor vorgeschlagenen Schema (Le Minor & Popoff, 1987; Popoff *et al.*, 1992; Popoff *et al.*, 1993), nach dem einzelne Subspezies weiter in Serovare (Serotypen) differenziert werden. Diese spiegeln die Formel der Zellwand-Antigene („O“-Antigene) und der Flagella-Antigene („H“-Antigene) wider, anhand derer einzelne Stämme serotypisiert und eingeteilt werden.

Die aktuelle *Salmonella*-Nomenklatur unterscheidet zwischen den Spezies *S. enterica* und *S. bongori*. Die Spezies *S. enterica* gliedert sich in die Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII auf, während Subspezies V die eigene Spezies *S. bongori* repräsentiert.

Die Subspezies I unterteilt sich wiederum in Serovare, denen die einzelnen Stämme zugeordnet sind (Abb. 4). Die taxonomisch vollständige Bezeichnung des Laborstammes LT2 lautet daher „*Salmonella enterica* Subspezies I Serovar Typhimurium LT2“, jedoch wird in der vorliegenden Arbeit die gebräuchlichere Bezeichnung „*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2“ verwandt.

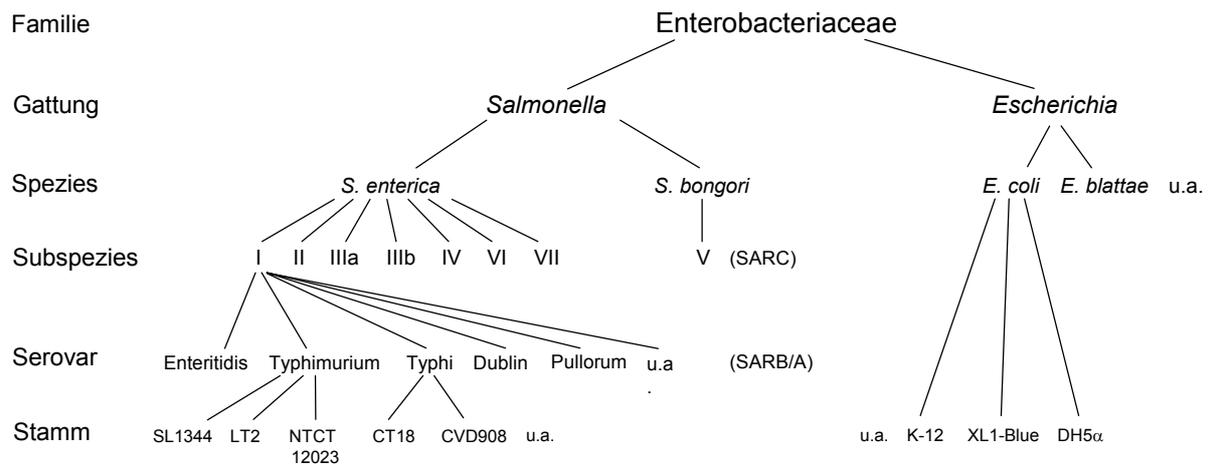


Abb. 4: Taxonomische Einteilung der Gattungen *Salmonella* und *Escherichia*.

Die Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* werden unterschiedlich differenziert. Die Gattung *Salmonella* teilt sich in die beiden Spezies *S. bongori* und *S. enterica* auf, wobei letztere in sieben weitere Subspezies differenziert wird. Die Subspezies I umfasst dabei die primär humanpathogenen Stämme, die aufgrund ihrer serologischen Eigenschaften in Serovare zusammengefasst werden. Dieser Einteilung entspricht auch die Zusammensetzung der Stämme aus den *Salmonella*-Referenzsammlungen SARA, B und C. Die *Salmonella*-Referenzsammlung C (SARC-Sammlung) umfasst sämtliche Subspezies der Gattung *Salmonella*, i.e. I, II, IIIa, IIIb, IV, V, VI und VII, die durch jeweils 2 Isolate vertreten sind (Boyd *et al.*, 1996). Die SARB-Sammlung beinhaltet 72 Isolate aus der *S. enterica* Subspezies I, die 37 verschiedene Serovare repräsentieren (Boyd *et al.*, 1993). Die SARA-Sammlung setzt sich aus 72 Stämmen der *S. enterica* Subspezies I-Serovare Typhimurium, Saintpaul, Heidelberg, Paratyphi B und München zusammen (Beltran *et al.*, 1991).

Es wird angenommen, dass die Differenzierung und Evolution der Virulenz innerhalb der Gattung *Salmonella* in mehreren Phasen stattgefunden hat. Die erste Phase nach der Trennung von *E. coli* wird dadurch gekennzeichnet, dass *Salmonella* zur Invasion von Epithelzellen und damit zur Besiedelung des menschlichen Darms in der Lage war (Bäumler *et al.*, 1998). In dieser Phase kam es vermutlich zur Aufnahme von Adhäsion-kodierenden Genen wie beispielsweise dem *fim*-Operon (Typ I-Fimbrien) und dem *lpf*-Operon (lange polare Fimbrien *lpf*, für die Invasion von murinen Peyer'schen Plaques notwendig) und auch zum Erwerb von SPI1 (vgl. Abb. 5). In der zweiten Phase der Evolution kam es zur Trennung der beiden *Salmonella*-Spezies *S. enterica* und *S. bongori* und dem Erwerb von SPI2, welche das intrazelluläre Überleben und die systemische Ausbreitung von *S. enterica* im Wirtsorganismus ermöglicht. Die Differenzierung der Spezies *S. enterica* in die Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII durch die Aufnahme (Virulenzplasmid-Gene *spv*, unterschiedliche Fimbrien-Gene wie *pef* und *sef*, Vi-Kapselantigen *viaB*) und auch den Verlust

verschiedener Virulenz-Determinanten (*lpf*-Fimbriengene) wird als die dritte Phase der *Salmonella*-Evolution beschrieben. Diese Phase bedeutete eine erhebliche Erweiterung des Wirtsspektrums von *Salmonella*, das sich für *S. enterica* Subspezies I auch auf die warmblütigen Wirbeltiere erstreckte, während *S. bongori* und *S. enterica* Subspezies II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII primär mit kaltblütigen Wirbeltieren assoziiert sind (Bäumler, 1997; Bäumler *et al.*, 1998).

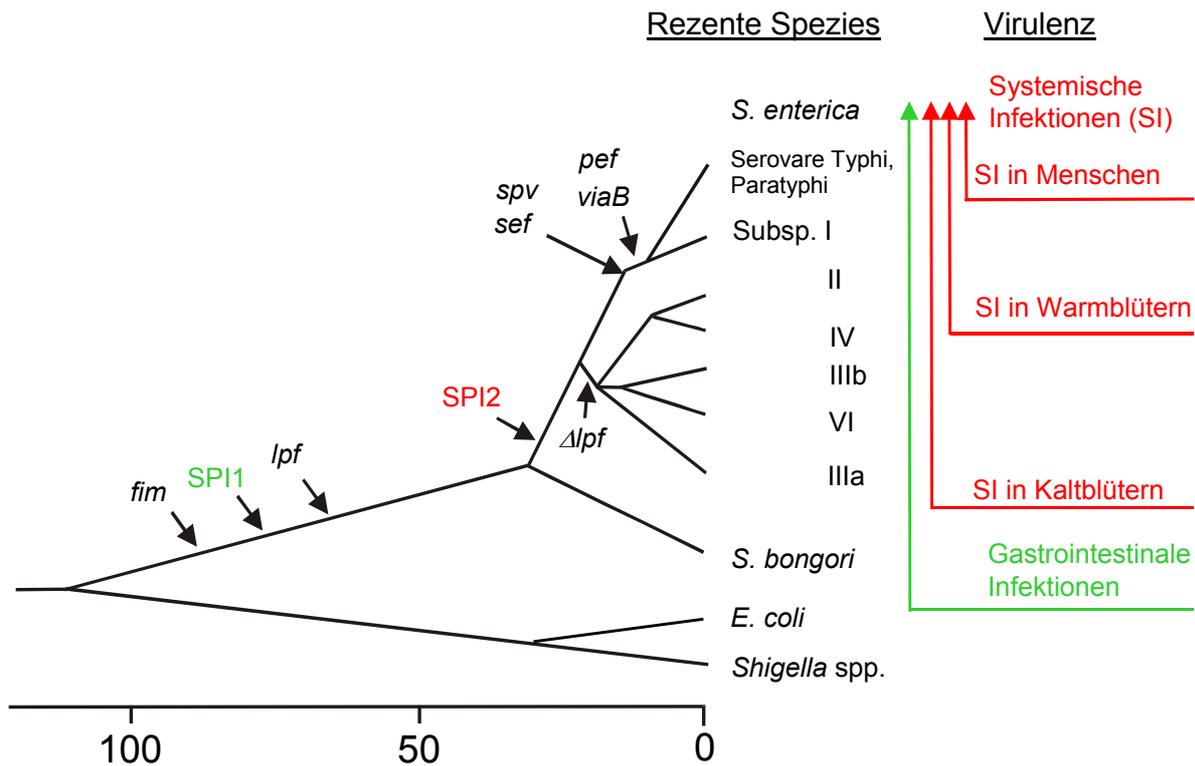


Abb. 5: Evolution der Pathogenität innerhalb der Gattung *Salmonella* (nach Bäumler, 1997).

Die Aufnahme von Virulenzgenen (*fim*, SPI1, *lpf*, SPI2, *spv*, *sef*, *pef* und *viaB*) und deren partieller Verlust ( $\Delta lpf$ ) beeinflussen die Entwicklung einzelner *Salmonella*-Spezies, die Anpassung der *Salmonella*-Subspezies an unterschiedliche Wirtshabitate und verschiedene Krankheitsverläufe.

Auch innerhalb der *Salmonella* Subspezies I variiert die Wirtsspezifität von hochwirtsadaptierten Formen wie beispielsweise dem humanpathogenen *S. enterica* Serovar Typhi bis zu Serovaren mit einem sehr breiten Wirtsspektrum wie *S. enterica* Serovar Typhimurium. Der molekulare Hintergrund der Wirtsspezifität von *Salmonella* ist bislang nicht geklärt, doch wird angenommen, dass die unterschiedliche Verteilung von Virulenz-Determinanten innerhalb der Gattung zu diesem Phänomen beiträgt.

## 1.9 Ziel dieser Arbeit

Durch die vorliegende Arbeit sollten die molekularen Mechanismen während der Evolution eines pathogenen Bakteriums charakterisiert werden. Zum einen sollten anhand der Modellorganismen *S. enterica* Serovar Typhimurium und *S. bongori* mögliche Vehikel für den horizontalen Gentransfer untersucht werden. Zudem sollte experimentell analysiert werden, ob und auf welche Weise neue Virulenzmodule in ein regulatorisches Netzwerk einer Zelle integriert werden. Dazu wurde die Isolierung des komplexen Virulenzfaktors SPI2 aus *S. enterica* Serovar Typhimurium und seine Übertragung in ein SPI2-negatives Bakterium angestrebt. Die Regulation des transferierten Genkomplexes und seine Funktion als neu erworbener Virulenzfaktor sollte im neuen Wirt analysiert werden, um Aufschluss über die Effizienz des horizontalen Gentransfers als funktioneller Quantensprung der bakteriellen Evolution zu gewinnen.

Als weiterer Aspekt sollte untersucht werden, ob die Aufnahme und der Verlust von Virulenzmodulen im Zusammenhang mit der ungewöhnlichen Diversität und der Wirtsspezifität von *Salmonella* spp. steht. In diesem Kontext war die Identifizierung und Charakterisierung weiterer putativer Virulenzmodule in *Salmonella* spp. von Interesse. Dieses Ziel sollte durch die Charakterisierung der Umgebung von tRNA-Genen, die als Ankerpunkte für inserierte Pathogenitätsinseln bekannt sind, verfolgt werden.

Die Identifizierung der Familie der STE-Proteine (*Salmonella*-translozierte Effektoren) warf neue Fragen zu der Funktion von SPI2 auf. So sollte die Aufklärung der Verteilung dieser Effektorproteine innerhalb der Gattung *Salmonella* zum Verständnis des SPI2-Virulons beitragen und Hinweise auf die Wirtsspezifität von *Salmonella* spp. geben. Durch die genetische Untersuchung der STE-Gen-Loci und ihre Distribution wurden Hinweise auf die Entwicklung von *S. enterica* als pathogenem Mikroorganismus erwartet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Vektoren (Plasmide, Cosmide und Phagen) sind in Tab. 1 bzw. Tab. 2 aufgelistet. Zusätzlich wurden diverse Patientenisolate aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU/München und aus dem Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der FAU/Erlangen analysiert.

Bakterielle Dauerkulturen wurden nach Zusatz von Glycerin zum Nährmedium (20% v/v Endkonzentration) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw. mit DMSO (7% v/v Endkonzentration) bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für sämtliche Versuche wurden die Bakterien aus der Dauerkultur frisch angezogen und auf Nährboden maximal eine Woche lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Enterobakterien-Stämme in Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium resp. auf LB-Platten kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989). Die zur Selektion eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 1: Bezeichnung und Eigenschaften verwendeter Bakterienstämme und Phagen

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<u><i>Salmonella</i> spp.:</u>		
<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium NCTC12023	Wildtyp	National Culture Type Collection, Colindale, UK
P2D6	<i>S. Typhimurium</i> 12023 <i>ssaV::mTn5</i> , Km <sup>R</sup>	(Shea <i>et al.</i> , 1996)
P8G12	<i>S. Typhimurium</i> 12023 <i>ssrB::mTn5</i> , Km <sup>R</sup>	(Shea <i>et al.</i> , 1996)
P3H6	<i>S. Typhimurium</i> 12023 <i>sifA::mTn5</i> , Km <sup>R</sup>	(Beuzon <i>et al.</i> , 2000)
MvP 371	<i>S. Typhimurium</i> 12023 $\Delta$ SPI2; Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. enterica</i> Serovar Typhimurium LT2	<i>rpoS</i>	<i>Salmonella</i> Genetics Stock Centre (SGSC), Vancouver, Kanada

<u>Tabelle 1 (Fortsetzung)</u>		
SARB-Stämme	Isolate von <i>Salmonella enterica</i> Subspezies I	SGSC, (Boyd <i>et al.</i> , 1993)
SARC-Stämme	Isolate von <i>Salmonella enterica</i> Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII sowie <i>S. bongori</i>	SGSC, (Boyd <i>et al.</i> , 1996)
<i>S. bongori</i> -Patientenisolate	humanpathogen	(Pignato <i>et al.</i> , 1998)
<u><i>E. coli</i>:</u>		
DH5 $\alpha$		Gibco-BRL, Eggenstein
XL1-Blue		Stratagene, Heidelberg
XL1-Blue MR	NaI <sup>R</sup>	Stratagene, Heidelberg
<u><i>Yersinia</i> spp.:</u>		
<i>Yersinia enterocolitica</i> WA-C	pYV <sup>-</sup> , Serotyp O:8, NaI <sup>R</sup>	(Heesemann, 1987)
<u>Phagen:</u>		
P22 HT $int$	P22-Phage mit hoher Transduktionsfrequenz	J. Hinton, Oxford (Schmieger, 1972)
ES 18	P22-Derivat mit breiterem Wirtsspektrum	(Schicklmaier & Schmieger, 1995)

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pKS, pSK	hohe Kopienzahl, Amp <sup>R</sup>	Stratagene, Heidelberg
pACYC184	geringe Kopienzahl, Tet <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	NEB (Chang & Cohen, 1978)
pBeloBac11	1-2 Kopien pro Zelle, Cosmid, Cm <sup>R</sup>	(Kim <i>et al.</i> , 1996)
pSuperCos1	hohe Kopienzahl, Cosmid, Amp <sup>R</sup>	Stratagene, Heidelberg
p6-E8	SPI2-TTSS in pSuperCos1	diese Arbeit
p1-H4	SPI2-TTSS in pSuperCos1	diese Arbeit
pB6	SPI2-TTSS in pBeloBac11	diese Arbeit
pFPV25.1	GFP konstitutiv exprimiert	(Valdivia & Falkow, 1997)
pWSK29	geringe Kopienzahl, Amp <sup>R</sup>	(Wang & Kushner, 1991)
pT7 Blue	hohe Kopienzahl, Amp <sup>R</sup>	Novagen, Heidelberg
pKD3	<i>cat</i> -Kassette, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	<i>aph</i> -Kassette, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	Arabinose-induzierbare Red-Rekombinase, Temp.-sensitiv, Amp <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	FLP-Rekombinase, Temp.-sensitiv, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
p2062	pBluescript II mit M45-Epitop, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
p2064	Pro <sub>sseA</sub> in p2062	diese Arbeit
p2095	Pro <sub>sseA</sub> <i>sscB sseF::M45</i> in pWSK29	diese Arbeit
p2104	Pro <sub>sifA</sub> <i>sifA::M45</i> in pWSK29	diese Arbeit

Tab. 3: Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonzentration
Ampicillin	Amp	50 µg/ml
Chloramphenicol	Cm	10-34 µg/ml
Gentamicin	Gm	10-100 µg/ml
Kanamycin	Km	50 µg/ml
Nalidixinsäure	Nal	100 µg/ml
Streptomycin	Strep	50-1000 µg/ml
Tetracyclin	Tet	50 µg/ml

### 2.1.1 Minimalmedien zur Bakterienanzucht

Zur Anzucht von Bakterien unter induktiven Bedingungen wurden folgende Minimalmedien eingesetzt:

#### Medium F

KCl	5 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,5 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
Bis-Tris	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	30 µM
Glyzerin	38 µM
Casaminosäuren	0,1%

Das Medium wurde mit doppelt destilliertem ddH<sub>2</sub>O angesetzt und mit HCl auf pH 7,0 bzw. 5,0 eingestellt.

#### Medium G

Das Medium setzt sich aus den gleichen Komponenten zusammen wie Medium F, jedoch werden 10 mM statt 30 µM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt.

<u>PCN</u>		<u>* 100 x Eisenstammlösung</u>	
NaCl	50 mM	FeCl <sub>3</sub>	1 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	276 µM	Tricin	40 mM
MOPS/MES-KOH, pH 7,4 bzw. pH 5,8	80 mM	Spurenelementelösung**	100 x
Eisenstammlösung*	1 x	<u>** 10 000 x Spurenelementelösung</u>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	25 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 µM
NH <sub>4</sub> Cl	15 mM	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	10 µM
Glukose	0,4%	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,3 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 µM	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,1 mM
		MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,8 mM
		ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 mM
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 µM

PCN-P

Das Medium PCN-P setzt sich aus den gleichen Komponenten zusammen wie Medium PCN, jedoch werden 340 µM statt 25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 bzw. 5,8 eingesetzt.

## 2.1.2 Phagen-Medien

EBU-Agar

Um Phagen nachweisen zu können, wurde ein Medium aus folgenden Komponenten zusammengestellt (Maloy, 1996):

Trypton	1%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	0,5%
Glukose	0,25%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25%
Evans Blau	12,5 mg/l
Uranin (Natriumfluoreszein)	25 mg/l

### P22-Lysat

Das P22-Lysat setzt sich aus LBEDO-Medium (LB; 2% 50 x E-Salze\*; 10 mM D-Glukose) mit  $\sim 10^{11}$  pfu/ml P22 HT *int* zusammen (Maloy, 1996).

#### \* 50 x E-Salze

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 g
Citrat x H <sub>2</sub> O	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 g
NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	175 g

Die Salzlösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt.

## 2.2 Genetische Methoden

### 2.2.1 DNA-Standardmethoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Isolierung, Modifizierung und Charakterisierung von DNA nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden von MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Gibco BRL/Life Technologies, New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Die Aufreinigung von DNA wurde zumeist mit Hilfe von Reagenzien der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt: „QIAamp Tissue Kit“ zur Isolierung chromosomaler DNA, „QIAGEN Mini/Midi/Maxi Kit“ zur Isolierung von Plasmid-DNA, „QIAGEN PCR purification Kit“ zur Aufreinigung von PCR-Produkten und „QIAquick gel extraction Kit“ zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten.

Die Aufreinigung großer Mengen chromosomaler DNA erfolgte nach der CTAB-Methode (Ausubel *et al.*, 1997).

Der Transfer von Plasmid-DNA in unterschiedliche Stämme von *E. coli* und *Salmonella* spp. erfolgte entweder über Elektroporation bei 2,5 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu$ F oder über P22-Transduktion (s. 2.2.3).

### 2.2.2 Erzeugung einer Cosmidbank

Eine Cosmidbank der chromosomalen DNA von *S. enterica* Serovar Typhimurium 12023 wurde mit dem Cosmid pSuperCos1 (Stratagene, Heidelberg) hergestellt.

Ausreichend hochmolekulare chromosomale DNA wurde mit *SauIII*A partiell verdaut und über *Bam*HI in das Cosmid pSuperCos1 kloniert. Die Verpackung der Cosmide mit dem Phagen  $\lambda$  erfolgte mit Hilfe des „Gigapack<sup>®</sup> III Gold Packaging Kit“ (Stratagene, Heidelberg). Als Wirtstamm der Cosmidbank wurde *E. coli* XL1-Blue MR eingesetzt.

### 2.2.3 P22-Transduktion

Mit dem P22 HT *int*-Phagen konnten Mutationen und Plasmide innerhalb von *S. enterica* Serovar Typhimurium von einem Stamm auf einen anderen übertragen werden. 0,5 ml des bis zur stationären Phase (8 h bis über Nacht) gewachsenen Donorstammes wurden zunächst mit 2 ml P22-Medium 6-8 h bei 37°C im Reagenzglasroller inkubiert. Bakterienreste wurden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das P22-Lysat wurde dann mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert.

Zur Transduktion wurden 100  $\mu$ l der Rezipienten-Übernachtskultur mit 10  $\mu$ l P22-Lysat gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 900  $\mu$ l LB + 10 mM EGTA wurde das Gemisch 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und dann auf LB-Agar mit 10 mM EGTA und entsprechender Antibiotika-Selektion ausplattiert. Gewachsene Kolonien wurden anschließend noch dreimal durch Ausstreichen auf LB-EGTA-Platten mit Antibiotika-Selektion gereinigt, um Kontaminationen mit lysogenen Stämmen zu eliminieren (Maloy *et al.*, 1996).

### 2.2.4 Phagen-Isolierung

Die Isolierung von Phagen aus *Salmonella*-Isolaten erfolgte nach der Methode von Schicklmaier und Schmieger (1995). 1,5 ml einer in LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37°C angezogenen Bakterienkultur wurden 5 min bei 14 000 x g abzentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde abgenommen und mit 100  $\mu$ l Chloroform versetzt. Top-Agar-Platten wurden durch Mischen von 3 ml 0,7% Agarose in H<sub>2</sub>O mit 200  $\mu$ l über Nacht gewachsener Bakterienkultur und anschließendem Aufgießen auf dünn-schichtige LB-Platten hergestellt. 10  $\mu$ l des hergestellten Phagen-Lysates wurden auf Top-Agar-Platten aufgetropft. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht waren – sofern die plattierten Bakterien für den/die im Lysat enthaltenen Phagen empfindlich waren – klare Lysehöfe (Plaques) im gewachsenen Bakterienrasen zu sehen. Diese konnten mit einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestanzt und weiter untersucht werden.

### 2.2.5 Amplifikation von DNA durch PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde sowohl zum Nachweis von DNA-Fragmenten als auch zum Synthetisieren von DNA-Sonden und zu klonierenden DNA-Fragmenten eingesetzt. Als Matrize diente entweder gereinigte chromosomale oder Plasmid-DNA, oder es wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Bei letzterer wurde entweder eine Kolonie in 50 µl dH<sub>2</sub>O suspendiert oder aber 50 µl einer bis zur stationären Phase gewachsenen Kultur eingesetzt. Die Bakterien-suspension wurde 5 min bei 100°C aufgekocht, abgekühlt, kurz abzentrifugiert und der Überstand als Matrize eingesetzt.

Zum Nachweis bestimmter DNA-Fragmente und zur Herstellung von DNA-Sonden wurde entweder das „AmpliTaq Gold™“-System von Perkin Elmer/Roche oder die rekombinante Taq DNA Polymerase von Gibco BRL mit den jeweiligen Puffersystemen verwandt. DNA-Fragmente, die zur Klonierung in Expressionskonstrukte eingesetzt werden sollten, wurden mit dem „Expand High Fidelity PCR System“ von Roche, das eine Taq-Polymerase mit 3'-5'-Exonuclease-Korrekturleseaktivität enthält, amplifiziert. Die in dieser Arbeit verwandten Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwandte Oligonukleotide

Ziel/Zweck	Bezeichnung	Sequenz
<u>Hybridisierungs-Sonden (→ 3.1):</u>		
<i>pgtE</i> (tRNA <sup>ArgW</sup> )	<i>pgtE</i> -for	5'-acttcatcacctctccag-3'
	<i>pgtE</i> -rev	5'-ctagaagcggactgcaac-3'
<i>nupC</i> (tRNA <sup>ArgW</sup> )	<i>nupC</i> -for	5'-atggaccgctccttcatt-3'
	<i>nupC</i> -rev	5'-cagacttacagtaccagc-3'
<i>apeE</i> (tRNA <sup>ArgU</sup> )	<i>apeE</i> -for	5'-gcaatatctctgtcggat-3'
	<i>apeE</i> -rev	5'-tgccgactggcgaaatc-3'
STM0557 (tRNA <sup>ArgU</sup> )	STM0557-for	5'-gtgcattgcgacttctg-3'
	STM0557-rev	5'-ggaataggtattcttgggg-3'
<i>sspH2</i> (tRNA <sup>ProL</sup> )	<i>sspH2</i> -for	5'-cacgcggaaggggcatc-3'
	<i>sspH2</i> -rev	5'-gctggtcagttgattacc-3'
<i>msgA</i> (tRNA <sup>ProL</sup> )	<i>msgA</i> -for	5'-tttcgtcaggcttgcac-3'
	<i>msgA</i> -rev	5'-tcatttacctgccactgc-3'
<i>vexA</i> (tRNA <sup>ProL</sup> )	<i>vexE</i> -for	5'-ccaaatcccaccgaaag-3'
	<i>vexE</i> -rev	5'-caaccaccctactcaaac-3'
<i>pilV</i> (tRNA <sup>PheU</sup> )	<i>pilV</i> -for	5'-acatgatggcggcttgtg-3'
	<i>pilV</i> -rev	5'-gccaggtaagttcaaacag-3'
<i>recA</i>	<i>recA</i> -for	5'-atggctatcgacgaaaac-3'
	<i>recA</i> -rev	5'-cgtagtttctgctacgc-3'
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -for	5'-aaagtcctgaaagggctg-3'
	<i>gyrB</i> -rev	5'-cgatattcgccgcttca-3'
<u>Hybridisierungs-Sonden (→ 3.2.2):</u>		
<i>sifA</i>	SifA-Rev-EcoRV	5'-acggatatcaaaacaacataaacagccgc-3'
	SifA-For-EcoRI	5'-ccggaattcattttactccagtataag-3'
<i>sifB</i>	SifB-For-EcoRI	5'-ccggaattcatataatcacttgggtc-3'
	SifB-Rev-EcoRV	5'-acggatatcactctggtgatgagcctc-3'
<i>sseI</i>	SseI2-For	5'-taaccatggcaacagaaccg-3'
	SseI-Rev-EcoRV	5'-acggatatccattttacctattaagga-3'

Tabelle 4 (Fortsetzung)

<i>sseJ</i>	SseJ-For- <i>EcoRI</i>	5'-ccggaattcgtaaggaggacactatgcc-3'
	SseJ-Rev- <i>EcoRV</i>	5'-acggatatcttcagtggaataatgatgagc-3'
<u>Hybridisierungs-Sonden (→ 3.3.2):</u>		
<i>ydhE</i>	Del31-A	5'-cctggcacaagcaccag-3'
	Del31-B	5'-cgattgcgctggcgct-3'
<i>ssaT</i>	<i>ssaT</i> -for	5'-ccggcagataatgttacg-3'
	<i>ssaT</i> -rev	5'-gctcatacagatggaaac-3'
<u>Hybridisierungs-Sonden (→3.2.1.1)</u>		
<i>fim</i>	Fim1-for	5'-gccgacaggatgccgaaacc-3'
	Fim1-rev	5'-cgtgagaagaacaataaagc-3'
Vi-Antigen	Vi-Antigen-for	5'-tatgttgggcttctctggcag-3'
	Vi-Antigen-rev	5'-ataagttcggcgatctgtgcgg-3'
<i>lpf</i>	Lpf-for	5'-gtttccacttctgctttcgctg-3'
	Lpf-rev	5'-catgattcttctctgagcctcc-3'
<i>sipC</i>	SPI1-1	5'-ctcggatcccgccgcttattta-3'
	SPI1-5	5'-tgaaagcttaagcgcgaatattgcc-3'
<i>sopB</i>	SopB-for	5'-tgctctagacatgcaaatacagagcttctatca-3'
	SopB-rev	5'-aagcttggcataaaggacagcaca-3'
<i>sseB</i>	SseB-for	5'-attggatccggtggagataccgtc -3'
	<i>sseB</i> -rev	5'-tatggatcctgtttagggctcggg -3'
<i>spv</i>	Spv-for	5'-ccgacagttagcgattaccgttc-3'
	Spv-rev	5'-tgagcgttgaaccagcacttc-3'
<i>mgtB</i>	MgtB-for	5'-tggagcatcatctggatgtgagc-3'
	MgtB-rev	5'-cctctacgttattagccgcaaagac-3'
<i>gln</i>	Gln-for	5'-ggatccaagcaacagatcggc-3'
	Gln-rev	5'-gtcgacttattccaaccattcgg-3'
<u>Deletionen (→ 3.1):</u>		
	<i>pgtE</i> -Red-Del-for	5'-tcggccggttatgaccgatgacatcccgatgtggctcagtgtaggctggagctgcttc-3'
	<i>pgtP</i> -Red-Del-rev	5'-aatgtcggcgcttctgttccccaggaaggctaactcgtttcatgaatatcctccttag-3'

Tabelle 4 (Fortsetzung)

	<i>ykgD</i> -Red-Del-for	5'-cgctggtgtacaaccgaattcacggacaaaagcttgg- gtgtaggctggagctgcttc-3'
	<i>apeE</i> -Red-Del-rev	5'-gtcatcaaaatcgggcgctaaaccaacgttataacg- ggcatatgaatatcctccttag-3'
	SPI2-Red-Del-for	5'-ccatacgaacaaggctgcaacgggtcaaataacggt- tcagggtgtaggctggagctgcttc-3'
	SPI2-Red-Del-rev	5'-gtagcttttcgctgatcccatgattggtatacccctcgcca- tatgaatatcctccttag-3'
	K <sub>1</sub> -red-del	5'-cagtcatagccgaatagcct-3'
	K <sub>2</sub> -red-del	5'-cggtgccctgaatgaactgc-3'
	C <sub>1</sub> -red-del	5'-ttatacgaaggcgacaagg-3'
	C <sub>2</sub> -red-del	5'-gatctccgctcacaggtagg-3'
<u>tRNA-Insertionspunkt-Analyse (→ 3.1):</u>		
tRNA <sup>ArgU</sup>	tRNA-ArgU-for	5'-gagtgactttgtctgctc-3'
	tRNA-ArgU-rev	5'-gatgtcccaaatatgtccc-3'
tRNA <sup>ArgW</sup>	tRNA-ArgW-for	5'-ctggagcgactttctctg-3'
	tRNA-ArgW-rev	5'-cgtatthttggtggcgtg-3'
tRNA <sup>ProL</sup>	tRNA-ProL-for	5'-cgacaggatggtaatc-3'
	tRNA-ProL-rev	5'-gtaacaggctggttcttc-3'
tRNA <sup>PheU</sup>	tRNA-PheU-for	5'-cataggctgggtttctg-3'
	tRNA-PheU-rev	5'-ccactcgacacattacag-3'
<u>Sequenzierungen</u>		
	T3	5'-ttaattgggagtgattcc-3'
	T7	5'-taatacgaactcactataggg-3'

## 2.2.6 Deletionen mit dem „One-Step Inactivation System“ (Datsenko & Wanner, 2000)

Zur Erzeugung von chromosomalen Deletionen wurde das „One-Step Inactivation System“ von Datsenko und Wanner (2000) eingesetzt. Oligonukleotide, die zur PCR-Amplifikation der Antibiotikaresistenz-Kassetten aus den Plasmiden pKD3 (*cat*-Kassette) und pKD4 (*aph*-Kassette) eingesetzt wurden, hatten 20 komplementäre Bp zu eben diesen Plasmiden und ca. 38-40 komplementäre Bp zu den Flanken der DNA-Sequenz, die deletiert werden sollte. Diese Oligonukleotide wurden durch HPLC

gereinigt (Metabion, München). Mit pKD3 bzw. pKD4 als Matrize wurden die Resistenzkassetten mit dem „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche) über PCR amplifiziert (s. 2.2.5). Die PCR-Produkte wurden gereinigt („PCR purification Kit“, Qiagen), mit *DpnI* verdaut und über ein Agarose-Gel erneut gereinigt („Gel extraction Kit“, Qiagen).

Hierzu wurden 50 ml einer *S. enterica* Serovar Typhimurium-Kultur, die das Plasmid pKD46 mit temperatursensitivem Replikationsursprung (*ori*) und dem Red-Rekombinase-System unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trägt, bei 30°C mit 0,2% Arabinose unter Antibiotika-Selektion im Schüttelwasserbad bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden durch dreimaliges Waschen in eiskaltem 10%igem Glycerin und 100-facher Konzentration elektrokompent gemacht. 40 µl elektrokompente Zellen wurden mit 1-3 µl (~ 1 µg DNA) *DpnI*-verdautem PCR-Produkt elektroporiert, mit 1 ml LB versetzt und nach 1 h Inkubation bei 37°C auf LB-Platten mit Antibiotika-Selektion plattiert. Klone wurden hinsichtlich der Insertion der jeweiligen Antibiotika-Kassette und damit der Deletion des entsprechenden DNA-Fragmentes durch Sequenzierung überprüft (s. 2.2.7). Die Mutanten wurden mittels P22-Transduktion in einen frischen Stammhintergrund übertragen (s. 2.2.3), um eventuelle unspezifische Mutationen, die durch die Rekombinase hervorgerufen worden sein könnten, zu umgehen.

### 2.2.7 DNA-Sequenzierungen

Zur Überprüfung der chromosomalen Deletionen, die mit dem „One-Step Inactivation System“ (Datsenko & Wanner, 2000) hergestellt wurden, wurden DNA-Bereiche, die sowohl den angrenzenden chromosomalen Bereich als auch einen Teil der inserierten Antibiotika-Kassetten umfassen, sequenziert. Hierzu wurde das „Big Dye Terminator Cycle Seq Kit“ und das Kapillarsequenziergerät „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ von Applied Biosystems verwendet. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm „SeqMan“ aus dem Software-Paket „DNA-Star“ der Firma Lasergene und anschließend über das Programm „Gene Construction Kit 2“ der Firma Textco.

### 2.2.8 Southern-Blot-Hybridisierungen

Restringierte chromosomale DNA wurde durch Kapillar-Blot (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine positiv geladene „Hybond N<sup>+</sup>-Membran“ (Amersham) transferiert und mit

UV-Licht fixiert. Die Hybridisierungen wurden entweder mit einem Phosphatpuffer-System (a) oder bei geringer Stringenz mit einem Citratpuffer-System (b) durchgeführt. In beiden Fällen wurde zur Markierung der Sonden und zur Detektion das „DIG Lumineszenz Detection Kit“ (Roche) verwendet. Bei (a) wurde die Hybridisierung über Nacht bei 42°C mit 50% Formamid in 1 x Hybridisierungspuffer (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS) bzw. bei 65°C in 1 x Hybridisierungspuffer ohne Formamid durchgeführt. Die Membran wurde anschließend 2 x 20 min bei der Hybridisierungstemperatur in Waschpuffer I (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1 mM EDTA; 2% SDS) und 2 x 20 min bei der Hybridisierungstemperatur in Waschpuffer II (40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1 mM EDTA; 1% SDS) gewaschen.

Bei (b) wurde die Membran in Hybridisierungspuffer (5 x SSC; 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin; 0,02% (w/v) SDS; 1% (w/v) DIG-Blockierungsreagenz) bei 50°C über Nacht hybridisiert und anschließend 2 x 5 min mit großen Volumina an 2 x SSC, 0,1% SDS bei RT und 2 x 15 min mit großen Volumina an 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 50°C gewaschen.

Die Detektion erfolgte in (a) und (b) gemäß Anleitung des Herstellers (Roche).

### 2.2.9 Kolonie-Blot

Zur Analyse der Cosmidbank hinsichtlich des Vorhandenseins von Klonen mit der gesamten SPI2 wurden sämtliche Cosmidbank-Klone aus 10 Mikrotiterplatten mit je 96 Kavitäten auf 10 Nylon-Membranen (Zeta-Plus GT<sup>®</sup>, BioRad) überstempelt. Die Membranen wurden auf LB-Platten mit Antibiotika-Selektion gelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die auf der Membran gewachsenen Kolonien wurden jeweils 5 min mit Lösung 1 (10% SDS) und danach mit Lösung 2 (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) lysiert. Nach der Neutralisation durch Inkubation für 5 min mit Lösung 3 (1,0 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) und einer weiteren Inkubation für 5 min mit 4 x SET (200 mM NaCl; 4 mM EDTA; 80 mM Tris-HCl, pH 7,8) wurde die DNA durch 1 h Lufttrocknung und 2 h Backen bei 80°C auf der Membran fixiert. Durch einstündige Inkubation bei 37°C in einer Lösung aus 1 x SSC, 0,5% SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K und anschließendem Überführen der Membran in eine Lösung aus 2 x SSC und 0,1% SDS wurden die Bakterienreste durch zusätzliches mechanisches Abreiben entfernt. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen und bei RT getrocknet.

Die anschließende Hybridisierung und Detektion erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

## 2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

### 2.3.1 Western-Blot-Analyse

#### 2.3.1.1 SDS-PAGE

1 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurde auf  $OD_{600} = 1,0$  eingestellt, sedimentiert, in 100  $\mu$ l Lysispuffer (12,5% Glycerin; 4% SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau; auf pH 6,8 eingestellt) aufgenommen und 5 min bei 100°C aufgeköcht. Nach Abzentrifugieren für 30 min bei 20 000 x g wurde der Überstand abgenommen und die Proteine - je nach Masse des gesuchten Proteins - über 10-12% SDS-Polyacrylamidgele nach Schagger und von Jagow (1987) oder Laemmli (1970) aufgetrennt.

#### 2.3.1.2 Protein-Transfer und Immunodetektion

Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel) mit einer Porengröße von 0,2-0,4  $\mu$ m transferiert (Towbin *et al.*, 1979), mit Ponceau S-red-Lösung (0,5% Ponceau S-red, 1% Essigsäure; Sigma) reversibel gefärbt und anschließend 1 h in TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1% Tween 20) + 5% BSA blockiert. Die Primär-Antikörper (2.4.3.1) wurden für jeweils 1 h in TBS-T + 0,5% BSA eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS-T wurden die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (Dianova) ebenfalls für jeweils 1 h in TBS-T + 0,5% BSA inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper-gebundenen Proteine mit dem „ECL-Chemilumineszenz-Detektions-Kit“ (Amersham) detektiert.

#### 2.3.1.3 Entfernung von membrangebundenen Antikörpern

Zum Entfernen der Antikörper von Protein-Membranen wurden Nitrozellulose-Membranen 30 min in TCA-Lösung (5% w/v in H<sub>2</sub>O) geschwenkt. Anschließend wurden sie 3 x in PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und erneut zur Immuno-Detektion eingesetzt.

### 2.3.2 Abwasch und Fällung von Protein-Oberflächenstrukturen

Zur Analyse von potentiell auf die Bakterienoberfläche sekretierten Proteinen wurden diese von der Bakterienoberfläche abgewaschen und aufgereinigt. Hierzu wurden 100-400 ml Kultur in induzierendem Medium (PCN-P, pH 5,8) über Nacht in einem Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 37°C mit einer Agitation von 200 upm angezogen. Die Zellen wurden 20 min bei 6000 x g sedimentiert und in 20 ml PBS resuspendiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm Filter filtriert und auf Eis aufbewahrt (→ Überstandsproteine). Das Sediment wurde in einem Zentrifugenröhrchen mit 50 ml Fassungsvermögen in 5 ml PBS resuspendiert und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit mit einem „Vortex-Genie 2“ (Scientific Industries) geschüttelt, um adhärierte Oberflächenstrukturen abzuscheren. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand (→ Abwasch-Fraktion) durch einen 0,2 µm Filter filtriert, um restliche Bakterien (→ Gesamtzelllysat) abzutrennen. Das Protein der Überstands- und der Abwaschfraktion wurde nach Zusatz von TCA (10% w/v Endkonzentration) durch eine Inkubation von 3 h auf Eis gefällt und anschließend bei 12 000 x g für 45 min sedimentiert. Das Sediment wurde 2 x mit je 15 ml Aceton gewaschen, bei 10 000 x g für 30 min zentrifugiert und dann luftgetrocknet. Um restliche Salze zu entfernen, wurde eine Methanol-Chloroform-Präzipitation durchgeführt. Hierzu wurde das Sediment in 0,1 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 0,4 ml Methanol versetzt und 10 s bei 9000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurde die Suspension gemischt und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Zur Phasentrennung wurden 0,3 ml ddH<sub>2</sub>O zugegeben, die Probe gut gemischt und 10 s bei 9000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. 0,3 ml Methanol wurden zu der verbleibenden Chloroform-Phase und der proteinhaltigen Interphase zugegeben. Nach dem Mischen erfolgte eine neuerliche Zentrifugation bei 9000 x g für 2 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment Vakuum-getrocknet. Danach wurde das getrocknete Protein-Sediment in SDS-PAGE-Lysispuffer aufgenommen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.3.1).

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen und Infektionsversuche

Zur Analyse der Interaktion von Bakterien mit eukaryontischen Wirtszellen wurden Zellkulturen der humanen Epithelzelllinie HeLa sowie die aus BALB/c-Mäusen stammenden Monozyten-Zelllinien RAW264 und J774.A1 verwendet. Die Zellen wurden in Kulturmedium („Dulbeccos Modified Eagle Medium“, DMEM, mit 10% FCS und 1% Glutamin, ohne Antibiotika-Zusatz) bei 10% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden mit oder ohne Deckgläschen in einer 24-Kavitäten-Schale mindestens 24 h vor dem Infektionsversuch ausgesät, um eine optimale Adhärenz zu ermöglichen. Die ausgesäte Zelldichte wurde so gewählt, dass der Zellrasen zum Infektionszeitpunkt semi-konfluent war.

Zur Infektion von Makrophagen wurden die Bakterien über Nacht in LB-Flüssigkultur angezogen und mit PBS so verdünnt, dass ein gewünschtes Mengenverhältnis von Bakterien zu Makrophagen („multiplicity of infection“, MOI) erreicht wurde.

Zur Infektion von Epithelzellen (HeLa) wurden die Bakterien nach Inkubation über Nacht 1:30 in LB verdünnt und für weitere 3 h bei 37°C inkubiert, um die Bakterien durch Wachstum in der logarithmischen Phase invasiv zu machen. Diese Bakterien wurden dann mit entsprechender MOI zu den Epithelzellen gegeben.

Nach Zugabe des Inokulums wurden Bakterien und eukaryontische Zellen durch Zentrifugieren bei 1200 x g für 5 min bei RT in Kontakt gebracht, um eine synchronisierte und effiziente Infektion zu erreichen. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit DMEM gewaschen. Im Gentamicin-Schutz-Versuch wurden die Zellen anschließend in Kulturmedium mit Zusatz von Gentamicin (100 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde das Medium abgenommen und durch Kulturmedium mit Zusatz von 10 µg/ml Gentamicin ersetzt. Anschließend wurden die Zellen, je nach Versuchsanforderungen, für einen Zeitraum von 4-21 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### 2.4.2 Evaluierung der intrazellulären Replikation

Um das intrazelluläre Überleben und Replizieren von Bakterien zu untersuchen, wurden eukaryontische Zellen mit Bakterien infiziert (s. 2.4.1). Nach gegebenen Zeitpunkten (beispielsweise 0, 2, 8 und 21 h) wurden die eukaryontischen Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 1% Triton-X-100 in PBS lysiert. Das Lysat

wurde in PBS verdünnt und auf LB-Agar ausplattiert, so dass die Anzahl intrazellulärer Bakterien zum jeweiligen Zeitpunkt nach Infektion durch Auszählen der cfu bestimmt werden konnte.

### 2.4.3 Detektion von Protein-Translokation durch Immunfluoreszenz

Eukaryontische Zellen (Makrophagen oder HeLa-Zellen) wurden auf Deckgläschen ausgesät und bis zur Semi-Konfluenz angezogen. Sie wurden mit einer MOI von 5-200 mit Bakterien infiziert (s. 2.4.1). Nach gegebenen Zeitpunkten (8-21 h) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit 3,7% PFA bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Behandlung mit den jeweiligen Antikörpern. Diese wurden entsprechend in Blockierlösung (PBS; 10% Ziegenserum; 1% BSA; 0,1% Saponin) verdünnt und auf die Deckgläschen pipettiert (200 µl/Kavität). Die verwendeten Primär-Antikörper sind in ihren jeweils eingesetzten Verdünnungen im Abschnitt 2.4.3.1 aufgelistet.

Die jeweiligen Sekundär-Antikörper (Jackson Immuno Research) waren mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt (FITC für grün; Cy2 für grün; Cy3 für rot; Cy5 für blau) und wurden in Verdünnungen von 1:100 bzw. 1:1000 eingesetzt. Sämtliche Primär- und Sekundär-Antikörper wurden 1 h bei RT inkubiert, mit Ausnahme von  $\alpha$ -M45, der 3 h inkubiert wurde. Zwischen jedem Antikörper-Wechsel wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Nach der Immunfärbung wurden die Deckgläschen mit Fluoprep (BioMérieux, Marcy l'Étoile/Frankreich) auf Objektträger aufgebracht, mit Entellan (Merck, Darmstadt) luftdicht verschlossen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop (Zeiss „Axiophot“ mit „Meta Imaging Series 4.6“-Software“) oder eines konfokalen Laser-Mikroskops (Leica „DMBR“ mit „Leica TCS-NT-Software“) analysiert.

#### 2.4.3.1 In Western-Blot und Immunfluoreszenz eingesetzte Primärantikörper

Folgende Primärantikörper wurden sowohl in Western-Blot-Analysen (→2.3.1.2) als auch in der Immunfluoreszenz (→2.4.3) eingesetzt:

- $\alpha$ -SseB: Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gegen rekombinantes SseB gerichtet; in der Verdünnung 1:20 000 – 1:30 000 eingesetzt
- $\alpha$ -SsaP: Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gegen rekombinantes SsaP gerichtet; in der Verdünnung 1:10 000 eingesetzt

- $\alpha$ -HSP 60: Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gegen rekombinantes HSP 60 gerichtet; in der Verdünnung 1:400 eingesetzt
- $\alpha$ -M45: Monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridoma-Zelllinie, gegen das M45-Epitop des Adenovirus-Proteins E4-6/7 gerichtet (Obert *et al.*, 1994); in der Verdünnung 1:1 bis 1:10 eingesetzt
- $\alpha$ -*S. enterica* Serovar Typhimurium: Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, gegen O1, 4, 5, 12 aus *S. enterica* Serovar Typhimurium gerichtet; in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt.
- $\alpha$ -*S. bongori*: Polyklonales Antiserum aus Maus, gegen O48 aus *S. bongori* gerichtet; in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt (Sifin, Berlin).
- $\alpha$ -LAMP-1: Monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridoma-Zelllinie, gegen humanes lysosomal-assoziiertes Membranprotein 1 (LAMP-1) gerichtet (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa); in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt.
- $\alpha$ -F-Aktin: Texas-Red-konjugiertes Phalloidin; in der Verdünnung 1:200 eingesetzt (Molecular Probes).

## 2.5 Mausinfektionsmodell

Infektionsversuche wurden in den *Salmonella*-suszeptiblen Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 durchgeführt. Die Infektion der Tiere erfolgte oral oder intraperitoneal mit einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur. Zur oralen Infektion wurde den Tieren 10 h vor Infektion keine Flüssigkeit mehr gegeben und zur Neutralisation der Magensäure etwa 30  $\mu$ l 10% NaCO<sub>3</sub> in PBS verabreicht. Nach 30 min wurden die Mäuse über eine Pipettenspitze mit dem Inokulum (200  $\mu$ l mit  $1 \times 10^9$  cfu/ml) oral infiziert. Bei intraperitonealer Infektion wurde den Mäusen 200  $\mu$ l ( $1 \times 10^4$  Bakterien/Inokulum) Bakteriensuspension in PBS in das Peritoneum (Bauchhöhle) injiziert. Nach der Infektion wurden die Tiere ständig beobachtet und nach 2-3 Tagen getötet. Teile von Milz und Leber wurden entnommen und in PBS homogenisiert. Anschließend wurden serielle Verdünnungen auf LB-Agar plattiert.

## 2.6 Bioinformatik

### 2.6.1 Datenbankrecherchen und Sequenzabgleiche

Informationen über DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und den dort zur Verfügung gestellten BLAST-Algorithmen eingezogen. Zur molekularbiologischen Analyse der tRNA-assoziierten Insertionen wurden mehrere Datenbanken herangezogen. Die Sequenziergruppe am „Sanger Center“ stellte die Daten von *S. enterica* Serovar Typhi CT18 zur Verfügung (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/st/St.dna>), die Universität von Wisconsin/Madison und die Universität Giessen die Daten für *E. coli* K-12 und EHEC 0157:H7 (<http://www.genome.wisc.edu> und <http://susi.bio.uni-giessen.de>) und das „Genome Sequencing Center“ an der Universität Washington, St. Louis die Daten für *S. enterica* Serovar Typhimurium LT2 (<http://genome.wustl.edu/gsc/Projects/bacteria.shtml>). Zur Auswertung der Genomsequenzen wurde das Software-Paket Artemis, Version 3.0 und das DNA-Bearbeitungsprogramm GCK, Version 2.0 angewandt. Die Analyse der Basenpaarzusammensetzung verschiedener chromosomaler Regionen erfolgte mit Hilfe des Programms MacVector, Version 6.0.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Identifizierung *Salmonella*-spezifischer chromosomaler Regionen

Während der Evolution hat *S. enterica* eine große Anzahl an Virulenzgenen erworben, deren Produkte zu verschiedenen Zeitpunkten der Pathogenese von Bedeutung sind und die sich oft auf Pathogenitätsinseln finden (Hacker *et al.*, 1997; Groisman & Ochman, 1997). Ein häufig beobachtetes Charakteristikum für Pathogenitätsinseln ist ihre Insertion an den hochkonservierten tRNA-Genen. Dies konnte sowohl bei SPI2, SPI3, SPI4 und SPI5 in *Salmonella* als auch bei zahlreichen Pathogenitätsinseln anderer Erreger wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob es noch weitere tRNA-assoziierte Elemente gibt, die möglicherweise über horizontalen Gentransfer in das Genom von *Salmonella* gelangt sein könnten.

#### 3.1.1 Identifizierung neuer *Salmonella*-spezifischer DNA-Elemente

Die Sequenzen von ungefähr 80 tRNA-Genen aus der *E. coli* K-12-Genom-Datenbank wurden sowohl mit den tRNA-Sequenzen aus der *S. enterica* Serovar Typhimurium LT2-Datenbank als auch mit der *S. enterica* Serovar Typhi CT18-Datenbank verglichen. Von jeweils 2 kBp auf jeder Seite der tRNA wurden die Genome von *E. coli* und *S. enterica* auf eine unterschiedliche genetische Zusammensetzung überprüft. Dabei wurden etwa 20 Regionen in tRNA-Nähe gefunden, die in beiden Gattungen unterschiedlich organisiert waren. Diese wurden näher untersucht, indem 6 bis 8 kBp dieser Regionen mit der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) unter Verwendung des BLAST-Algorithmus analysiert wurden. Besonderes Augenmerk wurde auf Sequenzen gelegt, die einen Bezug zu mobilen Elementen wie Insertionssequenzen oder Phagen hatten oder eine mögliche Relevanz in der Virulenz aufwiesen. Der Sequenzvergleich der unterschiedlichen tRNA-assoziierten Insertionen in beiden *S. enterica*-Serovaren und *E. coli* K-12 sowie EHEC 0157:H7 resultierte in der Identifizierung sowohl diverser bekannter Virulenzgene als auch neuer *Salmonella*-spezifischer Insertionen. Mit diesem Ansatz konnten bereits bekannte tRNA-assoziierte PAI wie beispielsweise die tRNA<sup>SeI<sup>C</sup></sup>-assoziierte PAI I von *E. coli*

respektive die an dem entsprechenden tRNA-Gen inserierte SPI3 aus *Salmonella* wiedergefunden werden (Blum *et al.*, 1994; Blanc Potard & Groisman, 1997). Ebenso wurden die *Salmonella*-spezifischen PAI SPI2 und SPI5 an den Genloci der tRNA<sup>ValV</sup> bzw. tRNA<sup>SerX</sup> gefunden.

### 3.1.2 Charakterisierung der neuen tRNA-assoziierten genomischen Insertionen in *Salmonella*

In den untersuchten *S. enterica*-Serovaren Typhi und Typhimurium sowie in den beiden *E. coli*-Stämmen K-12 und 0157:H7 sind jeweils vier spezifische Genomregionen gefunden worden, die in unmittelbarer Nähe zu tRNA-Genen liegen. Sie zeigen Merkmale horizontal erworbener DNA-Segmente und besitzen Elemente wie Transposasen, Integrasen oder Phagenschwanz-Proteine, die Hinweise auf Mobilität geben. Die Insertionen, die in den unterschiedlichen Genomen am gleichen tRNA-Gen inseriert sind, sind in ihrer Zusammensetzung und Größe sehr variabel, wobei letztere zwischen 6 und 147 kBp schwankt (Tab. 5).

Tab. 5: Merkmale der tRNA-assoziierten Regionen in *Salmonella* spp. und *E. coli*

tRNA-Gen	Stamm oder Spezies	Größe der Insertion	Ort der Insertion	Bezeichnung
ProL	<i>S. Typhi</i>	6,3 kBp	48 cs	
	<i>S. Typhimurium</i>	15,8 kBp	48 cs	
	<i>E. coli</i> K-12	4,2 kBp	49 cs	
	<i>E. coli</i> 0157:H7	3,0 kBp	24 cs	
ArgU	<i>S. Typhi</i>	15,6 kBp	13 cs	
	<i>S. Typhimurium</i>	23,4 kBp	13 cs	
	<i>E. coli</i> K-12	40,0 kBp	12-13 cs	
	<i>E. coli</i> 0157:H7	30,1 kBp	12 cs	

Tabelle 5 (Fortsetzung)

ArgW	S. Typhi	35,7 kBp	52 cs	
	S. Typhimurium	30,0 kBp	52 cs	
	<i>E. coli</i> K-12	58,7 kBp	53-54 cs	
	<i>E. coli</i> 0157:H7	57,2 kBp	28 cs	
PheU	S. Typhi	146,9 kBp	91-94 cs	ViaB-Region
	S. Typhimurium	15,0 kBp	94 cs	
	<i>E. coli</i> K-12	10,9 kBp	94 cs	
	<i>E. coli</i> 0157:H7	10,9 kBp	63 cs	

### 3.1.2.1 Die genetische Organisation der tRNA<sup>ProL</sup>-Region

In der Nähe des tRNA<sup>ProL</sup>-Gens in den Chromsomen der *S. enterica* Serovare Typhimurium und Typhi wurde das Gen *sspH2*, dessen Produkt als transloziertes Effektorprotein des TTSS von SPI2 in Serovar Typhimurium beschrieben worden ist (Miao *et al.*, 1999), identifiziert (Abb. 6).

SspH2 ist spezifisch für *Salmonella* und stellt im Kälber-Infektionsmodell einen Virulenzfaktor von *S. enterica* Serovar Typhimurium dar (Miao *et al.*, 1999). Die stromabwärts von *sspH2* liegende Region ist dabei in beiden Serovaren unterschiedlich organisiert: Während *sspH2* im Serovar Typhi direkt am tRNA-Gen inseriert ist, liegen zwischen dem tRNA-Gen im Serovar Typhimurium und dem Gen *sspH2* noch Gene, die für Phagenproteine, eine *Salmonella*-spezifische O-Antigen-Acetylase und eine putative Peptidase kodieren. An demselben tRNA-Gen ist in beiden Stämmen von *E. coli* ein Gen für eine putative ATP-Bindungskomponente eines Transportsystems (*yejO*) lokalisiert. Zusätzlich findet sich in *E. coli* K-12, nicht aber in *E. coli* 0157:H7 in unmittelbarer Nachbarschaft von *yeyO* ein Gen für eine Transposase.

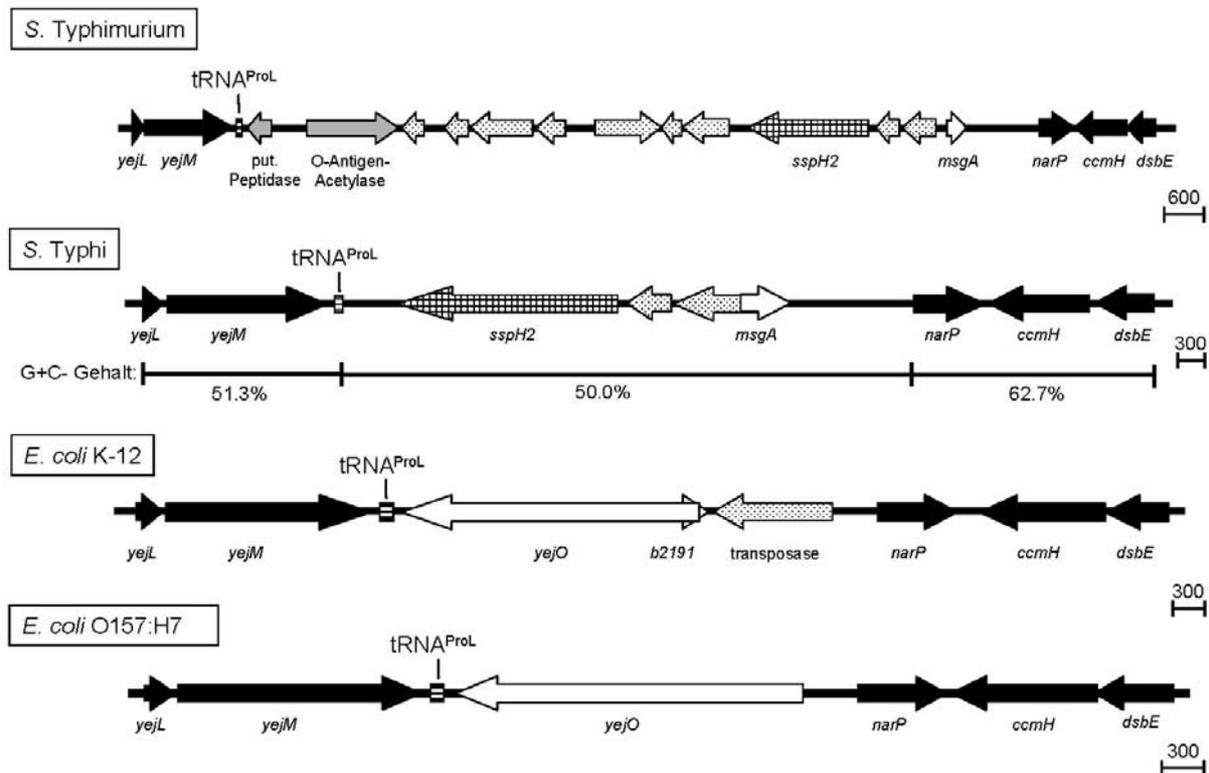


Abb. 6: Genetische Organisation der tRNA<sup>ProL</sup>-assoziierten Region.

Die genetische Organisation der chromosomalen Regionen rund um tRNA-Gene in den *S. enterica*-Serovaren Typhi und Typhimurium wurden mit den entsprechenden Regionen der Genome von *E. coli* K-12 und *E. coli* O157:H7 verglichen. Gene, die den *E. coli*-Stämmen und *Salmonella*-Spezies gemeinsam sind, wurden in schwarz gekennzeichnet. Gene, die nur innerhalb der *E. coli*-Stämme bzw. der *Salmonella*-Spezies gleich sind, wurden durch offene Symbole markiert, während spezifische Gene, die nur innerhalb eines Stamms bzw. einer Spezies vorkommen, in grau gezeichnet sind. Gene, deren Produkte mit Virulenz-Funktionen assoziiert sind, sind kariert, tRNA-Gene gestreift, und Gene mit Ähnlichkeiten zu mobilen Elementen wie Phagen, Transposons und IS-Elementen gepunktet dargestellt. Die Basenzusammensetzung der jeweiligen Regionen im Chromosom von *S. enterica* Serovar Typhi wurden analysiert und als % G+C dargestellt.

### 3.1.2.2 Die genetische Organisation der tRNA<sup>ArgU</sup>-Region

Die Regionen am tRNA<sup>ArgU</sup>-Gen zwischen dem Fimbrien-Operon (*fimHFZ*) und dem *nfnB*-Gen sind in *Salmonella* spp. und *E. coli*-Stämmen sehr unterschiedlich organisiert (Abb. 7). In *S. enterica* Serovar Typhimurium ist zwischen dem *Salmonella*-spezifischen *apeE*-Gen und dem *nfnB*-Gen ein Gen-Komplex inseriert, der für ein Phosphotransferase-System kodiert. In *S. enterica* Serovar Typhi fehlt der gesamte Phosphotransferase-Genkomplex an dieser Stelle und ist an einem anderen Locus inseriert.

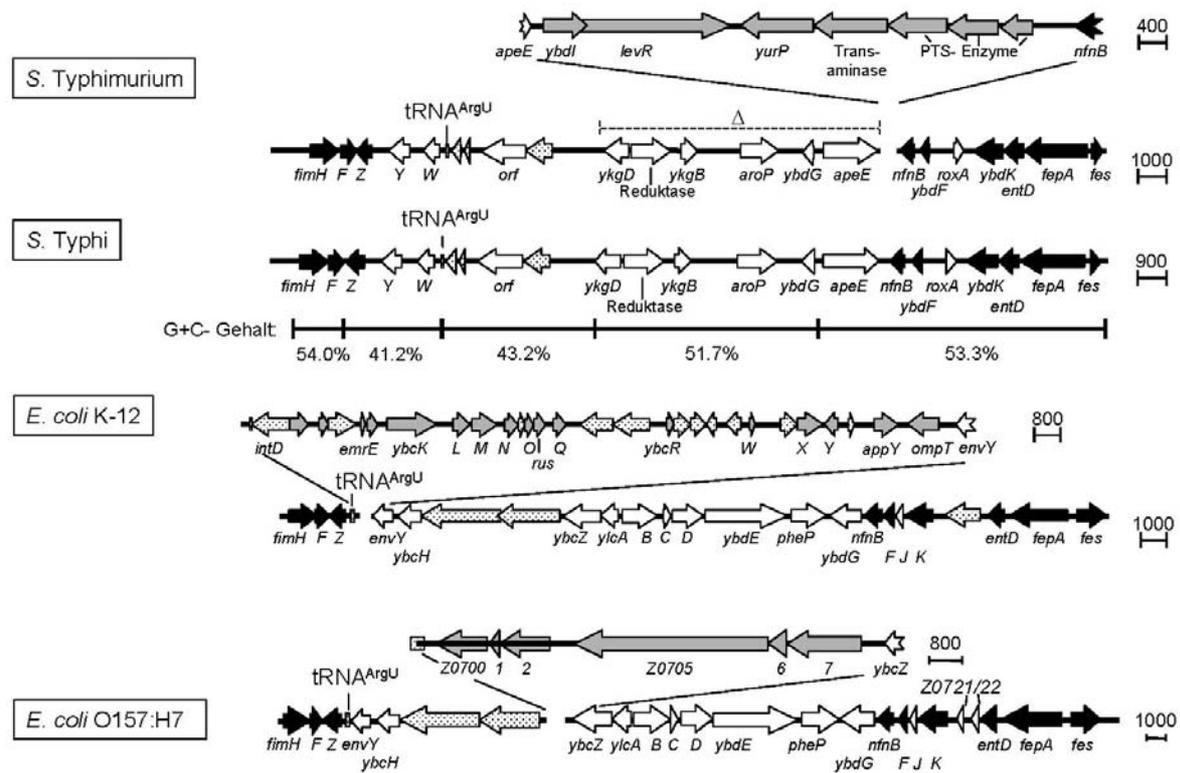


Abb. 7: Genetische Organisation der  $tRNA^{ArgU}$ -assoziierten Region (vgl. Legende zu Abb. 6).

Eine unterschiedliche genetische Organisation wurde auch in direkter Nähe der  $tRNA^{ArgU}$ -Gene in beiden *E. coli*-Stämmen beobachtet. Zusätzlich zu einigen nicht weiter differenzierten offenen Leserahmen (ORFs) enthält das zwischen dem Locus der  $tRNA^{ArgU}$  und *envY* gelegene DNA-Fragment in *E. coli* K-12 zahlreiche Gene, die Phagenproteine kodieren. In *E. coli* O157:H7 findet sich ebenfalls ein DNA-Fragment, das an derselben Stelle in *E. coli* K-12 nicht vorhanden ist (ORFs Z0700-Z0707).

### 3.1.2.3 Die genetische Organisation der $tRNA^{ArgW}$ -Region

Das Gen *yfdC* ist in allen untersuchten Stämmen direkt neben dem Gen für die  $tRNA^{ArgW}$  lokalisiert (Abb. 8). Es ist von *yfeR*, dem nächsten stromabwärts gelegenen ORF, der sowohl den *S. enterica*-Serovaren Typhimurium und Typhi als auch den *E. coli*-Stämmen K-12 und O157:H7 gemeinsam ist, durch Spezies-spezifische Insertionen von 30 bis 59 kBp getrennt. Die genetische Organisation dieser Insertionen ist bei allen vier bakteriellen Genomen sehr unterschiedlich. So findet sich das Operon *pgtABCEP*, dessen Gen *pgtE* für eine Protease der äußeren Membran kodiert, im Serovar Typhimurium direkt am  $tRNA^{ArgW}$ -Gen. Im Gegensatz dazu wird im Serovar

Typhi das  $tRNA^{ArgW}$ -Gen durch die Gene von vier Phagen-Proteinen und einer O-Antigen-Acetylase vom *pgtABCEP*-Genkomplex getrennt. PgtE fördert die Resistenz gegenüber alpha-helikalen antimikrobiellen Peptiden, die als Defensine dem angeborenen Immunsystem angehören. Das funktionelle PgtE trägt somit zur Resistenz von *Salmonella* gegen den Mechanismus der angeborenen Immunität bei (Guina *et al.*, 2000). Stromabwärts von *pgtP* finden sich in beiden *Salmonella*-Serovaren bis auf ein zusätzliches Phagen-kodierendes Gen stromabwärts von *ddg* in Serovar Typhi die gleichen Gene.

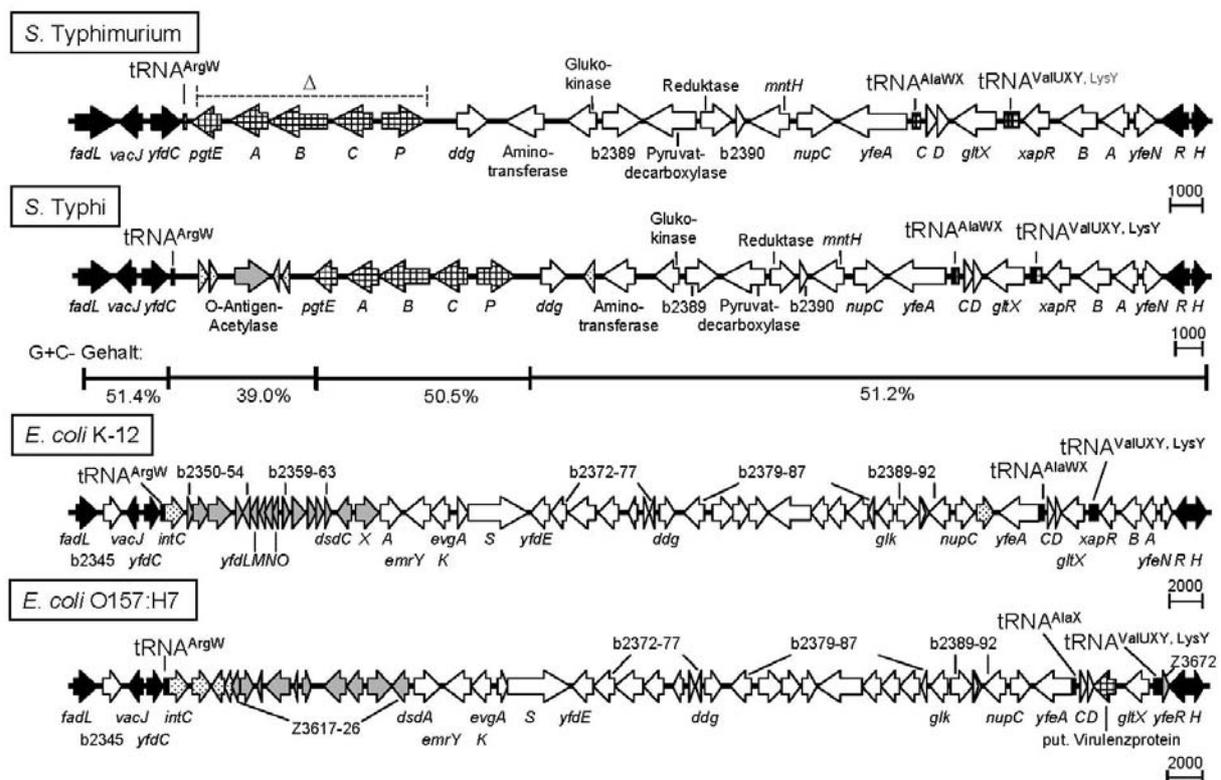


Abb. 8: Genetische Organisation der  $tRNA^{ArgW}$ -assoziierten Region (vgl. Legende zu Abb. 6).

In den beiden *E. coli*-Stämmen konnten erhebliche Unterschiede in der Gen-Anordnung nahe dem Locus der  $tRNA^{ArgW}$  beobachtet werden. Keiner enthielt das *pgt*-Operon, und auch die Gene zwischen dem  $tRNA^{ArgW}$ -Gen und *dsdA* waren in *E. coli* K-12 und *E. coli* O157:H7 sehr verschieden. Beide DNA-Fragmente enthielten Gene für Phagen-verwandte Proteine. In dem Stamm *E. coli* O157:H7 enthielt ein zwischen den Loci der  $tRNA^{AlaX}$  und der  $tRNA^{ValU}$  lokalisiertes Fragment zusätzlich ein Gen, das für ein mögliches Virulenzprotein kodiert. Dieses Gen ist weder in der entspre-

chenden Region in *E. coli* K-12 noch im Genom eines der *Salmonella*-Serovare zu finden.

### 3.1.2.4 Die genetische Organisation der tRNA<sup>PheU</sup>-Region

Ein DNA-Segment von 147 kBp ist am tRNA<sup>PheU</sup>-Gen in *S. enterica* Serovar Typhi inseriert. Diese Insertion enthält mehrere Gene und Gen-Gruppen, deren Produkte mit der Pathogenität von *Salmonella* zusammenhängen. Zwei dieser Regionen wurden schon vorher als Bestandteile einer 118 kBp großen Pathogenitätsinsel im Genom von *Salmonella* Serovar Typhi beschrieben (Liu & Sanderson, 1995; Zhang *et al.*, 1997). Die hier ermittelten Daten geben Hinweise darauf, dass diese vormals beschriebene Pathogenitätsinsel eine an einem tRNA-Gen inserierte PAI darstellt.

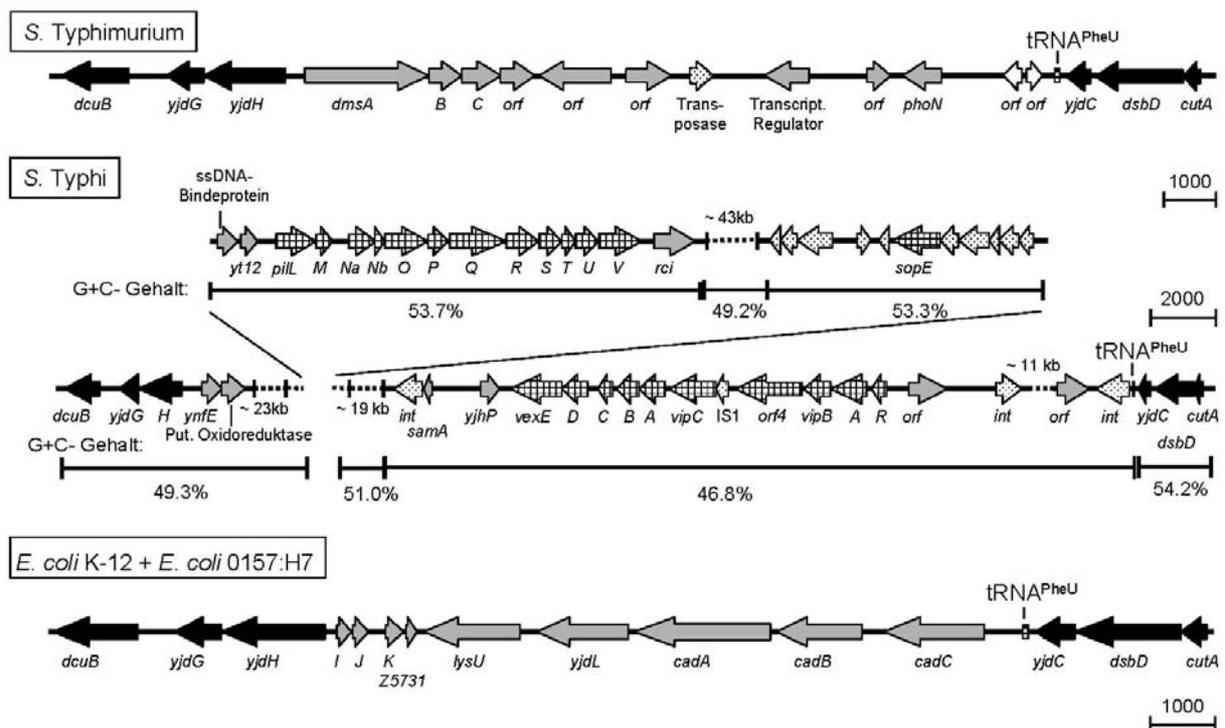


Abb. 9: Genetische Organisation der tRNA<sup>PheU</sup>-assozierten Region (vgl. Legende zu Abb. 6).

Die *viaB*-Region (*vexABCDE-vipABCR*) ist zusammen mit mehreren Phagen-Integrase-Genen am tRNA<sup>ArgW</sup>-Gen lokalisiert (Abb. 9). Die ViaB-Proteine sind für die Synthese und den Export des Vi-Kapsel-Antigens zur Bakterienoberfläche verantwortlich. Dadurch tragen diese Genprodukte zur Pathogenität von *S. enterica* Sero-

var Typhi bei (Yoshida *et al.*, 1999). Die zweite Virulenz-relevante Region auf der Serovar Typhi-spezifischen DNA-Insertion enthält die Gene *pilL-pilV*. Dieser Gen-Komplex kodiert für einen dünnen Typ IV-Pilus, der für die Konjugation in Flüssigmedium vonnöten ist (Yoshida *et al.*, 1999). Vor einiger Zeit konnte die Beteiligung des Typ IV-Pilus bei der Invasion von Serovar Typhi in humane Darmzellen gezeigt werden (Zhang *et al.*, 1997).

Stromabwärts vom *pil*-Operon liegt *rci*, ein Gen, das für eine ortsspezifische Rekombinase kodiert. Das Rci-Protein kann ein zwischen zwei invertierten Sequenzwiederholungen („inverted repeats“) gelegenes DNA-Fragment invertieren und dabei die C-terminale Region des PilV-Proteins und dessen Funktion verändern (Zhang *et al.*, 2000). Ein drittes Virulenz-relevantes Genprodukt der 147 kBp großen PAI ist SopE. Dieses über das TTSS von SPI1 translozierte Effektorprotein vermittelt den Eintritt von *Salmonella* in eukaryontische Wirtszellen durch Modifizierung ihrer Signalkaskade. Im Serovar Typhi ist *sopE* mit Prophagen-Genen assoziiert und liegt zwischen den Gruppen der *pil*- und *viaB*-Genen, ungefähr 60 kBp entfernt vom Locus der tRNA<sup>PheU</sup>. Im Serovar Typhimurium ist SopE innerhalb des temperenten Prophagen SopE $\Phi$  kodiert (Hardt *et al.*, 1998b; Miold *et al.*, 1999).

Im Genom von Serovar Typhimurium ist ein weitaus kleineres Fragment von nur 15kBp am tRNA<sup>PheU</sup>-Gen inseriert. Es enthält ein Operon für eine anaerobe Dimethylsulfoxid-Reduktase (*dmsABC*) und mehrere nicht weiter charakterisierte ORFs.

Eine komplett anders organisierte Insertion wurde in den Genomen von *E. coli* K-12 und *E. coli* 0157:H7 am tRNA<sup>PheU</sup>-Gen gefunden. Beide Stämme enthalten das gleiche 11 kBp-Fragment, welches das *cad*-Operon für eine Lysin-Decarboxylase (*cadABC*) und weitere undefinierte ORFs trägt.

### 3.1.3 Die Basenzusammensetzung der neuen tRNA-assoziierten Genom-Insertionen in *S. enterica* Serovar Typhi

Zahlreiche PAI sind durch eine Basenzusammensetzung gekennzeichnet, die sich von der des übrigen Genoms des Erregers unterscheidet (Hacker *et al.*, 1997). Daher wurde die Basenzusammensetzung der hier identifizierten mit tRNA-Genen assoziierten Elemente untersucht. Der G+C-Gehalt dieser Insertionen im Serovar Typhi wurde analysiert und mit dem des restlichen Genoms verglichen. Die relativ kurze Insertion am tRNA<sup>ProL</sup>-Gen unterscheidet sich im G+C-Gehalt nur unwesentlich vom durchschnittlichen Genom von *S. enterica* Serovar Typhi (~52%). Jedoch

zeigen die stromaufwärts von *sspH2* liegenden Gene, die zu *E. coli* identisch sind, einen relativ hohen G+C-Gehalt von 63% (Abb. 6). Die Regionen zu beiden Seiten des tRNA<sup>ArgU</sup>-Gens zeigen mit 41% bzw. 43% einen sehr niedrigen G+C-Gehalt im Vergleich zu 54% bzw. 52% in den umliegenden Regionen (Abb. 7). Dieses Ergebnis stimmt mit den niedrigeren G+C-Gehalten in verschiedenen SPI überein. Eine ähnliche Beobachtung konnte für die *Salmonella*-spezifische Insertion am Locus der tRNA<sup>ArgW</sup> gemacht werden (Abb. 8). Das Fragment zwischen dem tRNA-Gen und dem *pgt*-Operon hat einen sehr niedrigen G+C-Gehalt von nur 39% und liegt damit erheblich niedriger als der Rest der Insertion (51%). Die Basenzusammensetzung einzelner Fragmente der tRNA<sup>PheU</sup>-Insertion weist keine bemerkenswerten Unterschiede auf (Abb. 9). Eine geringfügige Differenz wurde in der *viaB*-Region beobachtet, deren G+C-Gehalt mit 47% am niedrigsten war.

#### 3.1.4 Die phylogenetische Verteilung der tRNA-assoziierten Genom-Insertionen

Mit Hilfe von Southern-Blot-Analysen sollte aufgeklärt werden, ob die neuen tRNA-assoziierten genomischen Insertionen spezifisch für *Salmonella* sind oder ob sie auch in anderen Gattungen der Enterobakterien oder verwandtschaftlich weiter entfernten Gram-negativen Bakterien zu finden sind. Außerdem wurde die Verteilung der neuen Elemente innerhalb der Gattung *Salmonella* anhand von Stämmen der SARC-Sammlung, die *S. bongori* und sieben Subspezies von *S. enterica* repräsentiert, mittels Southern-Hybridisierung untersucht. Die genomische DNA der einzelnen Spezies wurde isoliert und mit Sonden aus den tRNA-assoziierten Regionen hybridisiert. Die Sonden wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden und genomischer DNA aus Serovar Typhi als Matrize hergestellt und die Hybridisierungen unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die gewählten Hybridisierungsbedingungen zur Identifizierung von konservierten Genen innerhalb der Enterobakterien und anderer Gram-negativer Erreger ausreichend waren, wurden *recA*- und *gyrB*-spezifische Sonden mit *E. coli*-DNA als Matrize hergestellt. Diese Gene kodieren für hochkonservierte Proteine, eine Rekombinase und eine Gyrase. Unter den in dieser Studie angewandten Bedingungen hybridisierten beide Sonden mit allen untersuchten Bakteriengenomen, womit gezeigt wurde, dass die Hybridisierungsbedingungen zur Detektion von Genen unterschiedlicher Spezies geeignet waren (Daten nicht gezeigt). In Abb. 10 sind einige Daten zur Analyse der Verteilung tRNA-assoziierten Elemente dargestellt.

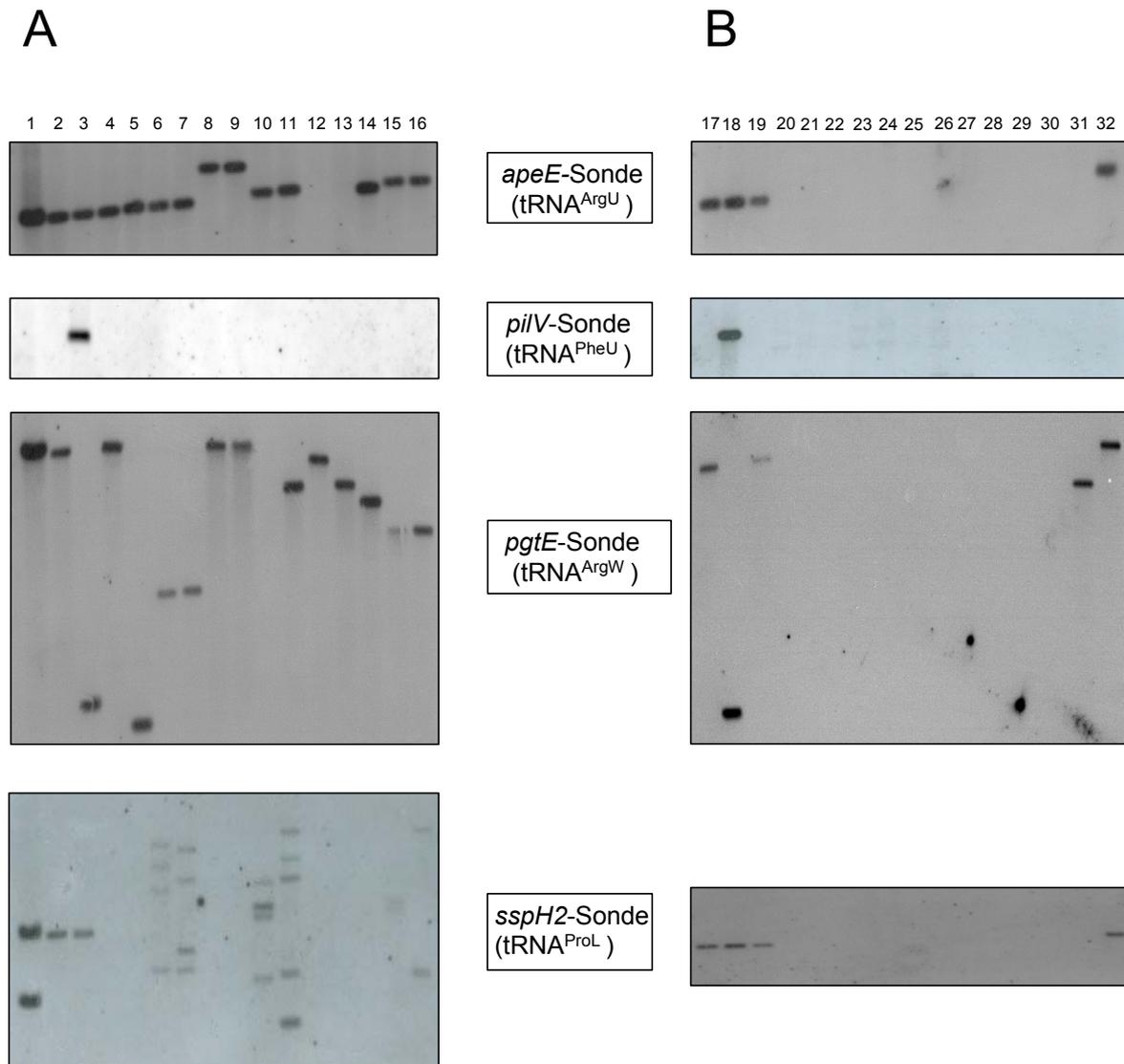


Abb. 10: Analyse der Verteilung der tRNA-assoziierten Insertionen innerhalb verschiedener Bakterienisolate.

Die SARC-Sammlung (**A**) sowie verschiedene Gram-negative Laborstämme und pathogene Isolate aus klinischen Proben (**B**) wurden durch Southern-Hybridisierung auf die Präsenz von *apeE* (tRNA<sup>ArgU</sup>), *pgtE* (tRNA<sup>ArgW</sup>), *sspH2* (tRNA<sup>ProL</sup>) und *pilV* (tRNA<sup>PheU</sup>) untersucht. **A**: 1: *S. enterica* Serovar Typhimurium 12023; 2: *S. enterica* Serovar Typhi; 3: *S. enterica* Serovar Typhimurium LT2; 4: *E. coli* DH5 $\alpha$ ; 5: EPEC; 6: EHEC; 7: ETEC; 8: EIEC; 9: EAEC; 10: *S. flexneri*; 11: *K. pneumoniae*; 12: *P. aeruginosa*; 13: *Y. enterocolitica*; 14: *V. cholerae*; 15: *S. bongori*; 16: *S. enterica* Serovar Typhimurium SARC 1. **B**: 17: *S. enterica* Serovar Typhimurium 12023; 18: SARC 1; 19: SARC 2; 20: SARC 3; 21: SARC 4; 22: SARC 5; 23: SARC 6; 24: SARC 7; 25: SARC 8; 26: SARC 9; 27: SARC 10; 28: SARC 11; 29: SARC 12; 30: SARC 13; 31: SARC 15; 32: SARC 16.

Eine Zusammenfassung dieser und weiterer Daten, die aus einer zusätzlichen Anzahl untersuchter Stämme und weiterer genspezifischer Sonden erstellt wurden, sind in Tab. 6 und 7 aufgelistet.

Tab. 6: Verteilung der tRNA-assoziierten Regionen innerhalb der Gattung *Salmonella*\*

Salmonella-Spezies und -Subspezies	tRNA <sup>ArgU</sup>		tRNA <sup>ArgW</sup>		tRNA <sup>ProL</sup>		tRNA <sup>PheU</sup>	
	<i>apeE</i>	<i>orf 0557</i>	<i>pgtE</i>	<i>nupC</i>	<i>sspH2</i>	<i>msgA</i>	<i>vexE</i>	<i>pilV</i>
I (SARC 1)	+	+	+	+	+	+	-	-
I (SARC 2)	+	+	+	+	+	+	+	+
II (SARC 3)	+	-	+	+	-	+	-	-
II (SARC 4)	+	-	+	+	-	+	-	-
IIIa (SARC 5)	+	-	+	+	+	+	-	-
IIIa (SARC 6)	+	-	+	+	+	+	-	-
IIIb (SARC 7)	+	-	+	+	-	n.d.	-	-
IIIb (SARC 8)	+	-	+	+	-	+	-	-
IV (SARC 9)	+	-	-	+	+	n.d.	-	-
IV (SARC 10)	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>S. bongori</i> (SARC 11)	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>S. bongori</i> (SARC 12)	-	-	+	+	-	+	-	-
VI (SARC 13)	+	-	+	+	-	+	-	-
VI (SARC 14)	+	-	+	+	-	+	-	-
VII (SARC 15)	+	-	+	+	+	+	-	-
VII (SARC 16)	+	-	+	+	+	n.d.	-	-

\* Die SARC-Sammlung, welche die *S. enterica* Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII und *S. bongori* enthält, wurde hinsichtlich der Präsenz von *apeE* und *orf 0557* (tRNA<sup>ArgU</sup>), *pgtE* und *nupC* (tRNA<sup>ArgW</sup>), *sspH2* und *msgA* (tRNA<sup>ProL</sup>) und *vexE* und *pilV* (tRNA<sup>PheU</sup>) untersucht. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Hybridisierungssignalen wurde durch + bzw. - dargestellt. n.d.: nicht eindeutig definierbar.

Die *apeE*-spezifische Sonde, die das tRNA<sup>ArgU</sup>-assoziierte DNA-Element repräsentierte, konnte in allen untersuchten *S. enterica*-Subspezies, nicht aber in *S. bongori*

detektiert werden (Tab. 6).

Eine zweite Sonde innerhalb dieser Insertion, *orf 0557*, hybridisierte nur mit DNA-Fragmenten aus Subspezies I-Isolaten. Mit keiner der beiden Sonden konnten Hybridisierungssignale mit DNA aus anderen Enterobakterien oder anderen Gram-negativen Erregern erzielt werden (Tab. 7). Die Sonden von *sspH2* und *msgA* aus dem tRNA<sup>ProL</sup>-assoziierten Element zeigten ein unterschiedliches Verteilungsmuster innerhalb der Salmonellen, konnten jedoch in anderen Spezies keine Hybridisierungssignale aufzeigen. Die Verteilung von *sspH2* innerhalb der verschiedenen *Salmonella*-Subspezies (SARC-Sammlung) war sehr heterogen, was mit früheren Beobachtungen im Einklang steht (Tsolis *et al.*, 1999b). Die Southern-Blot-Analyse mit den Sonden *pgtE* und *nupC* konnte die Präsenz der tRNA<sup>ArgW</sup>-assoziierten Insertion in allen *Salmonella*-Isolaten mit Ausnahme von SARC 9 nachweisen. Während *pgtE* nur in *Salmonella* spp. detektierbar ist, konnte *nupC* auch in den meisten untersuchten Gram-negativen Stämmen nachgewiesen werden (Tab. 7). Die Gene *vexE* und *pilV* sind auf der 147 kBp großen Insertion an der tRNA<sup>PheU</sup> im Genom von *S. enterica* Serovar Typhi lokalisiert. Beide Gene sind ausschließlich im Serovar Typhi detektierbar und finden sich in keiner weiteren der untersuchten Spezies (Tab. 6 und Tab. 7).

Tab. 7: Verteilung der tRNA-assoziierten Regionen innerhalb verschiedener Gram-negativer Bakterien\*

Spezies/Stamm	tRNA <sup>ArgU</sup>		tRNA <sup>ArgW</sup>		tRNA <sup>ProL</sup>		tRNA <sup>PheU</sup>	
	<i>apeE</i>	<i>0557</i>	<i>pgtE</i>	<i>nupC</i>	<i>sspH2</i>	<i>msgA</i>	<i>vexE</i>	<i>pilV</i>
<i>S. Typhimurium</i> 12023	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. Typhi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. Typhimurium</i> LT2	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	-	-	-	+	-	-	-	-
EPEC (2)	-	-	-	+	-	-	-	-
EHEC (2)	-	-	-	+	-	-	-	-
ETEC	-	-	-	+	-	-	-	-
EIEC	-	-	-	+	-	-	-	-

<u>Tabelle 7 (Fortsetzung)</u>									
EAEC	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>E. chloacae</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i> (2)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (2)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> (2)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-

\* Verschiedene Gram-negative Laborstämme und pathogene Isolate aus klinischen Proben wurden durch Southern-Hybridisierung auf die Präsenz von *apeE* und *orf0557* (tRNA<sup>ArgU</sup>), *pgtE* und *nupC* (tRNA<sup>ArgW</sup>), *sspH2* und *msgA* (tRNA<sup>ProL</sup>) und *vexE* und *pilV* (tRNA<sup>PheU</sup>) untersucht. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Hybridisierungssignalen wurde durch + bzw. - dargestellt. Die Anzahl der analysierten klinischen Isolate ist in Klammern angegeben.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass alle vier hier beschriebenen tRNA-assoziierten DNA-Elemente *Salmonella*-spezifische Insertionen darstellen. Die Hybridisierungsdaten, die mit der *nupC*-spezifischen Sonde erhalten wurden, indizieren, dass die tRNA-assoziierten Elemente durch mehrere unabhängige Ereignisse der DNA-Aufnahme während der Evolution eine mosaikartige Struktur aufweisen.

### 3.1.5 Insertionsstellen der tRNA-assoziierten Elemente

Die Analyse von Pathogenitätsinseln in zahlreichen pathogenen Bakterien hat gezeigt, dass im Vergleich verschiedener bakterieller Genome die Insertionsstellen der PAI sehr unterschiedlich sein können. Daher wurde die unmittelbare Umgebung der vier tRNA-assoziierten Elemente hinsichtlich ihres Insertionspunktes untersucht. Für PCR-Reaktionen wurden Paare von Oligonukleotiden so gewählt, dass das PCR-Amplifikat das dem tRNA-Gen zugewandte Ende des tRNA-assoziierten Elementes, das tRNA-Gen und die unmittelbar angrenzende Region auf der anderen Seite des tRNA-Gens umfasst (Abb. 11).

Durch das Vorhandensein von PCR-Produkten wird nachgewiesen, dass die das tRNA-Gen umgebenden DNA-Bereiche zu den gewählten Oligonukleotidpaaren komplementär sind und somit die chromosomale Insertion an der entsprechenden

Stelle lokalisiert ist. Ein negatives PCR-Ergebnis deutet auf die Abwesenheit komplementärer DNA-Sequenzen hin und ist damit ein Hinweis darauf, dass die Insertion nicht am entsprechenden tRNA-Gen erfolgt ist.

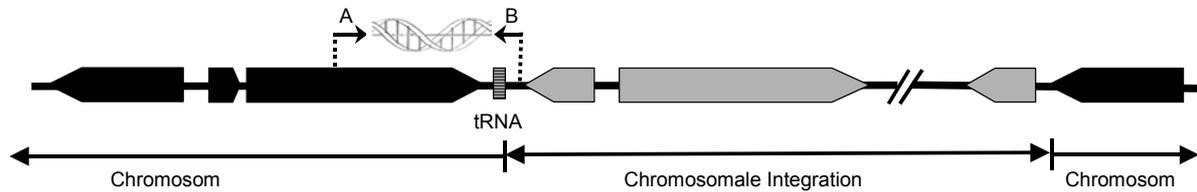


Abb. 11: Nachweis der chromosomalen Integrationsstelle an tRNA-Genen

Durch PCR mit den Oligonukleotiden A (vorwärts) und B (rückwärts) werden die umgebenden DNA-Bereiche der tRNA-Gene amplifiziert. Ein Amplifikat weist die spezifische chromosomale Integrationsstelle nach.

Die positiven PCR-Ergebnisse zeigen, dass die Loci für die Insertionen an den Genen der  $\text{RNA}^{\text{ArgU}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{ArgW}}$  innerhalb der Salmonellen hochkonserviert sind (Tab. 8). Eine bemerkenswerte Heterogenität konnte für die Insertionsstellen der  $\text{tRNA}^{\text{ProL}}$ -assoziierten Elemente beobachtet werden. Möglicherweise lässt sich diese Variabilität mit der Präsenz zusätzlicher Gene, die in Stämmen der SARC-Sammlung mit Ausnahme von *S. enterica* Serovar Typhimurium vorhanden sind, erklären (Abb. 6). Die Insertionsstelle für das  $\text{tRNA}^{\text{PheU}}$ -assoziierte Element war nur zwischen SARC 1, SARC 3 und SARC 13 konserviert (Tab. 8). Diese Beobachtung deckt sich mit der unterschiedlichen Zusammensetzung dieser Regionen in den Serovaren Typhimurium und Typhi (Abb. 9).

Tab. 8: Untersuchung der Insertionsstellen der tRNA-assozierten DNA-Elemente innerhalb der SARC-Sammlung (*S. enterica* Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI, VII und *S. bongori*) \*

<i>Salmonella</i> -Spezies und -Subspezies	tRNA <sup>ArgU</sup>	tRNA <sup>ArgW</sup>	tRNA <sup>ProL</sup>	tRNA <sup>PheU</sup>
I (SARC 1)	+	+	+	+
I (SARC 2)	+	+	(+)	-
II (SARC 3)	+	+	-	+
II (SARC 4)	+	+	-	-
IIIa (SARC 5)	+	+	(+)	-
IIIa (SARC 6)	+	+	-	-
IIIb (SARC 7)	+	+	-	-
IIIb (SARC 8)	+	+	-	-
IV (SARC 9)	+	(+)	(+)	-
IV (SARC 10)	+	+	(+)	-
<i>S. bongori</i> (SARC 11)	+	+	-	-
<i>S. bongori</i> (SARC 12)	-	+	-	-
VI (SARC 13)	+	-	(+)	+
VI (SARC 14)	+	+	(+)	-
VII (SARC 15)	+	+	-	-
VII (SARC 16)	+	+	(+)	-

\* Das Vorhandensein und Fehlen von PCR-Produkten wurde durch + bzw. – dargestellt. (+) gibt PCR-Produkte an, deren Größe von denen abweicht, die mit *S. enterica* Serovar Typhimurium als Matrize erhalten wurden.

### 3.1.6 Die Rolle der tRNA-assozierten Elemente bei der Virulenz von *Salmonella*

Um die Beteiligung der tRNA-assozierten Regionen an der Virulenz von *Salmonella* im Mausmodell zu überprüfen, wurden zunächst Teile dieser Elemente mit Hilfe der Methodes des „One-step Inactivation System“ in *S. enterica* Serovar Typhimurium

deletiert. Das DNA-Fragment von *ykgD* bis *apeE* im tRNA<sup>ArgU</sup>-assoziierten Element sowie das *pgt*-Operon im tRNA<sup>ArgW</sup>-assoziierten Element sind jeweils durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt worden (Abb. 7 und Abb. 8). Die Virulenz dieser Mutanten ist durch die Bestimmung des „Kompetitiven Index“ (KI; Beuzon *et al.*, 2000) analysiert worden. Vier Tage nach intraperitonealer Infektion von C57BL/6-Mäusen mit Inocula von 10<sup>4</sup> cfu mit gleichen Anteilen an Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium und Mutante wurden die Mäuse getötet und die Anzahl von Wildtyp und Mutante in Leber und Milz bestimmt. Als Kontrolle wurden Mäuse mit einem Gemisch aus Serovar Typhimurium-Wildtyp und einer stark attenuierten *sseC*-deletierten Mutante infiziert. Aus der Anzahl der Bakterien in den Organen und dem Vergleich von Wildtyp und Mutante, die durch unterschiedliche Antibiotika-Resistenzen differenziert werden konnten, wurde der jeweilige KI bestimmt. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten des Verhältnisses der reisolierten Mutanten-Anzahl zu Wildtyp-Anzahl durch das Verhältnis des Inokulums von Mutanten-Anzahl zu Wildtyp-Anzahl:

$$\text{KI} = \frac{\text{cfu Mutante}}{\text{cfu Wildtyp}} \left( \text{Re-Isolat} \right) \bigg/ \frac{\text{cfu Mutante}}{\text{cfu Wildtyp}} \left( \text{Inokulum} \right)$$

Für das Kontrollexperiment mit dem Wildtyp-Stamm gegen die *sseC*-Mutante wurde ein KI von 0,00071 ( $\pm$  0,00018) ermittelt, für die Infektion von Wildtyp-Stamm mit der Mutante im *pgt*-Operon ein KI von 1,40 ( $\pm$  0,48), und aus der Infektion von Wildtyp-Stamm mit dem *ykgD-apeE*-Deletionsstamm resultierte ein KI von 1,62 ( $\pm$  0,38). Somit sind weder die auf dem Fragment von *ykgD-apeE* kodierten Proteine der tRNA<sup>ArgU</sup>-assoziierten Region noch das *pgt*-Operon im tRNA<sup>ArgW</sup>-assoziierten Element für den Verlauf einer systemischen Infektion in der Maus notwendig. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die untersuchten tRNA-assoziierten Insertionen einen Beitrag zur Virulenz leisten, der durch das orale Infektionsmodell der murinen Salmonellose nicht erfasst werden kann. Auch ist nur ein Teil der inserierten Gene deletiert worden. In weiterführende Studien mit anderen Detektionssystemen wie beispielsweise Zellkulturmodellen kann analysiert werden, ob und in welcher Form die einzelnen bisher nicht weiter charakterisierten Gene der tRNA-assoziierten Elemente als Virulenzfaktoren eine Rolle spielen.

## 3.2 Unterschiedliche Verteilung von Virulenz-Faktoren als Ursache der Wirtsspezifität von *Salmonella* spp.?

### 3.2.1 Verbreitung von Virulenz-Determinanten innerhalb der Spezies *S. bongori*

Bislang wurde die Spezies *S. bongori* hauptsächlich in kaltblütigen Wirbeltieren gefunden. Inzwischen sind einige wenige Fälle bekannt geworden, in denen *S. bongori*-Stämme aus humanen Patienten mit Darmerkrankungen isoliert wurden (Pignato *et al.*, 1998). Diese offensichtlich an den Menschen als neuen Wirt adaptierten Stämme warfen erneut die Frage auf, worauf dieses Anpassungsvermögen von *Salmonella* basiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob einige der bisher bekannten Virulenz-Determinanten von *Salmonella* innerhalb der Spezies *S. bongori* ein heterogenes Verteilungsmuster zeigen und somit möglicherweise bei der Wirtsadaptation eine Rolle spielen könnten.

#### 3.2.1.1 Verteilung Virulenz-assoziiierter Gene

Zehn *S. bongori*-Isolate von Kindern mit Enteritiden (Pignato *et al.*, 1998) wurden auf das Vorhandensein diverser Gene, die für bekannte Virulenzfaktoren aus *Salmonella* kodieren, untersucht. DNA-Sonden der Gene für folgende Virulenzfaktoren wurden mittels Oligonukleotiden (s. Tab. 4) und *S. enterica* Serovar Typhimurium NTCC 12023 als Matrize durch PCR-Amplifikation hergestellt: Typ1-Fimbrien (*fim1*), lange polare Fimbrine (*lpf*), Vi-Kapselantigen (*viaB*), *Salmonella*-Virulenzplasmid (*spv*), ein SPI1-Effektorgen (*sipC*, kodiert auf SPI1, sekretiert durch das SPI1-TTSS), ein SPI5/SPI1-Effektorgen (*sopB*, kodiert auf SPI5, sekretiert durch das SPI1-TTSS), ein SPI2-Effektorgen (*sseB*, kodiert auf SPI2, sekretiert durch das SPI2-TTSS) und ein SPI3-Gen (*mgtB*, kodiert auf SPI3). Außerdem wurde zur Kontrolle der Hybridisierungsbedingungen eine Sonde gegen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*gln*) eingesetzt. Zusätzlich zu den 10 *S. bongori*-Isolaten wurden die beiden *S. bongori*-Stämme aus der SARC-Sammlung (SARC 11 und 12) und die Serovare Typhimurium NTCC 12023 und Typhi der Subspezies I aus *S. enterica* untersucht. Die Hybridisierungen wurden unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt.

Aus den in Tab. 9 aufgelisteten Hybridisierungsergebnissen wird eine einheitliche Verteilung der Virulenzfaktoren innerhalb der Spezies *S. bongori* ersichtlich.

Tab. 9: Verteilung von Virulenzfaktoren in verschiedenen *S. bongori*-Isolaten

	<i>fim1</i>	<i>lpf</i>	<i>sopB</i>	<i>sipC</i>	<i>mgtB</i>	<i>sseB</i>	<i>viaB</i>	<i>spv</i>	<i>gln</i>
<i>S. Typhi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>S. bongori</i> SARC 11	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> SARC 12	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 27	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 102	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 247	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 250	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 261	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 368	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 370	-	-	n.d.	+	n.d.	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 376	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 429	-	-	n.d.	+	n.d.	-	-	-	+
<i>S. bongori</i> 634	-	-	n.d.	+	n.d.	-	-	-	+

Zehn Patientenisolat von *S. bongori* wurden zusammen mit den *S. bongori*-Stämmen aus der SARC-Sammlung (SARC 11 und 12) und den Serovaren Typhimurium NTCC 12023 und Typhi SARC 2 der *S. enterica* Subspezies I hinsichtlich des Verteilung verschiedener Virulenzfaktoren untersucht. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Hybridisierungssignalen wurde durch + bzw. – dargestellt. n.d.: nicht eindeutig definierbar.

Die *lpf*-Fimbriengene sind nur in *S. enterica* Serovar Typhi vorhanden, während die Gene für die Typ1-Fimbrien (*fim1*) in beiden analysierten *S. enterica* Subspezies I-Stämmen, aber in keinem der *S. bongori*-Isolate detektierbar sind. Ähnlich verhält es sich mit dem Virulenzplasmid (*spv*), welches in den Serovaren Typhimurium und Typhi nachweisbar war, nicht aber in *S. bongori*. Das Gen für das Vi-Kapselantigen, welches als eine *S. enterica* Serovar Typhi-spezifische Insertion beschrieben ist (vgl. 3.1.2.4), konnte in keinem anderen analysierten Stamm detektiert werden. Dagegen waren die Effektorgene *sipC* und *sopB*, deren Produkte durch das TTSS von SPI1 sekretiert werden, sowie das Virulenz-relevante Gen *mgtB*, das für einen Mg<sup>2+</sup>-Transporter kodiert, sowohl in den *S. enterica* Serovaren Typhimurium und Typhi als

auch in allen *S. bongori*-Isolaten vorhanden. Das SPI2-Effektorgen *sseB* ist in keinem der *S. bongori*-Stämme gefunden worden, was mit den bisherigen Ergebnissen übereinstimmt, dass SPI2 erst nach der Spezifizierung in *S. bongori* und *S. enterica* erworben wurde (Hensel *et al.*, 1997).

Die Untersuchung der Verteilung bekannter *S. enterica*-Virulenzfaktoren in den human-isolierten *S. bongori*-Stämmen gab keinen Hinweis darauf, dass der alleinige Verlust oder Gewinn der analysierten Virulenzfaktoren für die Anpassung an einen humanen Wirt verantwortlich sein könnte. Die untersuchten Gene zeigten in den zehn *S. bongori*-Stämmen das gleiche Verteilungsmuster wie die aus kaltblütigen Tieren isolierten, nicht-humanadaptierten Stämme SARC 11 und 12 (vgl. Tab. 9 und Boyd *et al.*, 1996). Da jedoch bisher vermutlich nur ein Teil der Virulenz-relevanten Gene in *Salmonella* überhaupt bekannt ist, kann aus der relativ geringen Anzahl der hier untersuchter Virulenzgene noch keine abschließende Hypothese über die generelle Verteilung von Virulenzfaktoren und deren Einfluss auf die Wirtsadaptation in *S. bongori* erstellt werden.

### 3.2.2 Verteilung von SPI2-Effektoren innerhalb der Gattung *Salmonella* als möglicher Hinweis auf Wirtsspezifität

Auf der Suche nach weiteren möglichen Virulenz-relevanten Genen wurde kürzlich in *S. enterica* Serovar Typhimurium durch Miao und Miller eine Gruppe von Proteinen identifiziert, deren N-terminale Domänen ein konserviertes Leucin-reiches Konsensus-Motiv (WEK(IyM)XXFF) aufweisen: SspH1, SspH2, SifA, SifB, Ssel, SseJ und SlrP (Miao & Miller, 2000). Anhand von Fusionen der Gene mit dem Reporter-Gen *cyaA* aus *Bordetella pertussis* konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine über das Translokationssystem von SPI2 in die Zielzelle transloziert werden und das Konsensus-Motiv möglicherweise als Sekretions- und Translokationssignal interpretiert werden kann. Zwei dieser als „*Salmonella* translocated effectors“ (STE) bezeichneten Proteine, SspH1 und SlrP, konnten zusätzlich über das TTSS von SPI1 ausgeschleust werden (Miao *et al.*, 1999; Miao & Miller, 2000). Die *Salmonella*-spezifischen STE-Gene sind häufig mit Genen von Prophagen assoziiert, was darauf hindeuten könnte, dass STE-Gene variabel verteilte Virulenzfaktoren innerhalb der Gattung *Salmonella* darstellen, die möglicherweise in unterschiedlicher Verteilung einen Einfluss auf die Wirtsspezifität und die Virulenz einzelner *Salmonella*-Stämme haben. Auch das vor kurzem von Knodler *et al.* als SPI2-abhängig identifizierte PipB

gehört zur Gruppe der STE-Proteine. Es ist auf der SPI5 von *Salmonella* spp. kodiert und wird über das TTSS von SPI2 transloziert, wobei es jedoch nicht das Leucinreiche Konsensus-Motiv trägt (Knodler *et al.*, 2002).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die STE-Loci durch voneinander getrennte Ereignisse des horizontalen Gentransfers aufgenommen wurden und eine heterogenere Verteilung zeigen als die in *S. enterica* hochkonservierte SPI2.

### 3.2.2.1 Genetische Organisation der STE-Loci

Die genetische Organisation der STE-Loci wurde anhand von Genom-Daten der *S. enterica*-Serovare Typhimurium und Typhi analysiert. Die Genorganisation der einzelnen DNA-Elemente wurde außerdem mit den entsprechenden Regionen im Chromosom von *E. coli* K-12 verglichen (Abb. 12). *sifA* unterbricht als einzelnes Gen das *potABCD*-Operon der Serovare Typhimurium und Typhi. Der *sifB*-Locus bildet eine kleine Insertion von zwei ORFs im Genom von Serovar Typhi. Diese Insertion wurde auch in *S. enterica* Serovar Enteritidis gefunden und als „Pathogenitäts-Inselchen“ bezeichnet (Genbank-Nummer AF128835). *pipB* ist innerhalb der SPI5 lokalisiert und bildet dort zusammen mit *pipA* eine Insertion, die auf der einen Seite unmittelbar an das tRNA<sup>SerT</sup>-Gen angrenztes und auf der anderen Seite an Gene, deren Produkte über das TTSS von SPI1 sekretiert werden (Wood *et al.*, 1998; Knodler *et al.*, 2002). Im Vergleich mit der entsprechenden Region im Genom von *E. coli* K-12 zeigte sich in den anderen STE-Regionen ein komplexerer Aufbau. *sspH1*, *sspH2*, *sseI* und *sseJ* sind in unmittelbarer Nähe von Genen lokalisiert, die für Phagen-Proteine kodieren (Miao & Miller, 2000; Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Zusätzlich ist *sspH2* im Serovar Typhi direkt am tRNA<sup>ProL</sup>-Gen inseriert, was im Genom von Serovar Typhimurium nicht beobachtet wird (vgl. Abb. 6).

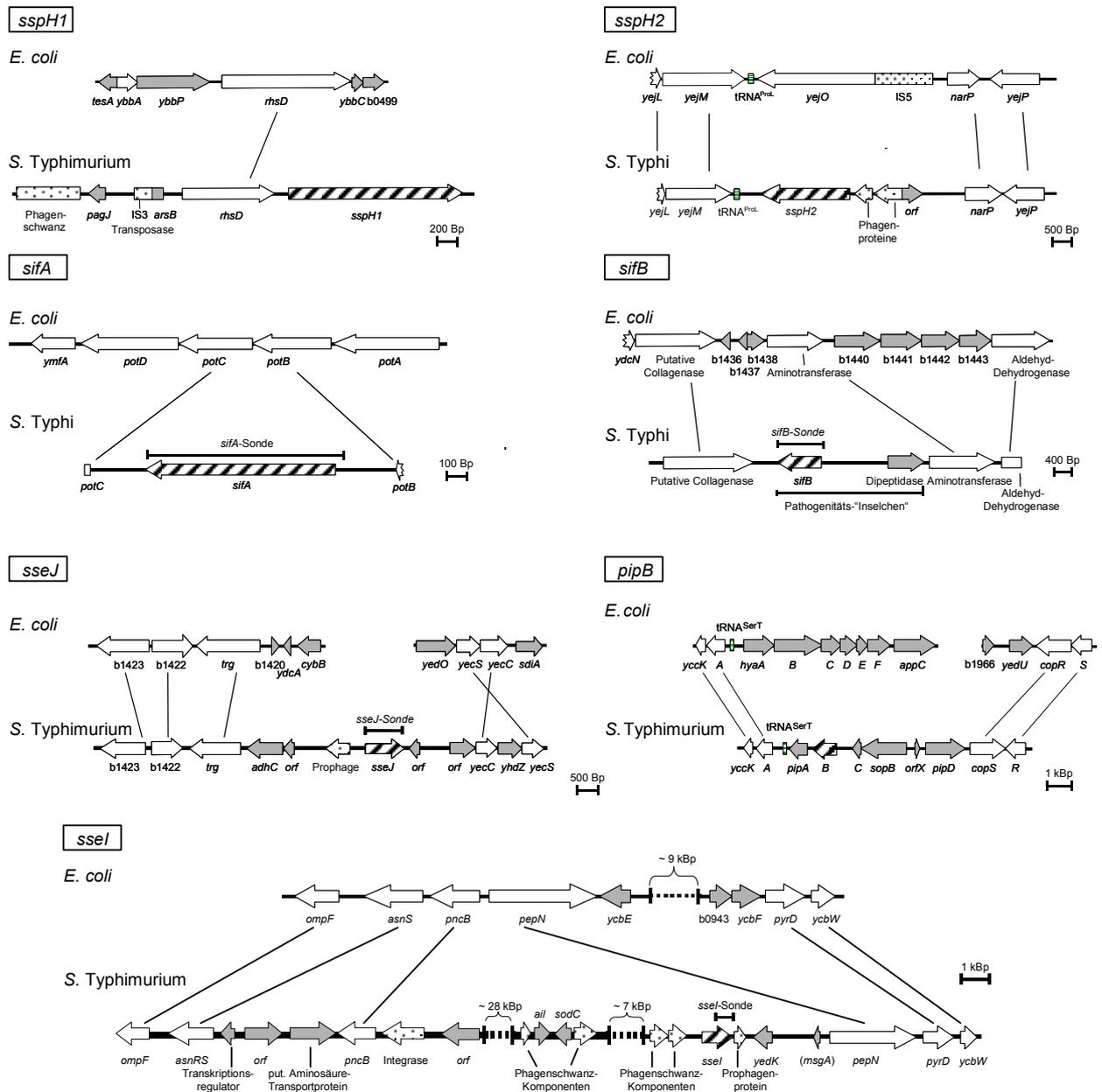


Abb. 12: Die genomische Organisation der STE-Gene in *S. enterica* und die Positionen der Hybridisierungssonden.

Die Organisation der chromosomalen Regionen einzelner STE-Gene wurde mit der genetischen Zusammensetzung der entsprechenden Regionen im Chromosom von *E. coli* K-12 verglichen. Gene, die sowohl in *E. coli* als auch in *Salmonella* identifiziert wurden, sind durch offene Symbole dargestellt, während Spezies-spezifische Gene durch graue Symbole charakterisiert sind. STE-Gene sind gestreift, Gene mit Ähnlichkeiten zu Phagen-Genen sind gepunktet dargestellt. Die Positionen der PCR-Fragmente, die als spezifische Sonden in Southern-Hybridisierungen eingesetzt wurden, sind eingezeichnet. Die Sonden wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden SifA-For-*Eco*RI und SifA-Rev-*Eco*RV (*sifA*), SifB-For-*Eco*RI und SifB-Rev-*Eco*RV (*sifB*), SseI-For und SseI-Rev-*Eco*RV (*sseI*) sowie SseJ-For-*Eco*RI und SseJ-Rev-*Eco*RV (*sseJ*) hergestellt.

### 3.2.2.2 Phylogenetische Verteilung der STE-Gene

Während der SPI1-Locus sowohl in *S. enterica* als auch in *S. bongori* vorhanden ist, findet sich SPI2 zwar in sämtlichen Subspezies von *S. enterica*, nicht aber in *S. bongori* (Hensel *et al.*, 1997; Ochman & Groisman, 1996). Sowohl die 37 unterschiedlichen *S. enterica*-Serovare der SARB-Referenzsammlung (Boyd *et al.*, 1993), die ein sehr unterschiedliches Wirtsspektrum zeigen, als auch diverse *S. enterica*-Patientenisolate wurden hinsichtlich der Funktionalität des SPI2-TTSS analysiert. Die Kulturen wurden unter SPI2-induzierenden Bedingungen (F-Medium, pH 7,0) angezogen und mit Hilfe von Western-Blots auf die Expression des SPI2-Gens *sseB* untersucht. SseB ist ein sekretiertes Protein und bildet einen Teil der Translokator-Struktur des SPI2-TTSS aus. In sämtlichen untersuchten *S. enterica*-Serovaren konnten mit Hilfe des Antikörpers gegen SseB die Expression von *sseB*, das die Präsenz des TTSS von SPI2 repräsentiert, nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Da die STE-Gene außerhalb der SPI2 liegen, sollte überprüft werden, ob die STE-Loci auch in allen *S. enterica*-Subspezies vorhanden sind, oder ob diese Gene möglicherweise eine unterschiedliche, für einzelne Subspezies charakteristische Verteilung zeigen. Anhand von Patientenisolaten und Stämmen aus den *Salmonella*-Referenz-Sammlungen SARB mit 37 Serovaren der *S. enterica* Subspezies I (Boyd *et al.*, 1993) und SARC mit jeweils zwei Vertretern aus *S. enterica* Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI, und VII und *S. bongori* (Boyd *et al.*, 1996) wurde die Verteilung der STE-Gene mittels Southern-Blot analysiert. Die Sonden wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden (Tab. 4) und genomischer DNA aus *S. enterica* Serovar Typhimurium NTCC 12023 als Matrize hergestellt. Die Hybridisierungen wurden anschließend unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt. Die Position der Sonden ist aus Abb. 12 ersichtlich.

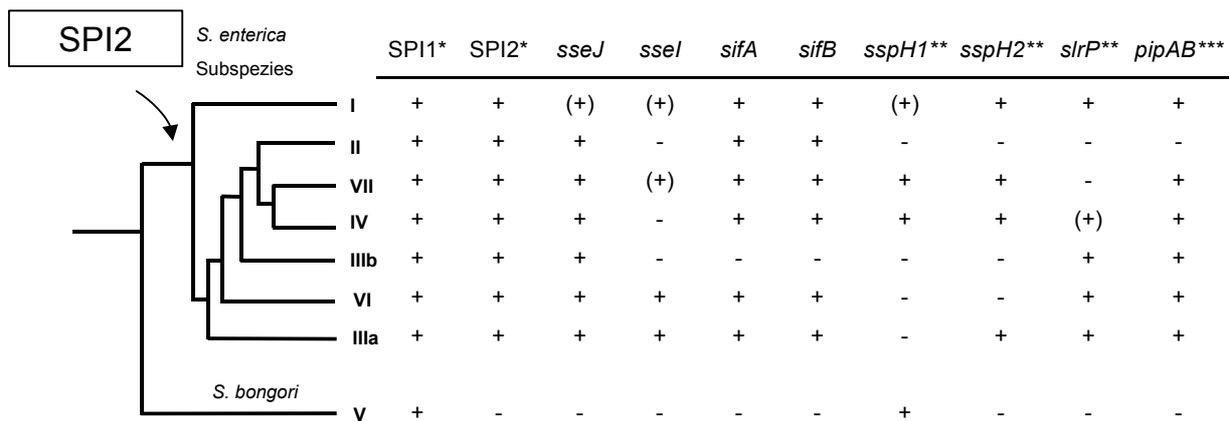


Abb. 13: Verteilung der STE-Gene innerhalb der Gattung *Salmonella*.

Die SARC-Sammlung, die jeweils zwei Vertreter aus *S. enterica* Subspezies I, II, IIIa, IIIb, IV, VI und VII sowie *S. bongori* umfasst, wurde hinsichtlich des Vorhandenseins einzelner STE-Gene untersucht. Der phylogenetische Baum der *Salmonella*-Subspezies wurde anhand von Multilocus-Enzymelektrophorese-Daten von Reeves *et al.* (Reeves *et al.*, 1989) adaptiert. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Genen wurde durch + oder - gekennzeichnet. Die Klammern indizieren, dass ein Gen nur in einer geringen Anzahl von Serovaren der *S. enterica* Subspezies I und nur in einer von zwei Vertretern der jeweiligen Subspezies detektierbar war (vgl. auch Abb. 14). \* Daten von Hensel *et al.* (1997) und Ochman & Groisman (1996); \*\* Daten von Tsolis *et al.* (1999b); \*\*\* Daten von Knodler *et al.* (2002).

In der Analyse der Verteilung der Gene *sifA*, *sifB*, *sseI* und *sseJ* innerhalb der SARC-Sammlung konnte keines dieser Gene in *S. bongori* detektiert werden (Abb. 13). *sifA* und *sifB* waren mit Ausnahme von Subspezies IIIb in allen Subspezies vorhanden. *sseJ* ist in allen *S. enterica*-Subspezies zu finden, jedoch nicht in Subspezies I Serovar Typhi (vgl. auch Miao & Miller, 2000). *sseI* zeigte dagegen ein eher heterogenes Verteilungsmuster: Das Gen konnte in *S. enterica* Subspezies IIIa, VI und in einem von mindestens zwei Vertretern der *S. enterica* Subspezies I und VII nachgewiesen werden, jedoch in keinem weiteren Vertreter einer anderen *S. enterica*-Subspezies.

### 3.2.2.3 Verteilung der STE-Gene innerhalb von *S. enterica* Subspezies I

Sowohl die 37 verschiedene Serovare der *S. enterica* Subspezies I umfassende SARB-Sammlung als auch zahlreiche Patientenisolat des Max-von-Pettenkofer-Instituts wurden durch Southern-Blot-Hybridisierungen analysiert (Abb. 14).

	S. Agona (1)	S. Anatum (2)	S. Brandenburg (3)	S. Choleraesuis (4)	S. Decatur (8)	S. Derby (9)	S. Dublin (12)	S. Duisberg (15)	S. Emek (20)	S. Enteritidis (16)	S. Gallinarum (21)	S. Haifa (22)	S. Heidelberg (23)	S. Infantis (26)	S. Indiana (25)	S. Miami (28)	S. Montevideo (30)	S. Muenchen (32)
<i>sifA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sifB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ssel</i>	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>sseJ</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	S. Newport (36)	S. Panama (38)	S. Paratyphi A (42)	S. Paratyphi B (43)	S. Paratyphi C (48)	S. Pullorum (51)	S. Pullorum (52)	S. Reading (53)	S. Rubislaw (54)	S. Saintpaul (55)	S. Sendai (58)	S. Schwarzengrund (57)	S. Senftenberg (59)	S. Stanley (60)	S. Stanleyville (61)	S. Typhi (63)	S. Typhimurium (65)
<i>sifA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sifB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ssel</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>sseJ</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Abb. 14: Verteilung der STE-Gene innerhalb von *S. enterica* Subspezies I.

Zahlreiche Patientenisolat und Stämme aus der SARB-Sammlung, die verschiedene Serovaren der *S. enterica* Subspezies I repräsentieren, wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierung auf das Vorhandensein von *sifA*, *sifB*, *ssel* und *sseJ* untersucht. Positive und negative Hybridisierungssignale sind durch + und - gekennzeichnet. Die Nummer innerhalb der SARB-Sammlung steht in Klammern hinter den einzelnen Serovaren.

*sifA* und *sifB* wurden in allen Serovaren der *S. enterica* Subspezies I gefunden. *sseJ* konnte weder in den Serovaren Typhi noch in Paratyphi A und B, jedoch in Paratyphi C und allen anderen analysierten Serovaren detektiert werden. *ssel* wurde nur in 9 der 36 untersuchten Serovaren gefunden und zeigte auch innerhalb der Patientenisolat eine sehr heterogene Verteilung, wobei es in keinem der Serovare Paratyphi A, B oder C nachgewiesen werden konnte.

Es wird deutlich, dass sich die SPI2-Effektoren in zwei Gruppen einteilen lassen. Zum einen gibt es die Gruppe der konservierten STE-Gene, zu der *sifA* und *sifB* gezählt werden. Sie gehören möglicherweise zur „Grundausstattung“ von *S. enterica*. Auf der anderen Seite bilden die STE-Gene *ssel* und *sseJ* zusammen mit *sspH1*, *sspH2* und *slrP* eine Gruppe weitaus weniger konservierter Gene, die möglicherweise in unterschiedlichen Kombinationen eine Variabilität und wirtsspezifische Anpassungsfähigkeit von *Salmonella* an neue Wirte und Umgebungen bieten.

### 3.3 Klonierung und funktioneller Transfer des Virulenz-relevanten Teils von *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2)

#### 3.3.1 Versuche zu möglichen DNA-Transfermechanismen innerhalb der Gattung *Salmonella*

Von der Vorstellung ausgehend, dass SPI2 über horizontalen Gentransfer in das Genom von *S. enterica* gelangt ist, sollte untersucht werden, welcher Mechanismus für den Transfer verantwortlich gewesen sein könnte. Hierfür kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht, wie beispielsweise ein konjunktiver Transfer mittels Plasmiden, Transformation von freier DNA oder aber eine phagenvermittelte Transduktion. Letztere wurde schon vorher als mechanistischer Hintergrund für DNA-Übermittlung im horizontalen Gentransfer identifiziert (Miroid *et al.*, 1999), weshalb der Schwerpunkt der Analysen auf diesem DNA-Transferweg lag. Da *S. bongori* als SPI2-negative Spezies als potentieller Empfänger für den Transfer von SPI2 aus *S. enterica* Serovar Typhimurium gewählt wurde, war es von besonderem Interesse, einen Phagen zu isolieren, der *S. bongori* infizieren und möglicherweise DNA transferieren kann. Die Gruppe um Schmieger konnte zeigen, dass die meisten *Salmonella*-Stämme einen bis mehrere Phagen besitzen, die lysogen im Bakteriengenom vorhanden sind (Schicklmaier & Schmieger, 1995). Diese Phagen können durch einfaches Herstellen eines Lysates isoliert werden, indem eine gut gewachsene *Salmonella*-Kultur sedimentiert und der Überstand abgenommen und mit Chloroform versetzt wird, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Von allen Stämmen der SARC-Sammlung wurden auf diese Art Lysate hergestellt und auf Top-Agar-Platten mit eingegossener *S. bongori*-Suspension getropft. Zusätzlich wurden Lysate von P22 und ES 18, einem P22-Derivat, das ein weiteres Wirtsspektrum als P22 hat (Schicklmaier & Schmieger, 1995), mit *S. bongori* als Empfängerstamm analysiert. Es konnte kein Lysat gefunden werden, das in der Lage war, einen der beiden analysierten *S. bongori*-Stämme (SARC 11 und 12) zu infizieren. Die Zugabe von Mitomycin (1 mg/ml) konnte ebenfalls keine Infektion eines der *S. bongori*-Stämme mit einem Phagen induzieren. Somit sind entweder die *S. bongori*-Stämme nicht für die eingesetzten Phagen empfindlich, oder aber sie besitzen schon lysogen im Chromosom integrierte Phagen, die das Bakterium gegenüber einer neuen Infektion mit einem Phagen desselben Typs resistent machen (vgl. Figueroa-Bossi & Bossi, 1999; Figueroa-Bossi *et al.*, 2001; Susskind & Botstein, 1980). Somit konnte ein DNA-

Transfer mittels Bakteriophagen in *S. bongori* nicht nachgewiesen und als möglicher Mechanismus des horizontalen Gentransfers in dieser Spezies postuliert werden.

### 3.3.2 Identifikation der Insertionsstelle von SPI2 in verschiedenen *Salmonella*-Subspezies

Die Pathogenitätsinseln PAI I und PAI II in *E. coli* und die „high pathogenicity island“ HPI in *Yersinia pseudotuberculosis* sind in verschiedenen Stämmen an unterschiedlichen Stellen im Chromosom inseriert (Buchrieser *et al.*, 1998; Hacker & Kaper, 2000). Diese Beobachtung führte zu der Idee, dass auch SPI2 möglicherweise nicht immer am Locus der tRNA<sup>ValV</sup> im Chromosom von *Salmonella* lokalisiert ist, sondern auch an anderen Stellen integriert sein könnte. Anhand der Stämme aus der SARC-Sammlung wurden die SPI2-Insertionsstellen in unterschiedlichen *S. enterica*-Subspezies mittels Southern-Blot-Hybridisierung analysiert. Chromosomale DNA wurden nach Restriktionsverdau mit Sonden hybridisiert, die jeweils zu beiden Seiten des tRNA<sup>ValV</sup>-Gens homolog sind (Abb. 15). Diese Sonden (Del 31-Sonde und *ssaT*-Sonde) wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden mittels PCR generiert (s. Tab. 4).

In allen analysierten *Salmonella*-Subspezies hybridisierten beide Sonden zu einem DNA-Fragment gleicher Größe (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis wurde dadurch verifiziert, dass verschiedene Restriktionsenzyme zum Verdau der chromosomalen DNA eingesetzt wurden, um auszuschließen, dass es sich um nur zufällig gleiche Fragmentgrößen der detektierten Banden handelt. In allen *Salmonella*-Spezies ist SPI2 an demselben tRNA<sup>ValV</sup>-Gen inseriert, welches als stabiler Ankerpunkt für die Integration der PAI dient. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass SPI2 nicht mehr in der Lage ist, von einem Bakterium zum anderen transferiert zu werden und somit im mikroevolutionären Prozess eine Rolle zu spielen. Allerdings könnten die Ergebnisse auch darauf hinweisen, dass SPI2 immer an demselben tRNA-Gen bevorzugt integriert wird. Eine Analyse der Stabilität der SPI2 im Genom von *Salmonella* sollte darüber Aufschluss geben, ob die Integration an ein und demselben tRNA-Gen auf einen einmaligen Integrationsvorgang der SPI2 und anschließendem Verbleib an dieser Stelle im Genom zurückzuführen ist, oder ob SPI2 noch mobil ist und immer an demselben Locus inseriert.

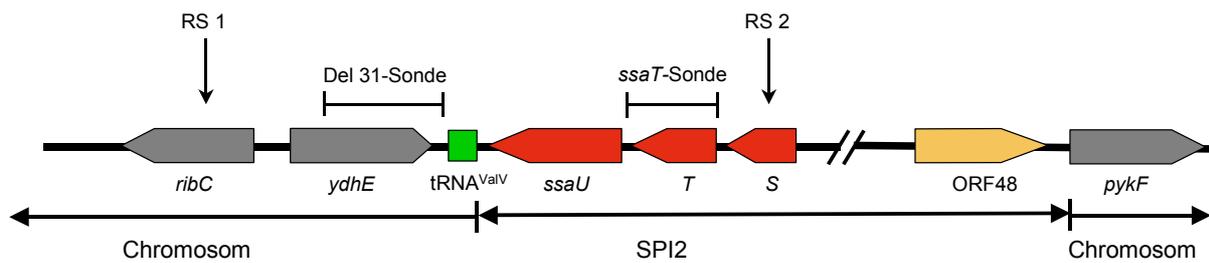


Abb. 15: Identifizierung der Insertionsstelle von SPI2 in verschiedenen *Salmonella*-Subspezies.

Die SPI2-Region (rot bzw. orange) ist im Chromosom von *S. enterica* Serovar Typhimurium (grau) am  $tRNA^{Val}$ -Gen (grün) inseriert. Die *ssaT*-Sonde hybridisiert innerhalb von SPI2, während die Del 31-Sonde zu einem DNA-Fragment auf der SPI2-distalen Seite des  $tRNA$ -Gens homolog ist. Das Restriktionsenzym schneidet die DNA an den Restriktionsschnittstellen RS 1 und RS 2. Das daraus resultierende DNA-Fragment beinhaltet sowohl die zur Del 31-Sonde als auch die zur *ssaT*-Sonde homologen DNA-Bereiche.

### 3.3.2.1 SPI2 ist stabil im Genom von *S. enterica* Serovar Typhimurium integriert

Die relative Instabilität im Wirts-Chromosom gilt als ein Charakteristikum von Pathogenitätsinseln (Hacker *et al.*, 1997). Dies konnte beispielsweise für die PAI I und II in *E. coli*, die Cag-Pathogenitätsinsel in *Helicobacter pylori* und auch für die HPI-Pathogenitätsinseln in der Gattung *Yersinia* gezeigt werden (Fetherstone *et al.*, 1995; Blum *et al.*, 1994; Censini *et al.*, 1996; Hare *et al.*, 1999). Die SPI2 in *Salmonella* ist bisher als stabil integrierte Insertion beschrieben worden, d.h. es hat keine Hinweise auf den Verlust der gesamten PAI oder auf partielle Deletionen gegeben. Diese Beobachtung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass zu dieser Fragestellung bis dato keine konkreten Analysen durchgeführt worden sind. Solche *Salmonella*-Stämme, die diese Pathogenitätsinsel besitzen, stammen zumeist aus Patientenisolaten und besitzen daher vermutlich *per se* die funktionelle Einheit der SPI2, um einen Wirt erfolgreich besiedeln zu können. In der hier beschriebenen Studie wurde über einen längeren Zeitraum untersucht, ob die SPI2 tatsächlich ohne Selektionsdruck in einem Stamm über zahlreiche Generationen stabil integriert ist.

Die *S. enterica* Serovar Typhimurium-Mutante P2D6, die eine *aphT*-Kassette im *ssaV*-Gen der SPI2 trägt und damit Kanamycin-resistent ist, wurde in LB-Flüssigkultur ohne Antibiotika-Selektion über Nacht angezogen. Diese Kultur wurde täglich in LB-Flüssigkultur ohne Antibiotika-Selektion subkultiviert. Aus der Übernachtskultur wurde eine Verdünnungsreihe auf LB-Agar so ausplattiert, dass 50-150 gut differenzierbare Einzelkolonien pro Platte wuchsen. Das Kolonien-Muster wurde an-

schließlich mit einem Lederberg-Stempel auf eine LB-Platte mit Kanamycin-Selektion kopiert. Das Fehlen einer oder mehrerer Kolonien sollte den Verlust der Kanamycin-Kassette und damit der SPI2-Insertion indizieren. Innerhalb eines Zeitraums von ca. 3500 Generationen konnten keine Differenzen in der Anzahl der Kolonien auf LB-Agar mit und ohne Antibiotikum detektiert werden. Aus dieser Beobachtung wurde gefolgert, dass unter diesen Bedingungen die SPI2 eine stabil im Chromosom integrierte Insertion darstellt.

### 3.3.3 Klonierung des SPI2-Sekretionssystems

Um der Frage nachzugehen, wie größere genetische Elemente im neuen Wirt etabliert werden können, wurde das den Typ III-Sekretionsapparat kodierende 25 kbp-Fragment aus *S. enterica* Serovar Typhimurium 12023 mit Hilfe einer Cosmidbank kloniert. Chromosomale DNA von *S. enterica* Serovar Typhimurium wurde mit *SauIII*A partiell verdaut und über *Bam*HI in das Cosmid pSuperCos1 kloniert (Abb. 16). Die Cosmide wurden durch den Phagen  $\lambda$  verpackt und in dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue MR als Genbank etabliert. 1000 Klone dieser Cosmidbank wurden durch Southern-Kolonieblot auf das Vorhandensein des Virulenz-relevanten Teils der SPI2 untersucht. Mit Sonden gegen die flankierenden Bereiche des TTSS (*ssaT* und *orf 242*, vgl. Abb. 3) wurden sechs Klone gefunden, die den gesamten Sekretionsapparat auf dem Cosmid umfassten. Die Cosmide wurden isoliert und zunächst durch Restriktion mit unterschiedlichen Enzymen auf das Vorhandensein von SPI2 überprüft. Eines der SPI2-kodierenden Cosmide wurde als p1-H4 bezeichnet und für weitere Experimente herangezogen.

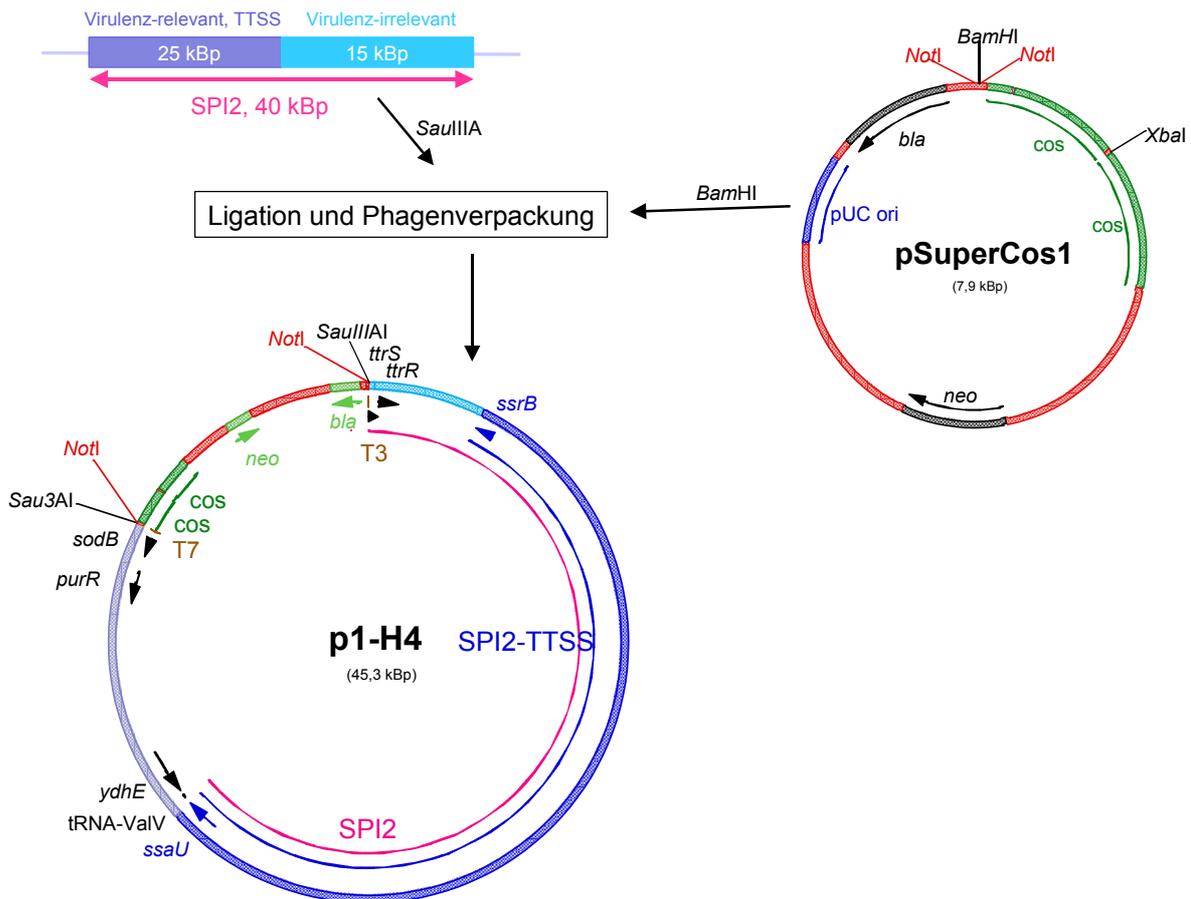


Abb. 16: Schema der Klonierung des SPI2-TTSS in das Cosmid pSuperCos1.

Ein nach partiellem *SauIII*A-Verdau von genomischer *S. enterica* Serovar Typhimurium-DNA isoliertes Fragment, das den Virulenz-relevanten Teil mit den TTSS-Genen von SPI2 enthält, wurde in die *Bam*HI-Schnittstelle von pSuperCos1 kloniert. Eines der Cosmide, welche die TTSS-Genen von SPI2 tragen, wurde als p1-H4 bezeichnet.

Mit Hilfe der Oligonukleotide T3 und T7, die im Vektor pSuperCos1 zu beiden flankierenden Seiten der Insertion komplementär sind, wurde das inserierte *Salmonella*-DNA-Fragment ansequenziert. Die Sequenzdaten zeigten, dass sich das klonierte Fragment mit einer Größe von ~ 37,3 kbp vom Gen *ttrS* im Virulenz-irrelevanten Teil von SPI2 bis über das *tRNA<sup>ValV</sup>*-Gen hinaus zum Gen *sodB* erstreckt (Abb. 16). Somit ist die genetische Information des gesamten TTSS-Apparates mit der des Zwei-Komponenten-Regulationssystems SsrAB im Cosmid p1-H4 vorhanden.

### 3.3.4 Analyse des Wachstums diverser Rezipientenstämmen in SPI2-induzierenden Bedingungen

Das vom Cosmid p1-H4 kodierte SPI2-TTSS sollte funktionell in SPI2-negative Wirte transferiert werden. Als mögliche Wirte wurden unterschiedliche Stämme von *E. coli* (BL21, M15 und XL1-Blue) sowie *Yersinia enterocolitica* WA-C und *S. bongori* SARC

12 ausgewählt. Da die Expression von SPI2-Genen durch das Wachstum der Bakterien in Minimalmedium mit Mangel an Phosphat oder zweiwertigen Kationen wie Magnesium induziert wird (Deiwick *et al.*, 1999), sollte zunächst untersucht werden, ob die putativen Rezipientenstämme in der Lage sind, unter den induzierenden Medienbedingungen zu wachsen. Die jeweiligen Stämme wurden in den Expressions-induzierenden Medien F pH 5,0, F pH 7,0 und PCN-P pH 7,4 sowie den nicht-induzierenden Medien LB pH 5,0, LB pH 7,0 und PCN pH 7,4 über Nacht angezogen. Nach ~16 h Inkubation wurde das Wachstum der Kulturen mittels der Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. Während *Y. enterocolitica* WA-C nur in LB pH 5,0 und LB pH 7,0 gewachsen ist, waren die *E. coli*-Stämme eher in der Lage, in den Minimalmedien zu wachsen. In den induzierenden F-Medien zeigte sich allerdings starke bakterielle Lyse, und die Kulturen wuchsen nur bis zu einer maximalen OD<sub>600</sub> von 0,44 (*E. coli* M15). Das Wachstum der *E. coli*-Stämme in induzierendem PCN-P war sehr gering und ging mit einer Lyse der Bakterienkultur einher. *S. bongori* dagegen hatte in den Minimalmedien ein ähnliches Wachstumsverhalten wie *S. enterica* Serovar Typhimurium und zeigte keine Lyse (Daten nicht dargestellt).

### 3.3.5 Transfer und Regulation der Expression des Cosmid-kodierten SPI2-Sekretionsapparates in SPI2-negativen Wirten

Das Cosmid p1-H4 wurde in die SPI2-negativen bakteriellen Wirte *S. bongori* SARC 12, *E. coli* XL1-Blue und *Y. enterocolitica* WA-C elektrotransformiert. Da *S. bongori* als einziger Rezipienten-Stamm in Minimalmedien ein ähnliches Wachstumsverhalten wie *S. enterica* Serovar Typhimurium zeigte (3.3.4), wurde zunächst nur dieser Stamm mit dem Cosmid p1-H4 auf die Expression der SPI2-Gene in unterschiedlichen Medienbedingungen untersucht. Hierzu wurde *S. bongori* [p1-H4] in induzierenden (F pH 5,0 und F pH 7,0) und nicht-induzierenden Medien (LB pH 5,0, LB pH 7,0, G pH 5,0 und G pH 7,0) über Nacht angezogen. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, und die Expression des SPI2-kodierten Effektorproteins SseB wurde im Western-Blot mit Antikörpern gegen rekombinantes SseB analysiert (Abb. 17).

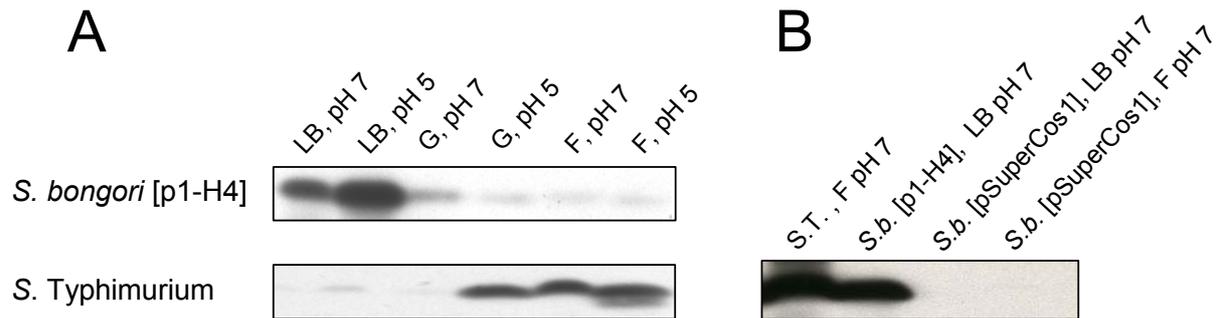


Abb. 17: Gehalte an p1-H4-kodiertem SseB in Kulturen nach Wachstum in verschiedenen Medien.

Der Einfluss von Medienbedingungen auf den Gehalt an p1-H4-kodiertem SseB wurde überprüft. Gesamtzelllysate gleicher Bakterienanzahl (durch  $OD_{600}$  bestimmt) wurden von den einzelnen Kulturen hergestellt, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen das rekombinante SPI2-kodierte Substratprotein SseB analysiert. **A:** Kulturen von *S. bongori* [p1-H4] und *S. enterica* Serovar Typhimurium wurden über Nacht in unterschiedlichen Medien angezogen: SPI2-induzierend (F pH 5,0 und F pH 7,0) und nicht induzierend (LB pH 5,0, LB pH 7,0, G pH 5,0 und G pH 7,0). **B:** Als Kontrolle wurden Kulturen von *S. bongori* sowohl mit dem SPI2-kodierenden Plasmid [p1-H4] als auch mit dem Leervektor [pSuperCos1] über Nacht in unterschiedlichen Medienbedingungen (LB pH 7,0 und F pH 7,0) angezogen. Zusätzlich wurde *S. enterica* Serovar Typhimurium unter induzierenden Bedingungen (F pH 7,0) angezogen.

Die Expression der SPI2-Gene in *S. bongori* wird, anders als bei *S. enterica* Serovar Typhimurium, nicht durch äußere Faktoren wie niedrige Magnesium-Konzentrationen im Medium induziert. Die hohen Mengen an Cosmid-kodiertem SPI2-Protein bei Wachstum in nicht-induzierendem LB pH 5,0 und pH 7,0 und die viel geringeren Mengen bei Wachstum in induzierenden Medien (F pH 5,0 und F pH 7,0) waren ein erster Hinweis darauf, dass das TTSS zwar exprimiert, aber nicht auf gleiche Weise wie bei *S. enterica* Serovar Typhimurium in das regulatorische Netzwerk des Wirtes eingebunden wird.

In den Wirten *Y. enterocolitica* und *E. coli* konnte die Expression der SPI2-Gene wegen des schlechten Wachstums der Stämme in den für *Salmonella* entwickelten Minimalmedien nur in LB überprüft werden. Im Western-Blot konnte mit Hilfe von Antikörpern gegen SseB sowie gegen das rekombinante SPI2-Apparatsprotein SsaP nachgewiesen werden, dass die Cosmid-kodierten SPI2-Gene in den neuen Wirten exprimiert werden (Abb. 18).

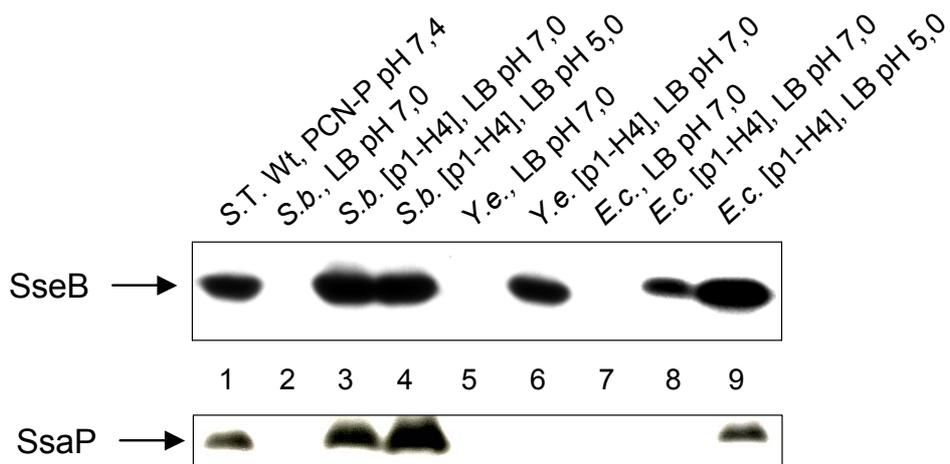


Abb. 18: Mengen an p1-H4-kodierten SPI2-Proteinen SseB und SsaP in unterschiedlichen Wirten nach Wachstum in unterschiedlichen Medienbedingungen.

Bakterien mit p1-H4-kodierten SPI2-Proteinen SseB und SsaP wurden über Nacht in induzierendem Medium angezogen. Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen rekombinantes SseB und SsaP detektiert. 1: *S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp als Positivkontrolle, in PCN-P pH 7,4; 2: *S. bongori* SARC 12, in LB pH 7,0; 3: *S. bongori* [p1-H4], in LB pH 7,0; 4: *S. bongori* [p1-H4], in LB pH 5,0; 5: *Y. enterocolitica* in LB pH 7,0; 6: *Y. enterocolitica* [p1-H4] in LB pH 7,0; 7: *E. coli* XL1-Blue in LB pH 7,0; 8: *E. coli* XL1-Blue [p1-H4] in LB pH 7,0; 9: *E. coli* XL1-Blue [p1-H4] in LB pH 5,0.

Ähnlich wie bei *S. bongori* [p1-H4] wird auch bei *Y. enterocolitica* [p1-H4] und *E. coli* [p1-H4] eine hohe *sseB*-Expressionsrate in LB im Vergleich zur Expression in unter induzierenden Bedingungen gewachsenen *S. enterica* Serovar Typhimurium deutlich.

### 3.3.6 Umklonierung der SPI2-Gene von p1-H4 in einen Vektor mit einfacher Kopienzahl

Die im Vergleich zu *S. enterica* Serovar Typhimurium veränderte Regulation der Cosmid-kodierten SPI2, die bei der Expression von *sseB* und *ssaP* (Abb. 17 und Abb. 18) deutlich wird, ist möglicherweise auf einer erhöhte Kopienzahl des p1-H4 von ca. 7-10 Kopien pro Bakterium zurückzuführen. Um Bedingungen zu schaffen, die denen in *S. enterica* Serovar Typhimurium mit einer chromosomalen Kopie pro Bakterium entsprechen, wurde das SPI2-Fragment mit *NotI* aus p1-H4 ausgeschnitten und über *NotI* in den Bac-Vektor pBeloBac11 umkloniert. Mit Hilfe von Bac-Vektoren können DNA-Fragmente von bis zu 130-150 kBp stabil kloniert werden. Dieser Vektor besitzt nur eine Kopie pro Zelle und damit eine vergleichbare Anzahl an Gen-

kopien wie die chromosomal kodierte Sequenzen (Kim *et al.*, 1996). Das hier neu entstandene Cosmid wurde als pB6 bezeichnet (Abb. 19).

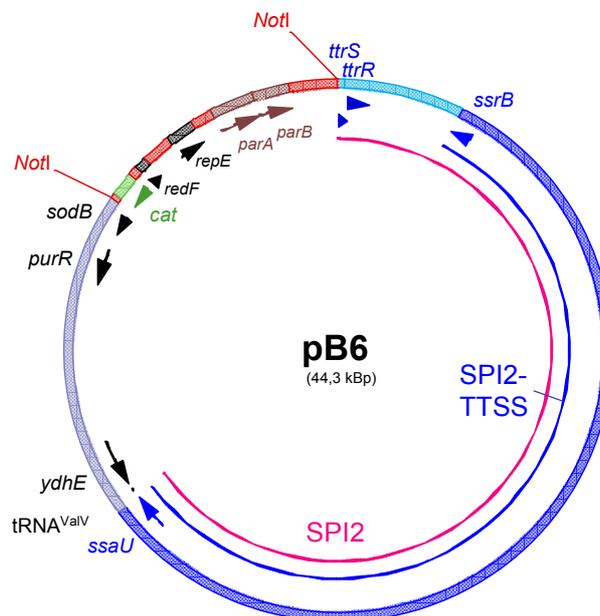


Abb. 19: Der SPI2-kodierende Ein-Kopien-Vektor pB6.

Das Fragment, das den Virulenz-relevanten Teil mit dem Typ III-Sekretionssystem von SPI2 enthält, wurde mit *NotI* aus p1-H4 ausgeschnitten und in die *NotI*-Schnittstelle von pBeloBac11 kloniert (vgl. Abb. 16). Das so entstandene Cosmid wurde als pB6 bezeichnet.

Zur Kontrolle der vollen Funktionalität des durch das Cosmid pB6 kodierten SPI2-Translokationssystems wurden die TTSS-Gene von SPI2 in *S. enterica* Serovar Typhimurium mit dem „One-Step Inactivation System“ (Datsenko & Wanner, 2000) deletiert (s. 2.2.6). Hierzu wurden die Oligonukleotide SPI2-Red-Del-for und SPI2-Red-Del-rev (Tab. 4) eingesetzt. Die vollständige Deletion wurde durch Sequenzierung und mittels PCR-Analyse mit Oligonukleotiden, die zu Genen außerhalb des deletierten Fragmentes komplementär waren, überprüft (Daten nicht gezeigt). Nach Elektrotransformation der SPI2-Deletionsmutante mit dem SPI2-tragenden Cosmid pB6 war die komplementierte Mutante wieder in der Lage, SPI2-Gene wie beispielsweise *sseB* zu exprimieren (Abb. 20).

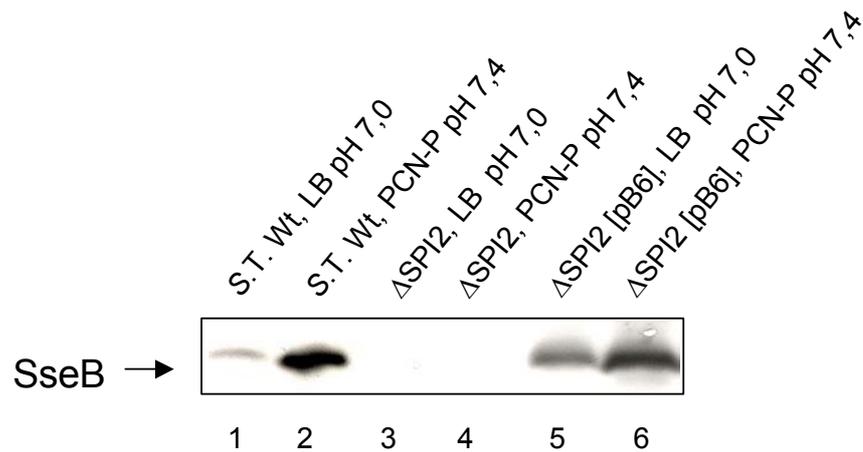


Abb. 20: Das pB6-kodierte SPI2-Sekretionssystem kann eine SPI2-negative *S. enterica* Serovar Typhimurium-Mutante komplementieren.

Bakterien mit pB6-kodierten SPI2-Proteinen wurden über Nacht in verschiedenen Medien angezogen. Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen rekombinantes SseB detektiert. **1:** *S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp, in LB pH 7,0; **2:** *S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp als Positivkontrolle, in PCN-P pH 7,4; **3:** *S. enterica* Serovar Typhimurium  $\Delta$ SPI2, in LB pH 7,0; **4:** *S. enterica* Serovar Typhimurium  $\Delta$ SPI2, in PCN-P pH 7,4; **5:** *S. enterica* Serovar Typhimurium  $\Delta$ SPI2 [pB6], in LB pH 7,0; **6:** *S. enterica* Serovar Typhimurium  $\Delta$ SPI2 [pB6], in PCN-P pH 7,4.

Die Effekte der unterschiedlichen Medienbedingungen zeigen, dass die komplementierte SPI2-Deletionsmutante SPI2-Gene unter den gleichen Bedingungen exprimiert wie der Wildtyp von *S. enterica* Serovar Typhimurium (Abb. 20).

### 3.3.7 Regulation von Genexpression und Sekretion pB6-kodierter SPI2-Proteine in *S. bongori*

Das Cosmid pB6 wurde in *S. bongori* SARC 12 und *E. coli* XL1-Blue elektrotransformiert und durch PCR mit den Oligonukleotiden *sseB*-for und *sseB*-rev verifiziert. Die pB6-tragenden Transformanten wurden in Minimalmedien unter SPI2-induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen angezogen und im Western-Blot auf die Expression von *sseB* überprüft.

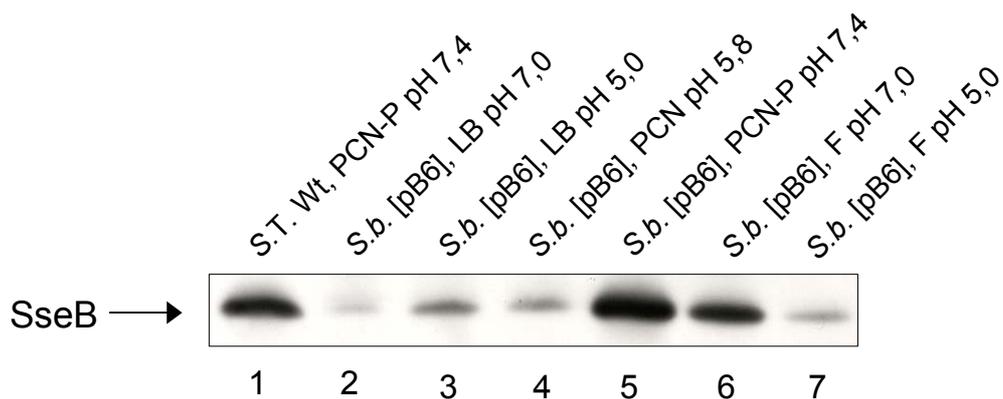


Abb. 21: Einfluss von Medienbedingungen auf die Expression von pB6-kodiertem *sseB* in *S. bongori*.

Bakterien mit pB6-kodierter SPI2 wurden über Nacht in unterschiedlichen Medien angezogen. Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen rekombinantes SseB detektiert. 1: *S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp als Positivkontrolle, in PCN-P pH 7,4; 2: *S. bongori* [pB6], in LB pH 7,0; 3: *S. bongori* [pB6], in LB pH 5,0; 4: *S. bongori* [pB6], in PCN pH 5,8; 5: *S. bongori* [pB6], in PCN-P pH 7,4; 6: *S. bongori* [pB6], in F pH 7,0; 7: *S. bongori* [pB6], in F pH 5,0.

In *S. bongori* [pB6] ist die SseB-Bande in Medium PCN-P vergleichbar mit der von in Medium PCN-P gewachsenen *S. enterica* Serovar Typhimurium. Eine Bande mit ähnlicher Intensität ist für *S. bongori* [pB6] in Medium F bei pH 7,0 zu sehen, während die Bandenintensitäten unter nicht-induzierenden Medienbedingungen (PCN, LB pH 5,0 und LB pH 7,0) weitaus schwächer sind. Die Bande in Medium F bei pH 5,0 ist ähnlich stark wie unter nicht-induzierenden Bedingungen. Man würde jedoch eher eine Bandenstärke wie bei Medium F pH 7,0 erwarten, da der pH-Wert keinen Einfluss auf die Expression von SPI2-Genen hat (Beuzon *et al.*, 1999). Vermutlich erfolgt unter diesen stark limitierten Medienbedingungen ein schnellerer Abbau des Proteins.

Aus den Western-Blot-Daten geht hervor, dass die Expression der auf dem Cosmid pB6 kodierten SPI2-Gene in *S. bongori* offensichtlich ähnlich reguliert wird wie die der SPI2-Gene in *S. enterica* Serovar Typhimurium.

### 3.3.8 Sekretion der Cosmid-kodierten SPI2-Proteine

Die Sekretion von SPI2-Proteinen auf die Bakterienoberfläche erfordert einen funktionstüchtigen, in seinem Aufbau und seiner Funktion vollständig regulierten SPI2-Sekretionsapparat. Im Folgenden wurde überprüft, ob das auf den 25 kBp in pB6 ko-

dierte TTSS ebenfalls in der Lage ist, auch in *per se* SPI2-defizienten Stämmen, denen das regulative Netzwerk für SPI2-Expression und -Sekretion fehlt, SPI2-Substratproteine auf die Bakterienoberfläche zu sekretieren.

Beuzon *et al.* (Beuzon *et al.*, 1999) haben gezeigt, dass die Sekretion von SPI2-Substratproteinen durch einen niedrigen pH-Wert *in vitro* (i.e. pH 5,0- 5,8) induziert werden kann. Kulturen von *S. enterica* Serovar Typhimurium, *S. bongori* [pB6], *E. coli* [p1-H4] und *Y. enterocolitica* [p1-H4] wurden bei saurem pH in PCN-P bzw. LB über Nacht angezogen. Die in den Überstand sekretierten Proteine wurde durch direkte Fällung mit TCA isoliert, während die an der Bakterienoberfläche adhären Proteine zunächst abgeschert und anschließend durch Fällung isoliert wurden (s. 2.3.2). Nach Auftrennung über SDS-PAGE wurden die Proteinfractionen im Western-Blot auf das Vorhandensein von SseB überprüft. Als Kontrolle dafür, dass es sich bei den im Überstand und in der Abwaschfraktion detektierten Proteinen um sekretierte Proteine handelt und nicht um ein Artefakt durch Zellyse, wurden die Sediment-Fraktion und die sekretierte Fraktion (Abwaschfraktion und Überstand zusammen) auf das Vorhandensein des Hitzeschockproteins HSP 60 überprüft, welches sich in den Zellen befindet, aber nicht sekretiert wird (Abb. 22).

SseB wird in *S. bongori* [pB6] unter Sekretions-induzierenden Bedingungen, d.h. bei Wachstum in PCN-P bei pH 5,8, in vergleichbaren Mengen sekretiert wie SseB unter gleichen Wachstumsbedingungen in *S. enterica* Serovar Typhimurium. Das Hitzeschockprotein HSP 60 konnte nicht im Zellüberstand beobachtet werden, was beweist, dass es sich bei dem im Überstand detektierten SseB nicht um eine Zellyse-Artefakt, sondern um sekretiertes Protein handelt. Demzufolge scheint die Expression der pB6-kodierte TTSS-Gene und die Sekretion der darauf kodierten Proteine in *S. bongori* einer ähnlichen Regulation zu unterliegen wie die chromosomal integrierte SPI2 in *S. enterica* Serovar Typhimurium.

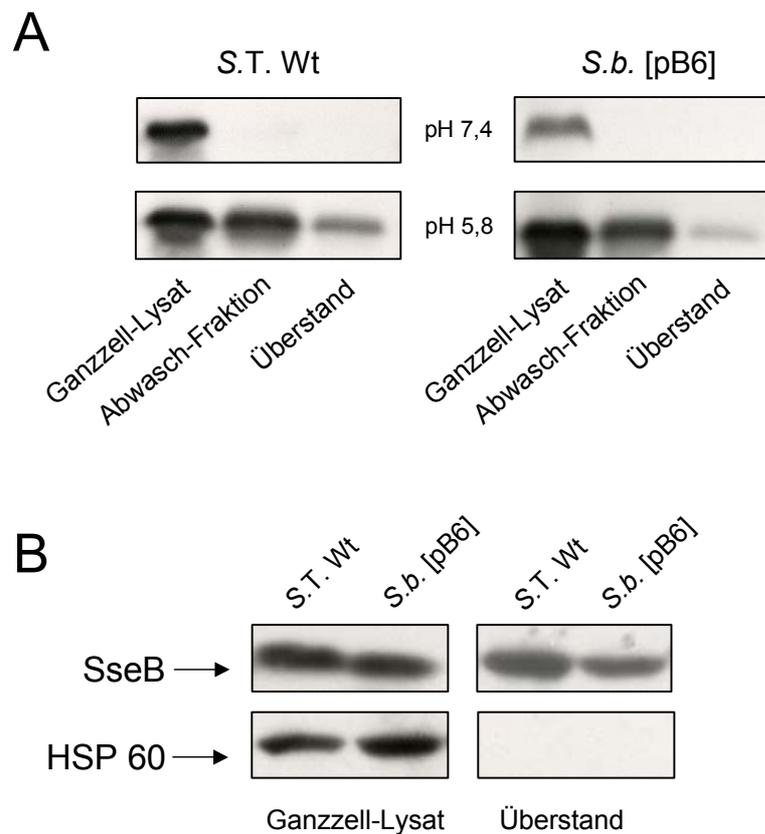


Abb. 22: Nachweis der Sekretion von SseB in *S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp und *S. bongori* als heterologem Träger von SPI2.

Bakterienkulturen wurden über Nacht in PCN-P unter Sekretions-induzierenden (pH 5,8) und nicht induzierenden (pH 7,4) Bedingungen angezogen. In den Überstand sekretierte Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. **A:** SseB wurde in den unterschiedlichen Proteinfraktionen von Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium (S.T. Wt) und *S. bongori* [pB6] mit Antikörpern gegen SseB detektiert. **B:** Die Proteinsekretion wurde in Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium (S.T. Wt) und *S. bongori* [pB6] durch das nicht-sekretierte Hitzeschockprotein HSP 60 mit einem polyklonalen Antikörper gegen HSP 60 überprüft.

### 3.3.9 Vermittelt der Transfer von SPI2 die Fähigkeit von *S. bongori* zur Replikation im Makrophagen?

Das von SPI2 kodierte Typ III-Sekretionssystem ist in *S. enterica* Serovar Typhimurium für die intrazelluläre Replikation in der eukaryontischen Zielzelle und die systemische Ausbreitung der Bakterien im Wirtsorganismus verantwortlich (Hensel, 2000). Dieser Phänotyp kann im Zellkultur-Modell dargestellt werden durch Infektion von murinen Makrophagen bzw. humanen Epithelzellen mit *S. enterica* Serovar Typhimurium und anschließender mehrstündiger Inkubation, während der es zur intrazellulären Vermehrung der Bakterien kommt.

Es wurde gezeigt, dass in *S. bongori* [pB6] sowohl die Expression der Cosmid-kodierten Gene des SPI2-Sekretionsapparates als auch die Sekretion der SPI2-Effektorproteine durch die gleichen äußeren Signale induziert werden können wie die der chromosomalen SPI2 in *S. enterica* Serovar Typhimurium (Abb. 21 und Abb. 22). Diese Signale entsprechen möglicherweise den Zuständen innerhalb der infizierten Wirtszelle. Daher lag die Vermutung nahe, dass *S. bongori* durch den experimentellen Transfer der SPI2-Gene im Gegensatz zum *S. bongori*-Wildtyp zur intrazellulären Replikation in Epithelzellen und Makrophagen befähigt sein könnte.

#### 3.3.9.1 Mikroskopische Analyse der intrazellulären Replikation von *S. bongori* [pB6] in J774.A1-Makrophagen

Im Zellkultur-Versuch sollte untersucht werden, ob *S. bongori* [pB6] ebenso wie *S. enterica* Serovar Typhimurium im Makrophagen überleben und sich replizieren kann. Zum einen wurde ein mikroskopischer Ansatz zur Analyse der intrazellulären Replikation von *S. bongori* [pB6] durchgeführt. Hierzu wurden die eingesetzten Stämme jeweils mit GFP („green fluorescent protein“) markiert, indem sie mit dem konstitutiv GFP-exprimierenden Plasmid pFPV25.1 (Valdivia & Falkow, 1997) transformiert wurden.

Die murine Makrophagen-Zelllinie J774.A1 wurden in 24-Kavitäten-Platten auf Deckgläschen ausgesät und bis zur Semi-Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden mit den grün-fluoreszierenden Stämmen von *S. enterica* Serovar Typhimurium und *S. bongori* [pB6] mit jeweils einer MOI von 10 infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach 2 und 21 Stunden wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert und mikroskopisch ausgewertet (Abb. 23).

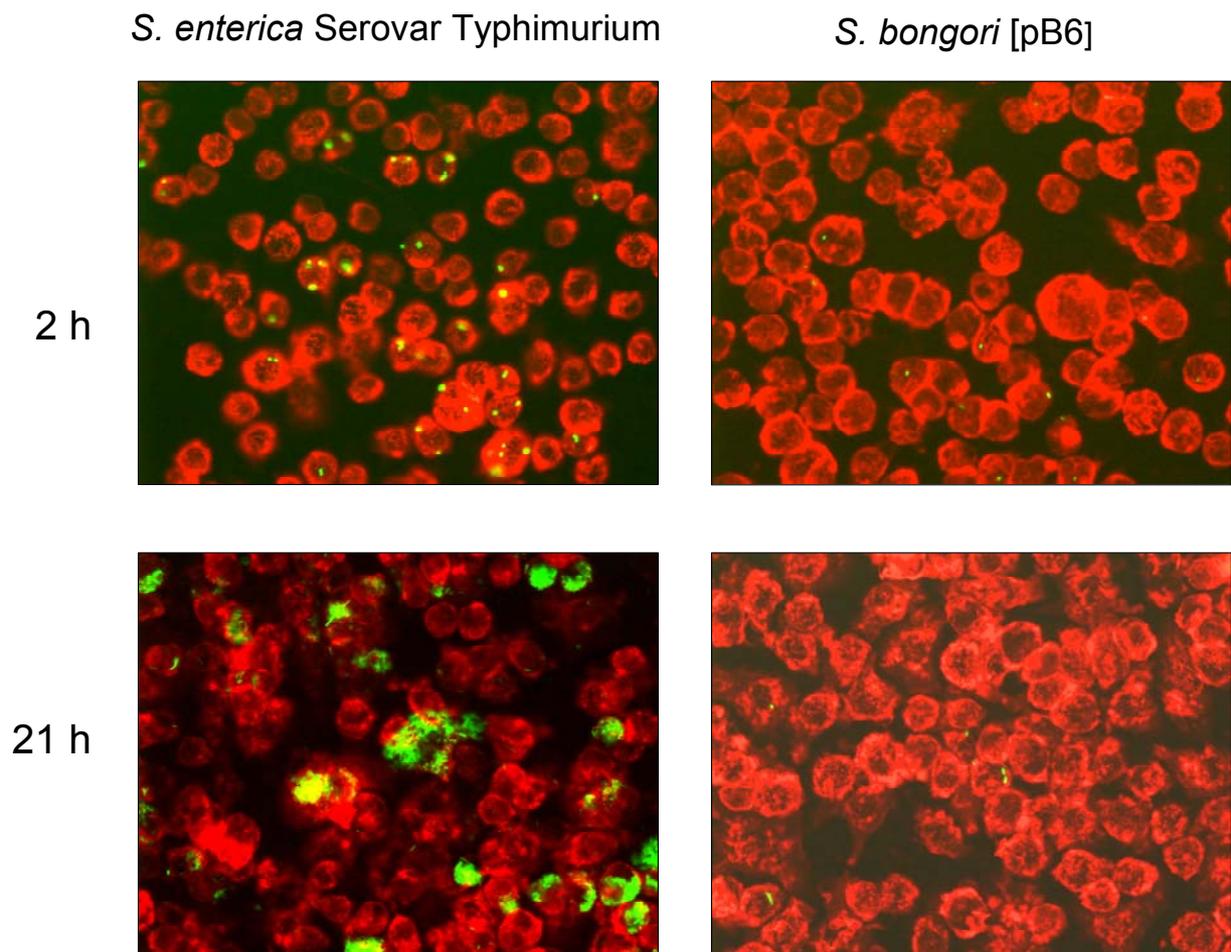


Abb. 23: SPI2 allein befähigt nicht zur intrazellulären Replikation von *S. bongori*.

Murine J774.A1-Makrophagen wurden mit GFP-markierten *S. enterica* Serovar Typhimurium und *S. bongori* [pB6] mit einer MOI von 10 infiziert und anschließend bei 37°C inkubiert. Nach 2 und 21 h wurden die Zellen fixiert und das zelluläre F-Aktin mit Phalloidin-Texas-Red rot angefärbt.

Während sich *S. enterica* Serovar Typhimurium innerhalb von 21 Stunden intrazellulär auf ein Vielfaches der ursprünglich internalisierten Bakterienzahl vermehrt hat, war diese intrazelluläre Replikation bei *S. bongori* [pB6] nicht zu beobachten.

### 3.3.9.2 Analyse des intrazellulären Überlebens und Replikation von *S. bongori* [pB6]

Um eine quantitative Aussage über die Replikationsrate von *S. bongori* [pB6] in eukaryontischen Zellen im Vergleich zu *S. enterica* Serovar Typhimurium machen zu können, wurde ein Gentamicin-Schutz-Versuch durchgeführt (s. 2.4.1). Murine J774.A1-Makrophagen wurden in 24-Kavitäten-Platten bis zur Semi-Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit *S. enterica* Serovar Typhimurium, *S. bongori*, *S. bongori* [pBeloBac11] und *S. bongori* [pB6] infiziert und mehrere Stun-

den bei 37°C inkubiert. Nach 2, 8 und 21 h wurden die Zellen lysiert, die Bakterien-suspension in mehreren Verdünnungsstufen auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht inkubiert. Während sich die intrazelluläre Bakterienzahl von Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium innerhalb von 21 h ca. 100-fach vermehrt hat, blieb die Zahl der intrazellulären *S. bongori*-Stämme mit und ohne pB6 über den gesamten Zeitraum konstant oder reduzierte sich etwas um den Faktor 10. Somit war die Übertragung des SPI2-TTSS nicht ausreichend, um eine intrazelluläre Replikation von *S. bongori* zu ermöglichen.

### 3.3.10 Suche nach weiteren für die intrazelluläre Replikation relevanten Proteinen außerhalb SPI2

Durch den Transfer des Virulenz-relevanten Bereichs von SPI2 in einen SPI2-negativen Wirt konnte die regulierte Expression der SPI2-Gene und auch die Sekretion von SPI2-kodierten Proteinen erreicht werden. Wahrscheinlich sind jedoch neben der SPI2 noch weitere Faktoren für den intrazellulären Replikations-Phänotyp verantwortlich, da dieser in eukaryontischen Zellen nicht erzielt werden konnte.

Für die *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) konnte gezeigt werden, dass mehrere translozierte Effektoren, die für den Invasions-Phänotyp verantwortlich sind, außerhalb von SPI1 kodiert sind (Miroid *et al.*, 2001). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch bei SPI2 nicht alle für den intrazellulären Replikations-Phänotyp entscheidenden Proteine innerhalb der Pathogenitätsinsel 2 kodiert sind. Mittlerweile sind eine Reihe von Proteinen bekannt, die außerhalb von SPI2 kodiert sind und über das Sekretionssystem von SPI2 transloziert werden (Tsolis *et al.*, 1999a; Miao & Miller, 2000; Knodler *et al.*, 2002), jedoch ist deren Beitrag zum SPI2-vermittelten intrazellulären Phänotyp bislang ungeklärt.

Im Tiermodell sollte untersucht werden, ob eine das gesamte Genom von *S. enterica* Serovar Typhimurium repräsentierende Cosmidbank in der Lage ist, in *S. bongori* [pB6] den Phänotyp der systemischen Infektion im Mausmodell zu übertragen. Zu diesem Zweck wurde *S. bongori* [pB6] mit einem Gemisch von pSuperCos1-Cosmiden, die jeweils ca. 37-43 kBp chromosomale *S. enterica* Serovar Typhimurium-DNA enthalten, elektrotransformiert. Einzelklone, die auf Antibiotika-Platten sowohl pB6 als auch ein pSuperCos1-Cosmid mit Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium-DNA enthielten, wurden von den Platten abgekratzt, gemischt und in einer infektiösen Dosis von  $10^5$ - $10^6$  cfu intraperitoneal in 3 BALB/c-Mäuse gespritzt.

Als Kontrollen wurden jeweils 3 weitere Mäuse mit  $10^5$  cfu *S. bongori* und *S. bongori* [pB6] mit dem pSuperCos1-Leervektor infiziert. Nach drei Tagen wurden Milz und Leber entnommen, homogenisiert und ausplattiert. Es konnten jedoch keine Bakterien reisoliert werden. Somit war die Cosmidbank von *S. enterica* Serovar Typhimurium-DNA nicht in der Lage, in *S. bongori* [pB6] den Phänotyp der systemischen murinen Salmonellose zu vermitteln.

### 3.3.11 Translokation von SPI2-Effektorproteinen aus *S. bongori* in eukaryontische Zielzellen

Die Funktionalität des pB6-kodierten SPI2-Fragmentes als Sekretionsmaschinerie in *S. bongori* [pB6] konnte dadurch nachgewiesen werden, dass in *in vitro*-Versuchen das SPI2-Effektorprotein SseB aus dem Bakterium in das umgebende Medium sekretiert wurde (3.3.7). Inwieweit der Typ III-Sekretionsapparat in der Lage ist, auch innerhalb von Wirtszellen Proteine zu sekretieren und ins Zellinnere zu translozieren, sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden.

Von den mittlerweile bekannten Proteinen, die in *S. enterica* Serovar Typhimurium über das SPI2-Sekretionssystem ausgeschleust werden, ist nur SifA als ein eindeutiger Virulenzfaktor in der systemischen Mauseinfektion identifiziert und charakterisiert worden. SifA ist in Epithelzellen wie beispielsweise HeLa-Zellen für die Bildung sogenannter „SIFs“ („*Salmonella*-induzierte Filamente“) verantwortlich (Garcia del Portillo *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Beuzon *et al.*, 2000). SIFs stellen filamentartige tubuläre Membranstrukturen der *Salmonella*-enthaltenden Vakuolen („*Salmonella*-containing vacuoles“, SCV) dar, die aus lysosomalem Glykoprotein bestehen. Diese Filamente können durch Färben von infizierten Zellen mit Antikörpern gegen das Lysosomen-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP-1) sichtbar gemacht werden.

#### 3.3.11.1 Klonierung von *sifA* und Etablierung in *S. bongori*

Das Gen *sifA* wurde aus *S. enterica* Serovar Typhimurium NCTC 12023 mittels PCR amplifiziert und als Fusion mit dem Epitop M45 in den Vektor pWSK29 kloniert. Der daraus resultierende Vektor wurde als p2104 bezeichnet (s. Tab. 2). Nach Transformation von p2104 in *S. enterica* Serovar Typhimurium wurde zunächst unter verschiedenen Medienbedingungen im Western-Blot die Synthese von SifA-M45 mit dem monoklonalen Antikörper gegen das M45-Epitop getestet (Abb. 24). Für das SifA-M45-Fusionsprotein wird dabei eine Bande mit der molekularen Masse von ca.

41 kDa erwartet. Eine zweite Bande von ungefähr 25 kDa deutet möglicherweise auf eine Instabilität des Fusionsproteins hin. Hinweise auf die Instabilität oder Degradation von SifA-Fusionsproteinen gab es schon früher (Beuzon *et al.*, 2000; Miao & Miller, 2000).

Unter Anzucht-Bedingungen in Medien mit neutralem pH-Wert ist sowohl im Hintergrund des Wildtyps als auch der Sekretionsmutante die größte Proteinmenge bei Wachstum in PCN-P zu sehen (Abb. 24A). Die Induktion der Expression unter  $Mg^{2+}$ -Mangel (Medium F) bedingt nur eine geringfügig stärkere Bandenintensität im Vergleich zum Minimalmedium mit hoher  $Mg^{2+}$ -Konzentration (Medium G). Vergleichbare Bandenintensitäten sind für beide Stämme bei Wachstum in saurem pH zu beobachten. Da diese Bedingungen die Sekretion von SPI2-Proteinen *in vitro* induzieren, wurde die Sekretion von SifA-M45 für *S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp und die sekretionsdefiziente Mutante *ssaV*<sup>-</sup> in PCN-P unter induzierenden Bedingungen (pH 5,8) und unter nicht-induzierenden Bedingungen (pH 7,4) getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein SifA-M45 bei saurem pH in der Abwaschfraktion, die die an der Bakterienoberfläche adhären Proteine enthält, vorhanden ist, nicht aber bei neutralem pH (Abb. 24B). Das Aggregieren der Proteine auf der Bakterienoberfläche könnte auf die artifizielle Zusammensetzung des Sekretionsmedium zurückzuführen sein, den sauren pH und das Fehlen von Peptiden und Polysacchariden als komplexe Nahrungsfaktoren. Zusätzlich fällt auf, dass in der Abwaschfraktion unter sauren Bedingungen nur die 41 kDa-Bande nachweisbar ist, nicht aber die Degradationsbande von 25 kDa. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nur das Fusionsprotein der vollen Länge vom SPI2-TTSS sekretiert wird, nicht aber die N-terminal verkürzte Form, die im bakteriellen Zytoplasma verbleibt. In der Sekretionsmutante ist keine SifA-M45-Proteinbande in der Abwaschfraktion zu detektieren.

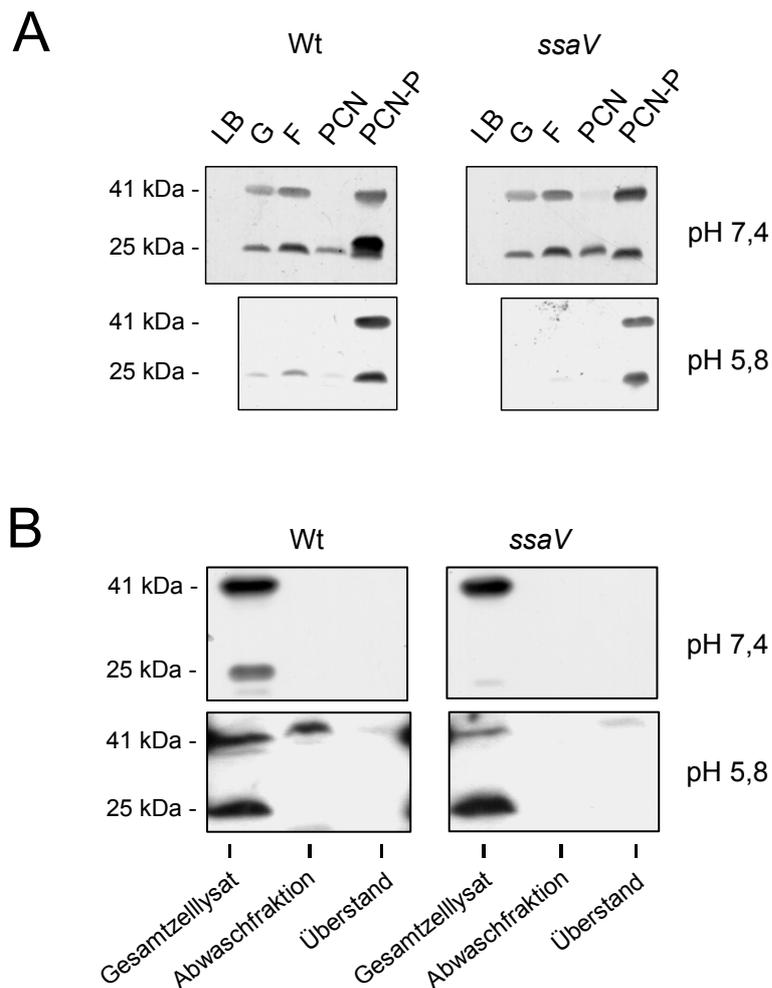


Abb. 24: Effekt von Wachstumsbedingungen auf die Expression der *sifA*::M45-Fusion und Analyse der Sekretion von SifA-M45.

*S. enterica* Serovar Typhimurium-Wildtyp (Wt) und eine sekretionsdefiziente Mutante (*ssaV*) tragen das Plasmid p2104 mit der *sifA*::M45-Fusion. **A**: Anzucht in unterschiedlichen Medien (induzierend für Expression: F und PCN-P; nicht induzierend: LB, G und PCN) angezogen. Die Proteine gleicher Bakterienmengen, angeglichen durch die optische Dichte  $OD_{600}$ , wurden unter denaturierenden Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das M45-Epitop detektiert. **B**: Die Stämme wurden unter induzierenden Bedingungen (PCN-P, pH 5,8 und pH 7,4) angezogen. Die Proteinfractionen von Sediment (Gesamtzelllysät), an der Zelloberfläche adhärenierte sekretierte Proteinen (Abwaschfraktion) und in den Überstand sekretierte Protein (Überstand) wurden unter denaturierenden Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das M45-Epitop detektiert.

Das STE-Gen *sifA* kann vom Plasmid p2104 unter SPI2-induzierenden Bedingungen exprimiert werden. Auch ist die Sekretion von SifA-M45 unter *in vitro*-Bedingungen in *S. enterica* Serovar Typhimurium möglich. Das Plasmid p2104 wurde daher in die Stämme *S. bongori* und *S. bongori* [pB6] elektrotransformiert. Kulturen von *S. bon-*

*gori* [p2104] und *S. bongori* [pB6][p2104] wurden über Nacht in PCN-P in neutralem pH angezogen, und die Expression wurde von *sifA*::M45 im Gesamtzelllysat durch Western-Blot analysiert (Abb. 25).

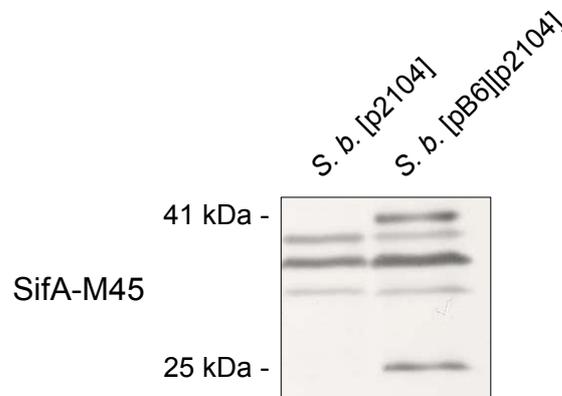


Abb. 25: *sifA*::M45 wird unter SPI2-induzierenden Bedingungen in *S. bongori* [pB6][p2104] exprimiert.

*S. bongori* [p2104] und *S. bongori* [pB6][p2104] wurden über Nacht in PCN-P bei pH 7,4 angezogen. Die gleiche Menge an Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das M45-Epitop detektiert.

Unter SPI2-induzierenden Bedingungen kann in *S. bongori* [pB6][p2104] die Expression der *sifA*::M45-Fusion durch das Vorhandensein der Cosmid-kodierten SPI2-Gene induziert werden. Dagegen sind in *S. bongori* [p2104] ohne SPI2 keinerlei Proteinbanden von SifA-M45 detektierbar, da das Zwei-Komponenten-Regulationssystem SsrAB von SPI2 fehlt (Abb. 25).

### 3.3.11.2 *S. bongori* [pB6]-vermittelte SIF-Bildung in Epithelzellen

Die Fähigkeit des pB6-kodierten SPI2-Sekretionssystems, unter *in vitro*-Bedingungen in *S. bongori* SPI2-Gene zu exprimieren und Effektorproteine zu sekretieren, konnte eindeutig gezeigt werden (Abb. 21 und Abb. 25). Mit Hilfe des auf dem Plasmid p2104 kodierten Fusionsproteins SifA-M45 sollte nun nachgewiesen werden, ob das Cosmid-kodierte TTSS auch zur intrazellulären Translokation von Proteinen befähigt ist.

Zunächst wurde kontrolliert, ob das von p2104 kodierte SifA prinzipiell in der Lage ist, eine *sifA*-Mutante zu komplementieren. Humane Epithelzellen (HeLa-Zellen) wurden

mit dem *S. enterica* Serovar Typhimurium-Stamm P3H6, bei dem das *sifA*-Gen durch die Insertion eines Minitransposons mit Kanamycin-Cassette (mTn5) ausgeschaltet ist, und mit dem komplementierten Stamm P3H6 [p2104] sowie mit Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium in einer MOI von jeweils 5 infiziert. Nach 6 bis 10 h wurden die Zellen fixiert und die Zellstrukturen und Proteine mit Antikörpern sichtbar gemacht. Dabei wurde das Bakterien-LPS mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper grün-fluoreszierend angefärbt und die zellulären Filamentstrukturen mit einem Primärantikörper gegen LAMP-1 und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper rot-fluoreszierend (Abb. 26).

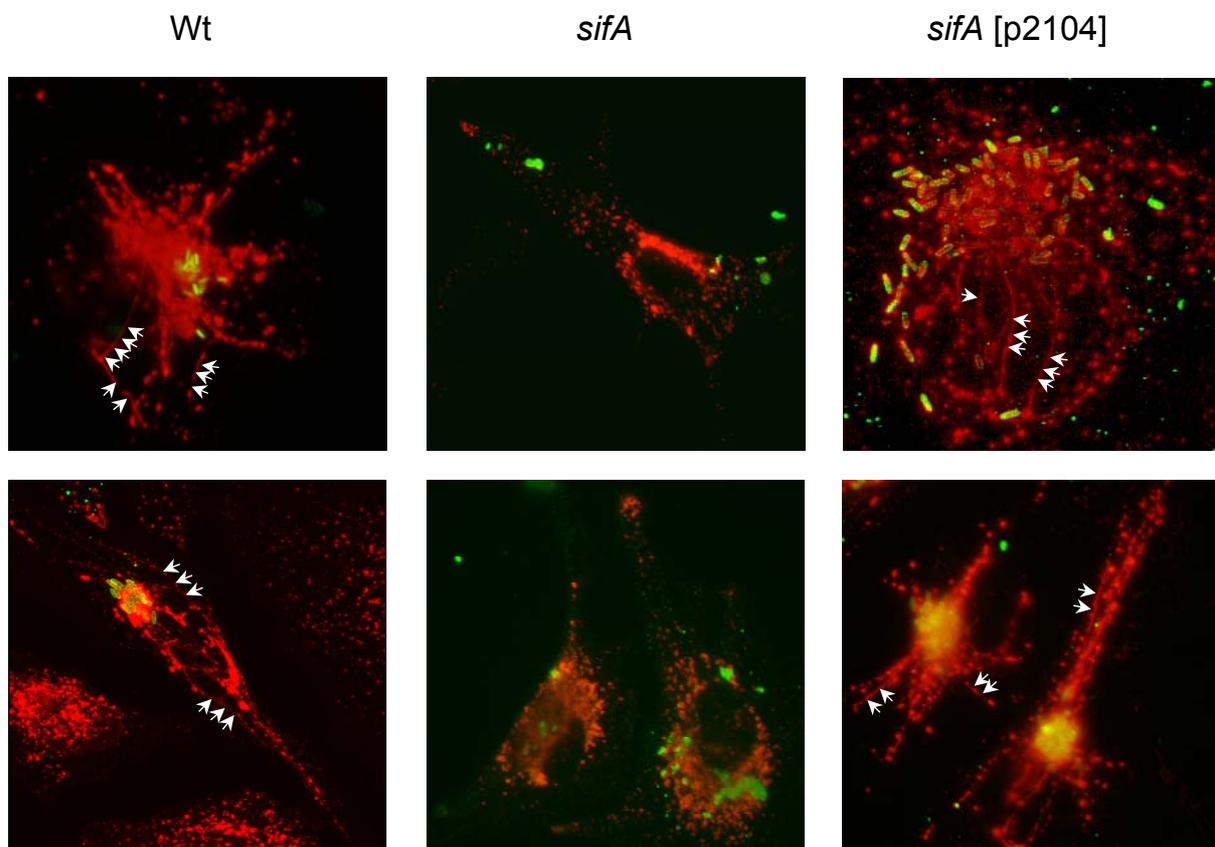


Abb. 26: p2104-kodiertes SifA kann die Bildung von SIFs komplementieren.

HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 5 mit Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium, *S. enterica* Serovar Typhimurium P3H6 (*sifA*) und *S. enterica* Serovar Typhimurium P3H6 [p2104] infiziert. Nach 8 h wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 1 h mit Antikörpern gegen *S. enterica* Serovar Typhimurium-LPS und Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern (grün), Antikörpern gegen murines LAMP-1 und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) behandelt. Für jeden Stamm sind zwei repräsentative Ausschnitte gezeigt.

Wie aus dem HeLa-Infektionsversuch ersichtlich wird (Abb. 26), kann das p2104-kodierte SifA den Phänotyp der Filamentbildung wiederherstellen.

Die Funktionalität des Cosmid-kodierten SPI2-TTSS als intrazellulär induzierter Sekretionsapparat wurde durch Infektionsversuche mit der SPI2-Deletionsmutante überprüft. HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 5 infiziert und nach 10 h fixiert. Die Bakterien sind durch plasmidkodiertes, konstitutiv exprimiertes GFP grün markiert, zelluläres LAMP-1 rot (Abb. 27).

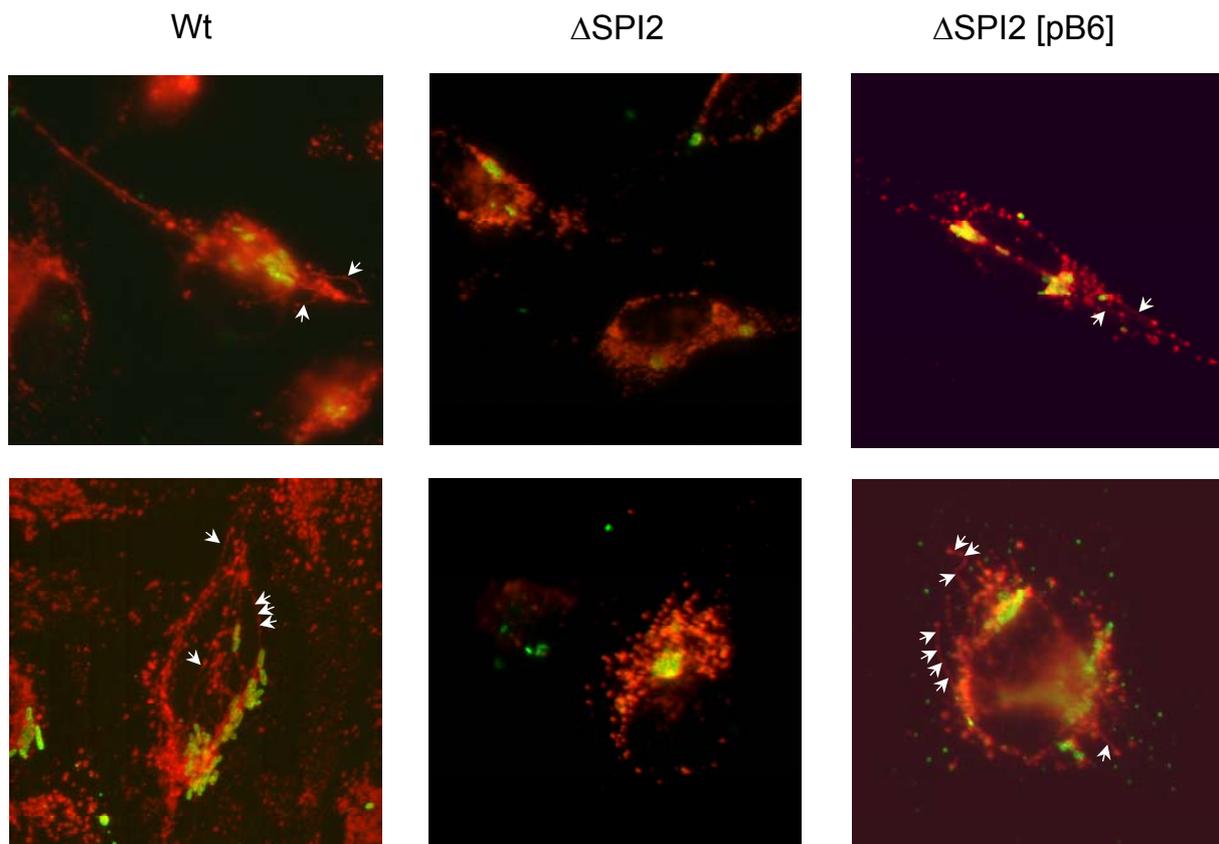


Abb. 27: Komplementation des intrazellulären Phänotyps einer SPI2-Deletionsmutante durch pB6.

HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 5 mit Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium, MvP371 ( $\Rightarrow \Delta$ SPI2) und MvP371 [pB6] ( $\Rightarrow \Delta$ SPI2 [pB6]) infiziert. Nach 10 Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 1 h mit Antikörpern gegen LAMP-1 und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) inkubiert. Für jeden Stamm sind zwei repräsentative Ausschnitte gezeigt.

Während eine SPI2-Deletionsmutante nicht in der Lage ist, die Ausbildung von endosomalen Filamentstrukturen zu induzieren, konnte durch das pB6-kodierte SPI2-Sekretionssystem der SIF-Phänotyp wiederhergestellt werden.

Im weiteren Verlauf wurden in einem vergleichbaren Ansatz HeLa-Zellen mit Stämmen von *S. bongori* [pB6], *S. bongori* [p2104] und *S. bongori* [pB6][p2104] mit einer MOI von 50 infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach 6, 8, 10 und 16 h Inkubation wurden die infizierten Zellen fixiert. Die Bakterien wurden mit Antikörpern gegen *S. bongori*-LPS grün gefärbt und die filamentösen Endosomen mit Antikörpern gegen LAMP-1 rot (Abb. 28).

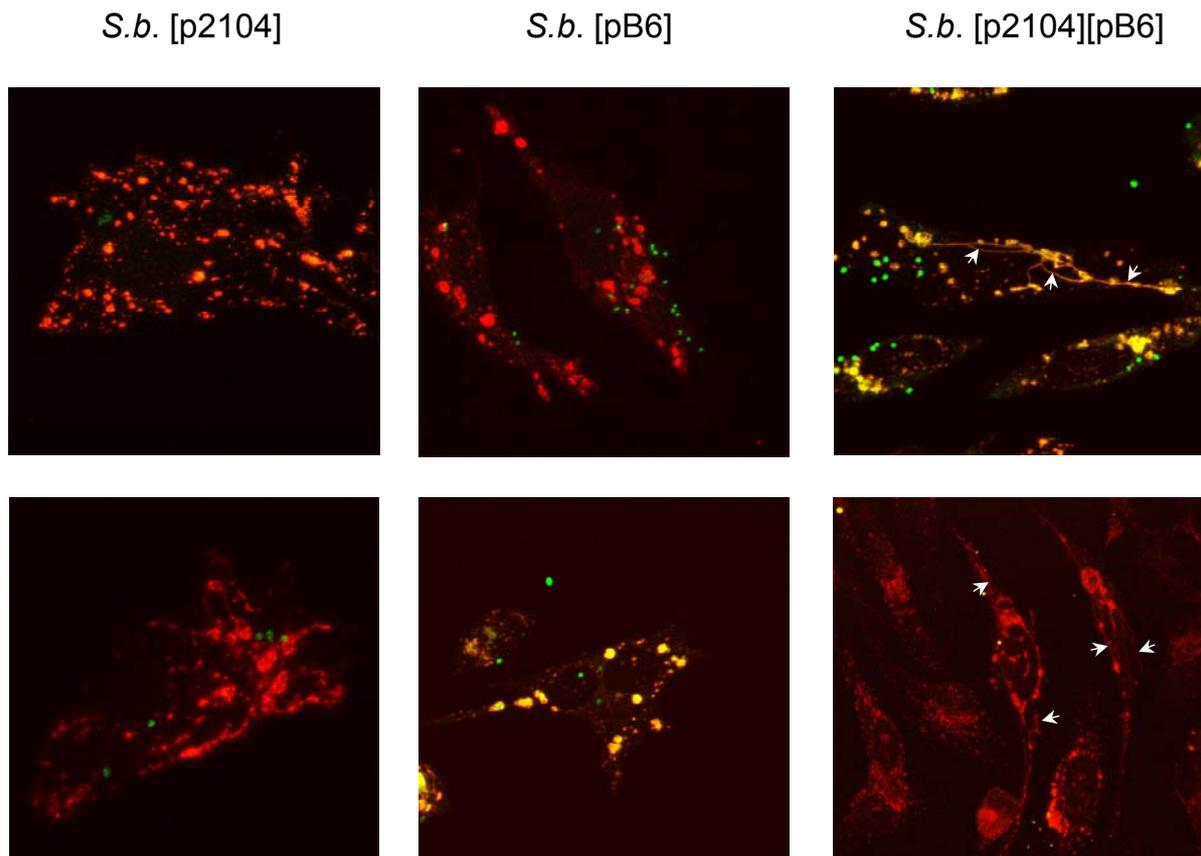


Abb. 28: Das auf p2104 in *S. bongori* [pB6][p2104] kodierte SifA kann die Bildung von SIF-Strukturen in Epithelzellen induzieren.

HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 50 mit *S. bongori* [pB6], *S. bongori* [p2104] und *S. bongori* [pB6][p2104] infiziert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 1 h mit Antikörpern gegen *S. bongori*-LPS und einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpern (grün) sowie mit Antikörpern gegen murines LAMP-1 und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) behandelt. Für jeden Stamm sind zwei repräsentative Ausschnitte gezeigt.

Schon nach 6 h Inkubation sind bei der Infektion von HeLa-Zellen mit *S. bongori* [pB6][p2104] filamentartige Zellstrukturen sichtbar, die sich mit dem späten Endosomen-Marker LAMP-1 anfärben lassen. Diese Strukturen entsprechen den bei der Infektion von Epithelzellen mit Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium entstehenden

den tubulären Endosomenaggregaten der *Salmonella*-haltigen Vakuolen und werden daher auch als „SIFs“ bezeichnet. Die Entstehung dieser SifA-induzierten Filamente in einer mit *S. bongori* [pB6][p2104] infizierten Epithelzelle belegt die Funktionalität des SPI2-Sekretionssystems als Translokation für das SifA-Effektorprotein.

### 3.3.11.3 Translokation eines STE-Proteins durch den heterolog exprimierten SPI2-Sekretionsapparat

Die Induktion der SIF-Bildung innerhalb der eukaryontischen Zelle lässt darauf schließen, dass SifA durch das pB6-kodierte SPI2-Sekretionssystem von *S. bongori* in die Zielzelle transloziert wird. Um translozierte Proteine direkt intrazellulär zu detektieren, wurde das Gen *sseF* aus *S. enterica* Serovar Typhimurium mit dem M45-Epitop fusioniert und in den Vektor pWSK29 kloniert, wobei das Plasmid p2095 entstand (s. Tab. 2). Dieses wurde in *S. enterica* Serovar Typhimurium transformiert und die Synthese von SseF-M45 im Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper gegen das M45-Epitop getestet (Abb. 29A). Phosphatmangel bzw. Magnesiummangel haben auf die Expression der *sseF*::M45-Fusion bei neutralem pH-Wert einen induzierenden Einfluss. Unter sauren Bedingungen ist eine große Menge an SseF-M45 unter Phosphat-Mangel zu beobachten, während ein Mangel an Magnesium unter diesen pH-Bedingungen eher einen umgekehrten Effekt hat.

Nachfolgende Analysen der Sekretion von SseF-M45 *in vitro* zeigten, dass das Fusionsprotein unter induzierenden Bedingungen sekretiert wird und sowohl in der Abwaschfraktion als auch im Kultur-Überstand in großen Mengen detektierbar ist (Abb. 29B, Hansen-Wester *et al.*, 2002).

Nach Elektrotransformation der Stämme *S. bongori* und *S. bongori* [pB6] mit dem Plasmid p2095 wurde die Expression von *sseF*::M45 in Kulturen von *S. bongori* [p2095] und *S. bongori* [pB6][p2095] durch Western-Blot analysiert. Bei Anzucht über Nacht in PCN-P bei saurem pH-Wert kann in *S. bongori* [pB6][p2095] die Expression der *sseF*::M45-Fusion durch das Vorhandensein der Cosmid-kodierten SPI2-Gene induziert werden. Dagegen ist in *S. bongori* [p2095] ohne SPI2 keine Proteinbande für die Expression von *sseF*::M45 detektierbar (Daten nicht gezeigt).

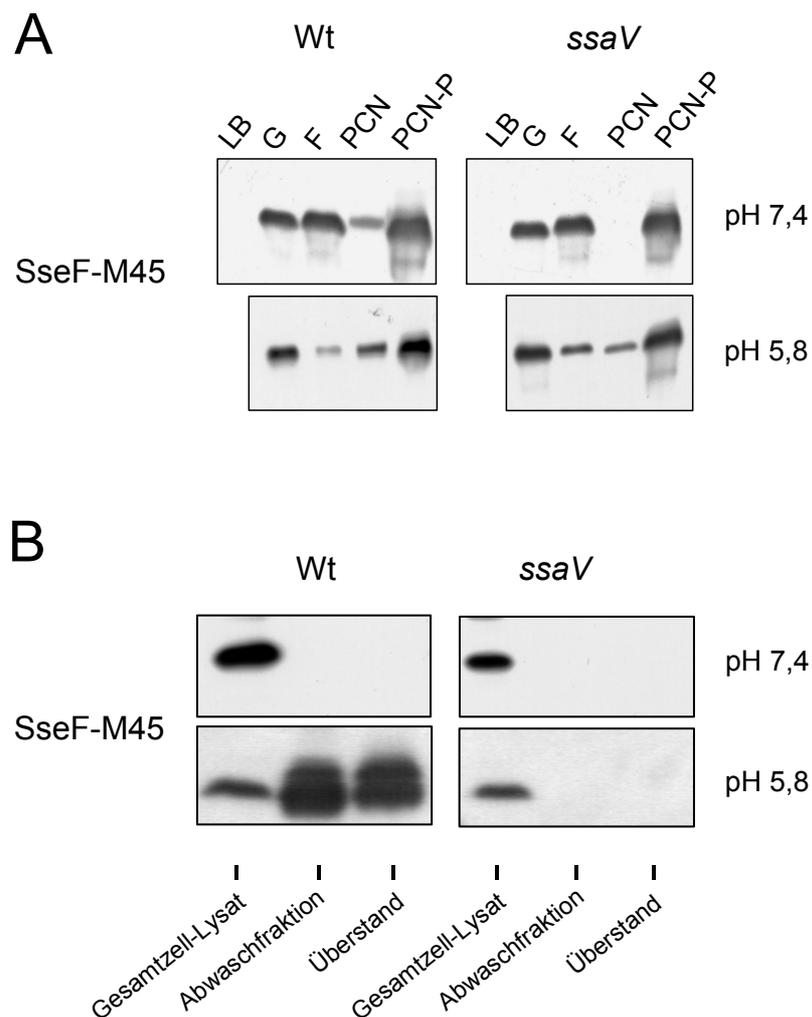


Abb. 29: Einfluss von Medienbedingungen auf die Expression von *sseF*::M45 und Analyse der Sekretion von SseJ-M45.

Wildtyp *S. enterica* Serovar Typhimurium (Wt) und eine sekretionsdefiziente Mutante (*ssaV*) tragen das Plasmid p2095 mit der *sseF*::M45-Fusion (vgl. Abb. 24). **A**: Expression von *sseF*::M45 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Medien. **B**: Sekretion von SseF-M45 nach Wachstum in PCN-P bei unterschiedlichen pH-Werten.

Mit Hilfe des Plasmids p2095 sollte anschließend die Translokation des Fusionsproteins SseF-M45 über das Cosmid-kodierte TTSS in die eukaryontische Zielzelle nachgewiesen werden. Die Translokation dieses Proteins durch *S. enterica* Serovar Typhimurium [p2095] in HeLa-Zellen wurde vor kurzem von Kuhle und Hensel gezeigt (Kuhle und Hensel, unveröffentlicht).

HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 50-100 mit *S. enterica* Serovar Typhimurium [p2095] als Positivkontrolle, *S. bongori* [p2095] als Negativkontrolle und *S. bongori*

[pB6][p2095] infiziert und nach 14 h fixiert. Das Bakterien-LPS wurde mit einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper grün-fluoreszierend angefärbt, das zelluläre Aktin-Gerüst mit Phalloidin-Texas-Red rot-fluoreszierend und das translozierte SseF-M45 mit einem Primärantikörper gegen M45 und einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper blau-fluoreszierend (vgl. Abb. 30).

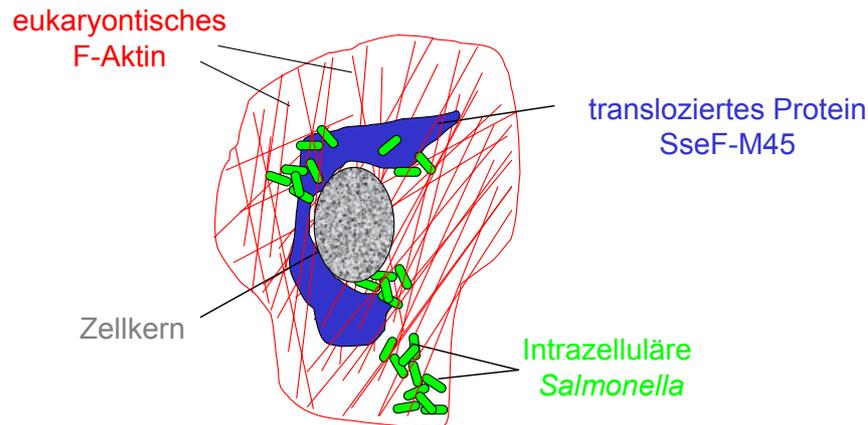


Abb. 30: Modell der Translokation des Effektorproteins SseF-M45 durch *Salmonella* in die eukaryontische Zielzelle.

Eine eukaryontische Zelle (rot gefärbtes F-Aktin) wird mit *Salmonella* (grün) infiziert. Intrazellulär wird das Effektorprotein SseF-M45 (blau) transloziert.

Aus Abb. 31 wird ersichtlich, dass das blau gefärbte Effektorprotein SseF-M45 sowohl von *S. enterica* Serovar Typhimurium [p2095] als auch von *S. bongori* [pB6][p2095] in die Zelle transloziert wird. In dem als Kontrolle eingesetzten Stamm *S. bongori* [p2095], der keine Cosmid-kodierte SPI2 besitzt, kann keinerlei transloziertes, blau gefärbtes Protein intrazellulär detektiert werden (Abb. 31).

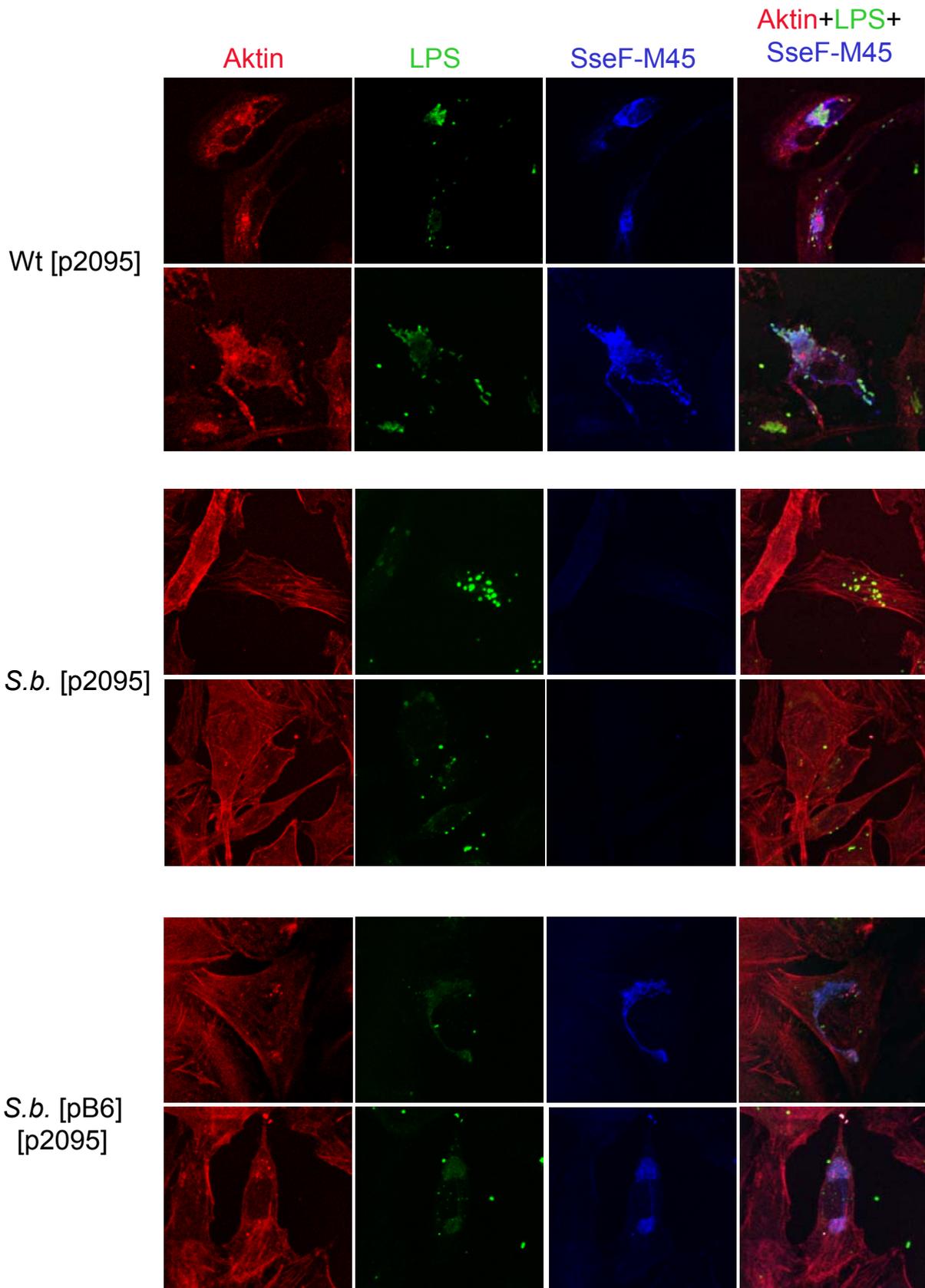


Abb. 31: SseF wird von *S. bongori* über ein heterologes SPI2-Sekretionssystem transloziert.

HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 50-100 Bakterien mit *S. enterica* Serovar Typhimurium [p2095] ( $\Rightarrow$  Wt [p2095]) bzw. *S. bongori* [p2095] ( $\Rightarrow$  *S.b.* [p2095]) und *S. bongori* [pB6][p2095] ( $\Rightarrow$  *S.b.* [pB6][p2095]) infiziert. Nach 14 Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit einem Antikörper gegen das M45-Epitop und 1 h mit einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper (blau) behandelt. Danach wurde jeweils 1 h mit einem Antikörper gegen das jeweilige *Salmonella*-LPS und einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) gefärbt. Das F-Aktin der eukaryontischen Zelle wurde mit Phalloidin-Texas-Red 1 h lang rot gefärbt. Für jeden Stamm sind zwei repräsentative Ausschnitte gezeigt.

In dem hier beschriebenen Versuch konnte das erste Mal gezeigt werden, dass das heterolog in *S. bongori* exprimierte SPI2-TTSS aus *S. enterica* Serovar Typhimurium in der Lage ist, im Zellkultur-Modell Protein direkt in eine Zielzelle zu translozieren.

## 4 DISKUSSION

Bakterien zeigen ein hohes Maß an Variabilität und Anpassungsfähigkeit an neue Lebensräume und Wirte. Der Austausch, Gewinn und Verlust einzelner Gene oder auch größerer DNA-Fragmente kann dabei zu neuen Eigenschaften einer bakteriellen Spezies führen (Groisman & Ochman, 1996). Ein wichtiger Faktor in der Entwicklung bakterieller Spezies ist die Aufnahme horizontal erworbener genetischer Information und deren Einbau in das Chromosom. Die Evolution wird dabei durch solche „Quantensprünge“ in erheblichem Maße vorangetrieben (Groisman & Ochman, 1996). Diese beschreiben das Phänomen, dass nicht nur kleine DNA-Fragmente übertragen werden, sondern vollständige Operone und Gengruppen, die komplexe Funktionen kodieren.

In dieser Arbeit wurde in unterschiedlichen Ansätzen versucht, das evolutionäre Potential und die Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen an neue Lebensräume zu analysieren. Dies wurde am Beispiel von Pathogenitätsinseln in *Salmonella* im Allgemeinen und der *Salmonella enterica*-spezifischen Pathogenitätsinsel SPI2 im Besonderen durchgeführt.

### 4.1 Horizontal transferierte Elemente in *Salmonella*

Eine große Anzahl an bakteriellen Genomen ist mittlerweile sequenziert worden, und ihr Vergleich bietet neue Erkenntnisse und Einblicke in die Evolution einzelner Prokaryonten-Spezies. Die Genome von *Salmonella* und *E. coli* sind zu 80% identisch, unterscheiden sich jedoch unter anderem dadurch, dass in *S. enterica* fünf Pathogenitätsinseln vorhanden sind, die in *E. coli* fehlen (Groisman & Ochman, 1996; Marcus *et al.*, 2000). Da bis auf SPI2 alle *Salmonella*-Pathogenitätsinseln in den unterschiedlichen Subspezies nachweisbar sind, wird davon ausgegangen, dass sie relativ schnell nach der evolutorischen Trennung von *Salmonella* und *E. coli* erworben wurden (Bäumler, 1997; McClelland *et al.*, 2000). Zahlreiche Analysen führten zu der Identifizierung weiterer Proteine, die zur Virulenz von *Salmonella* beitragen. Interessanterweise haben jedoch nur sehr wenige dieser Virulenz-Proteine einen dramatischen Effekt auf die Pathogenität von *Salmonella* spp. – sie spielen vielmehr eine untergeordnete oder redundante Rolle (Slauch *et al.*, 1997). Daher erscheint es

schwierig, aus der unterschiedlichen Verteilung von Virulenzfaktoren einen eindeutigen Rückschluss auf Pathogenese oder Wirtsspezifität zu ziehen.

Der Vergleich einzelner *Salmonella*-Genome zeigt, dass jedes Serovar eine Anzahl von Insertionen und Deletionen im Vergleich zu einem anderen Serovar aufweist (Edwards *et al.*, 2002; diese Arbeit). Ungefähr 500-600 kBp chromosomaler DNA sind Serovar-spezifisch – das entspricht ca. 10-12% des Gesamtgenoms (Edwards *et al.*, 2002). Diese spezifischen Regionen könnten dafür verantwortlich sein, dass unterschiedliche *Salmonella*-Serovare eine Vielzahl verschiedener Wirte infizieren und in ihnen unterschiedliche Symptome sowie verschiedene Immunantworten hervorrufen können. Viele dieser Regionen zeichnen sich durch einen G+C-Gehalt aus, der sich vom restlichen Genom unterscheidet und häufig deutlich niedriger ist. Über die Herkunft dieser DNA-Elemente kann jedoch bisher nur spekuliert werden. Interessanterweise ist bei der Genomsequenzierung von *Y. pestis* (Parkhill *et al.*, 2001) neben dem plasmidkodierten TTSS ein weiteres, chromosomal kodiertes TTSS gefunden worden. Es ist dem SPI2-TTSS aus *Salmonella* sowohl in der Zusammensetzung der Gene als auch in ihrer Anordnung sehr ähnlich. Es konnten allerdings keine Gene in *Y. pestis* gefunden werden, die Ähnlichkeiten zu den *sse*- (Effektor) und *ssc*- (Chaperon) Genen aus *Salmonella* haben. Ob dieses TTSS funktionell ist und auf welche Umweltsignale es reagiert, ist bisher nicht untersucht worden. Da sich diese Gene jedoch offensichtlich im Genom von *Y. pestis* manifestieren konnten, ist es wahrscheinlich, dass sie auch eine Funktion ausüben, da sie sonst im Laufe der Evolution deletiert worden wären. Die Identifizierung dieses zweiten zu SPI2 homologen TTSS unterstützt die oben aufgestellte Hypothese, dass das *Salmonella*-SPI2-Virulon zunächst aus dem TTSS als Kern besteht und im Laufe der Evolution weitere Virulenzfaktoren hinzugewinnt. Weitere Analysen müssen zeigen, ob die Abwesenheit von Effektoren und ihren Chaperonen in *Y. pestis* die Spezifität eines solches Virulons hinsichtlich des bakteriellen Habitats und den Verlauf der Infektion beeinflusst. Das Sekretionssystem stellt das Grundmodul mit einigen wenigen auf SPI2 kodierten Effektoren dar, während der Erwerb weiterer Virulenz-Faktoren zu einer Spezifizierung und Eroberung neuer Lebensbereiche führt. Ob sich das TTSS aus einem gemeinsamen Vorfahren von *S. enterica* und *Y. pestis* nach der Trennung beider Spezies spezifisch entwickelt hat, oder aber ob das System von einem Wirt lateral auf den anderen übertragen wurde, um dann Spezies-spezifisch erweitert zu werden, kann hier nicht beantwortet werden.

Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen lateralen Transfer zwischen *Salmonella* und anderen bakteriellen Spezies gab das kürzlich veröffentlichte Genom des Gram-positiven Bakteriums *Lactococcus lactis*, das einen durchschnittlichen G+C-Gehalt von 35% hat. Das Gen *ycdB* scheint in allen Bakterien und auch in einigen Eukaryonten vorhanden zu sein, wenngleich bisher keine Funktion für dieses Gen beschrieben worden ist. Innerhalb der Spezies *Streptococcus* bzw. *Lactococcus* ist das YcdB-Protein zu ca. 80% identisch, während die Identität zu homologen Genen in Gram-negativen Bakterien nur ca. 40% beträgt. Interessanterweise enthalten *E. coli* und *Salmonella* neben einem Protein mit 40% Identität ein zweites Homolog, das zu 94% mit dem YcdB-Protein aus *L. lactis* identisch ist (Bolotin *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass das *ycdB*-Gen vor ca. 10 Millionen Jahren von *L. lactis* in das Genom von *Salmonella* gelangt ist, wenn man in Betracht zieht, dass sich die Nukleotidabfolge der Gene in beiden Genomen um ca. 10% unterscheidet und die Nukleotide sich in einer Rate von 1% pro einer Million Jahre ändern (Bolotin *et al.*, 2001; Ochman *et al.*, 1999). Möglicherweise hat der Gentransfer zwischen den Organismen im Verdauungstrakt eines Tieres stattgefunden, das größere Mengen an Milchsäurebakterien durch Fermentationsprodukte aufgenommen hat. Da einige Bakterien zwei Kopien des *ycdB*-Gens tragen, ist vermutlich der horizontale Gentransfer von *Lactococcus* die treibende Kraft zur Ausbreitung dieser Genfamilie innerhalb der Enterobakterien (Bolotin *et al.*, 2001). Die Klärung der Funktion dieses Gens könnte möglicherweise weiteren Aufschluss über die evolutionäre Verbreitung geben, jedoch lässt die Präsenz dieses Gens in zahlreichen Organismen darauf schließen, dass es eine wichtige Rolle für seine bakteriellen Wirte spielt.

## 4.2 tRNA-Gene als Ankerpunkte für Pathogenitätsinseln

Der Vergleich von Genomen nahe verwandter pathogener und nicht-pathogener Spezies und Stämme ist ein Weg, um Genabschnitte zu suchen, die für einen pathogenen Erreger spezifisch sind. Ansätze zur Identifikation dieser spezifischen Genom-Fragmente umfassen unter anderem genetische Techniken wie die subtraktive Hybridisierung (Emmerth *et al.*, 1999; Groisman *et al.*, 1993) und mathematische Methoden wie die Anwendung spezifischer Algorithmen zur Identifizierung von Fremdgenen bei sequenzierten Genomen (Karlin, 2001). Bisherige Beobachtungen zeigen, dass eine große Anzahl von Pathogenitätsinseln an tRNA-Genen inseriert ist

(Hacker & Kaper, 2000). Auf diesem Befund basierend wurden in dieser Arbeit Pathogen-spezifische genomische Insertionen an tRNA-Genen innerhalb von *Salmonella* gesucht. Die genetische Organisation in der Nähe der gleichen tRNA-Gene von *E. coli* und *Salmonella* spp. wurde verglichen. Dabei wurden 20 an tRNA-Genen inserierte Elemente gefunden, die innerhalb von *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen unterschiedlich waren. Unter diesen befanden sich auch vorher schon identifizierte PAI aus Stämmen beider Gattungen, so dass dieser Ansatz zur Identifizierung neuer horizontal transferierter DNA-Regionen offensichtlich geeignet ist. Vier dieser neu identifizierten Regionen wurden detaillierter untersucht. Es fiel auf, dass sie eine große Anzahl von Phagengenen und IS-Elementen enthielten, was auf eine Mobilität dieser Region hinweist. Durch DNA-Hybridisierungsanalysen zahlreicher humanpathogener Bakterien konnte gezeigt werden, dass diese Loci *Salmonella*-spezifisch sind. Eine genauere Untersuchung deckte das Vorhandensein mehrerer bekannter Virulenz-Gene auf. Innerhalb der tRNA<sup>ProL</sup>-assoziierten Region fand sich das Gen *sspH2*. Es kodiert für das Effektorprotein SspH2, das über das TTSS von SPI2 transloziert wird (Miao *et al.*, 1999). SopE ist ein über das TTSS von SPI1 transloziertes Effektorprotein (Hardt *et al.*, 1998b) und ist ebenso wie die *pil*-Gene (Zhang *et al.*, 2000) und die Gene der *viaB*-Region (Zhang *et al.*, 1997) in dem tRNA<sup>PheU</sup>-assoziierten Element kodiert, während *pgtE* (Guina *et al.*, 2000) in der tRNA<sup>ArgW</sup>-assoziierten Insertion lokalisiert ist. Diese Gene sind ursprünglich als separate Virulenz-Genloci beschrieben worden. Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass diese Virulenzgene möglicherweise durch horizontalen Gentransfer großer DNA-Fragmente in das Genom der *Salmonella* spp. gelangt sein könnten. Die vergleichenden Analysen zeigen außerdem, dass weitere spezifische Insertionen an unterschiedlichen tRNA-Genen in einem *E. coli*-Laborstamm (K-12) und einem pathogenen *E. coli*-Stamm (0157:H7) zu finden sind. Dabei ist vor allem das *cadABC*-Operon bemerkenswert, das in *E. coli* am Gen der tRNA<sup>PheU</sup> lokalisiert ist, nicht aber an dem entsprechenden tRNA-Gen in *Salmonella*. Die Deletion von *cadA* wurde ursprünglich mit einer erhöhten Virulenz von *Shigella* spp. und enteroinvasiven *E. coli* assoziiert (Maurelli *et al.*, 1998). Homologe des *cadA*-Gens wurden an anderen Stellen in den Genomen von *S. enterica* Serovar Typhimurium und Typhi gefunden (Daten nicht dargestellt).

Unterschiede in der Nukleotidzusammensetzung des Genoms und einzelner DNA-Abschnitte sind Hinweise auf lateral transferierte DNA (Groisman *et al.*, 1992;

Lawrence & Ochman, 1997). Eine kleine Insertion am  $tRNA^{\text{ArgW}}$ -Gen im Serovar Typhi enthält ein Gen für eine O-Antigen-Acetylase zusammen mit mehreren Phagen-Genen und ist durch einen geringen G+C-Gehalt von 39% gekennzeichnet. Dieses DNA-Fragment ist nicht im Serovar Typhimurium vorhanden und könnte daher eine jüngere Insertion darstellen, die erst nach der Trennung der Serovare in das Genom von *S. enterica* Serovar Typhi gelangt ist (vgl. Abb. 32).

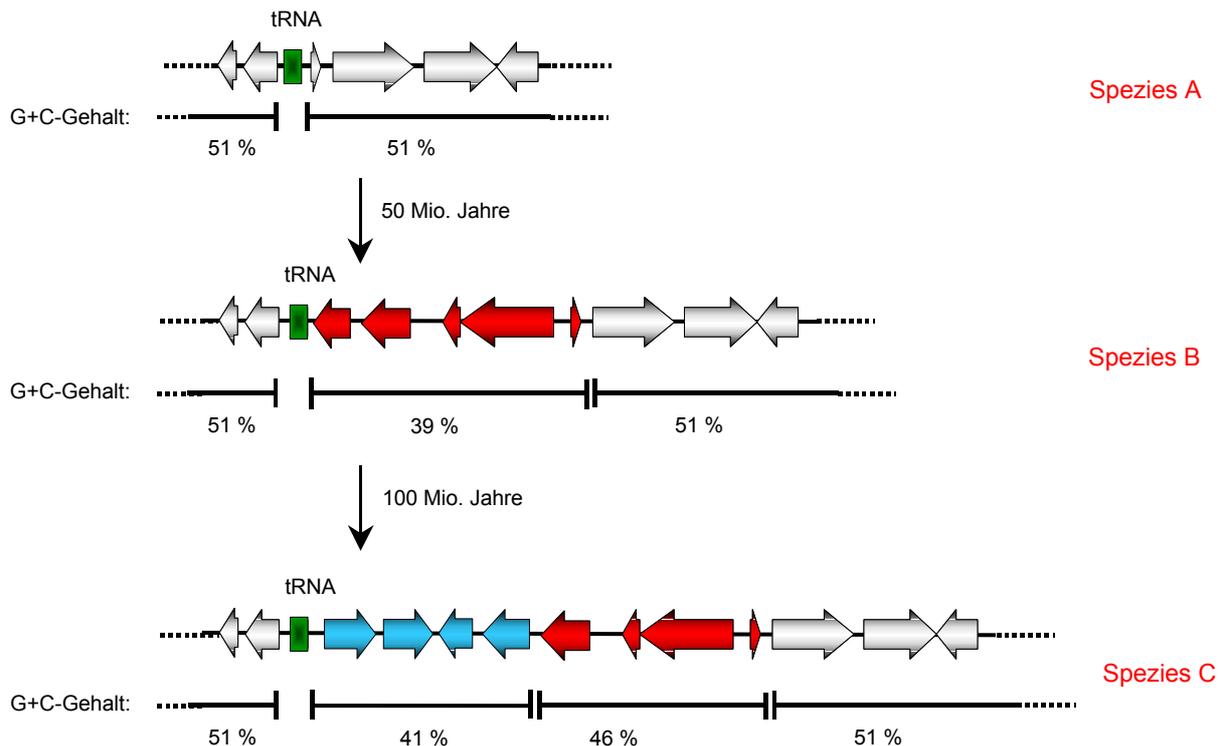


Abb. 32: Modell des horizontalen Gentransfers an tRNA-Genen.

Das ursprüngliche bakterielle Genom hat einen G+C-Gehalt von ca. 51% (grau). Durch horizontalen Gentransfer wird eine Gruppe von Genen (rot) am Locus der tRNA inseriert und zeigt einen deutlich niedrigeren G+C-Gehalt von ~39%. Nach weiteren 50 Mio. Jahren wird eine neue Gen-Gruppe mit einem G+C-Gehalt von ~41% am tRNA-Gen inseriert (blau) und verschiebt die vorherige Insertion, deren G+C-Gehalt sich mittlerweile von ~39% auf ~46% dem des übrigen Genoms angenähert hat.

In diesem Zusammenhang muss jedoch betont werden, dass eine unterschiedliche Basenzusammensetzung kein unbedingtes Charakteristikum für horizontal transfertierte DNA ist. Obwohl die hier beschriebenen tRNA-assoziierten Elemente deutlich als horizontal erworben bezeichnet werden können, ist ihre Basenzusammensetzung nur unwesentlich von der des restlichen Genoms der *Salmonella* spp. verschieden. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch für SPI2 gemacht werden, welche aus mindestens zwei horizontal erworbenen Elementen besteht, die am  $tRNA^{\text{ValV}}$ -Gen

insetiert sind (Hensel *et al.*, 1999b). Der Teil dieser Mosaikstruktur, der das TTSS kodiert, zeigt mit 44,3% einen signifikant niedrigeren G+C-Gehalt als der Teil, der Gene für eine Tetrathionat-Reduktase enthält. Der G+C-Gehalt dieses Fragmentes entspricht mit 55,5% dem des restlichen *Salmonella*-Genoms, während der stromabwärts befindliche Bereich von SPI2 mit einigen nicht weiter charakterisierten Genen wieder einen deutlich niedrigeren G+C-Gehalt von 47,7% aufweist. Es wäre möglich, dass ein unterschiedlicher G+C-Gehalt nicht unbedingt auf eine im Laufe der Evolution relativ neue DNA-Erwerbung hinweist, die noch nicht an die Codon-Verwendung des restlichen Genoms angepasst ist. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass der G+C-Gehalt des Donors dem des Rezipienten entspricht, so dass eine Differenzierung der DNA-Abschnitte hinsichtlich ihres Ursprungs nicht durchführbar ist. Auch ist vorstellbar, dass eine Verwendung von unterschiedlichen Codons für die regulierte Expression neu erworbener Gene durchaus sinnvoll und notwendig ist. Eine auf der Codon-Verwendung basierende Regulation der Expression von Genen ist schon in den unterschiedlichsten Bereichen wie beispielsweise der Typ I-Fimbrien-Expression in *E. coli* oder in Stoffwechselwegen von Purpurbakterien gezeigt worden (vgl. Saier, 1995). Außerdem ist es möglich, dass die transferierten Elemente aus anderen bakteriellen Spezies mit ähnlichem G+C-Gehalt stammen, so dass zwar ein Transfer stattgefunden hat, dieser aber durch die alleinige Analyse des G+C-Gehaltes nicht nachvollziehbar ist. Des Weiteren ist die Auswahl des analysierten Genom-Abschnitts entscheidend für den G+C-Gehalt: Je kleiner das Fenster, desto variabler der G+C-Gehalt, während bei größeren Bereichen eine Insertion mit anderer Nukleotidzusammensetzung nicht erfasst werden könnte (Lio & Vannucci, 2000). Somit können Unterschiede im G+C-Gehalt auf lateral transferierte DNA hinweisen, der Umkehrschluss gilt jedoch nicht.

Alle in der hier vorliegenden Arbeit identifizierten tRNA-assoziierten Elemente zeigen eine bemerkenswerte Häufung von Genen für mobile Elemente wie Transposasen, IS-Elemente und Phagen. Da keine kompletten Phagen-Genome in den tRNA-assoziierten Fragmenten identifiziert wurden, könnten die gefundenen Gene Relikte von ehemals funktionellen Phagen sein. Die Anwesenheit dieser Gene weist darauf hin, dass die genetischen Insertionen über Transposons und Phagen als Vehikel für horizontal transferierte DNA in das jeweilige Genom gelangt sind, wie schon mehrfach anhand anderer Virulenzgene in den unterschiedlichsten Bakterien gezeigt

werden konnte (Cheetham & Katz, 1995; Mirolid *et al.*, 1999; Ruzin *et al.*, 2001). Ein Beispiel, wie eine solche Beteiligung mechanistisch aussehen kann, wurde für *E. coli* 536 beschrieben. In diesem Stamm sind die 3'-Enden der tRNA-Gene *selC* und *leuX* als Andockstellen („attachement sites“) für die Integration von Phagen identifiziert worden, während die 3'-Enden der tRNA-Gene *pheV* und *pheR* als Zielort für die Integration konjunktiver Transposons in die Chromosome von *S. enterica* Serovar Senftenberg und *E. coli* dienen (Hacker *et al.*, 1997). Möglicherweise stellen die tRNA-Gene durch ihre Struktur eine Art leicht erkennbares sterisches Hindernis dar, an dem Phagen bevorzugt inserieren können. Die Integration von Phagen an tRNA-Genen wird zudem als Mechanismus zur Erweiterung des Wirtsspektrums von Phagen betrachtet, da tRNA-Gene innerhalb bakterieller Genome hochkonserviert sind (Hou, 1999).

Die Frage nach der Herkunft der tRNA-assoziierten Elemente bleibt jedoch unbeantwortet, da die Hybridisierungsanalysen keinerlei Signale in anderen bakteriellen Spezies aufwiesen.

Die neuen tRNA-assoziierten Elemente, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, sind alle spezifisch für *Salmonella* spp. Die Verteilung dieser Insertionen ist innerhalb der Gattung *Salmonella* variabel und reicht von der *S. enterica* Serovar Typhi-spezifischen *pilV*-Insertion bis hin zum *pgtE*-Element, welches in sämtlichen *Salmonella*-Subspezies einschließlich *S. bongori* zu finden ist. Die unterschiedliche Verteilung der tRNA-Insertionen innerhalb der Gattung *Salmonella* könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese genetischen Elemente einen Einfluss auf das unterschiedliche Erreger-Potential einzelner *Salmonella*-Subspezies bezüglich Wirtsspezifität und Krankheitsverlauf haben.

### **4.3 Gibt die Verteilung von Virulenz-Genen in *Salmonella* spp. einen Hinweis auf die Wirtsspezifität?**

Die spezifischen Wirtsspektren verschiedener *Salmonella*-Subspezies und -Serovare sowie die durch verschiedene *S. enterica*-Serovare verursachten Krankheitsbilder können sehr unterschiedlich sein. Die molekularen Grundlagen sowohl für den klinischen Verlauf einer Salmonellose als auch für die Wirtsspezifität einzelner *S. enterica*-Serovare sind bislang nicht geklärt. Es wird diskutiert, ob das spezifische Muster an vorhandenen und fehlenden Virulenzfaktoren in den unterschiedlichen

*S. enterica*-Serovaren möglicherweise die Wirtsspezifität und den Krankheitsverlauf bestimmen (Fierer & Guiney, 2001).

Die Analyse der Verteilung der Virulenz-Determinanten SPI1 und SPI2 ergab, dass SPI1 in allen *S. enterica*-Subspezies sowie *S. bongori* vorhanden ist, SPI2 dagegen nur in *S. enterica*, nicht aber in *S. bongori* (Hensel *et al.*, 1997; Ochman & Groisman, 1996). Bei allen bisher analysierten *S. enterica*-Isolaten stellte sich heraus, dass das auf SPI2 kodierte Sekretionssystem *in vitro* zur Sekretion von Substratproteinen in der Lage ist (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass SPI2 möglicherweise in einer Vielzahl von Serovaren der *S. enterica*-Spezies mit unterschiedlichen Wirten einen Beitrag zur Virulenz leistet. So ist beispielsweise *S. enterica* Serovar Dublin spezifisch an Rinder adaptiert und ruft in ihnen eine systemische Salmonellose mit Bakteriämie, Durchfallerscheinungen und Ruhr hervor, die von Fieber begleitet ist. Ein ähnliches Krankheitsbild verursacht *S. enterica* Serovar Typhimurium in Rindern, in Nagetieren dagegen führt eine Infektion mit diesem Erreger zu einer Typhus-artigen Erkrankung. Im Menschen kommt es bei einer Infektion mit *S. enterica* Serovar Typhimurium zu einer Enteritis mit Durchfallerscheinungen, Ruhr und Fieber, während Infektionen des menschlichen Wirts mit den hochadaptierten *S. enterica*-Serovaren Typhi und Paratyphi A, B und C zu Typhus bzw. Paratyphus mit Bakteriämie und Fieber führen (Bäumler, 1997; Bäumler *et al.*, 1998). All diesen Erregern ist das Vorhandensein von SPI1 und SPI2 gemeinsam, so dass deren Verteilung weder eine Wirtsspezifität noch einen Krankheitsverlauf determiniert.

Die über das TTSS von SPI2 sekretierten STE-Proteine sind alle außerhalb von SPI2 kodiert, und es stellte sich die Frage, ob diese Gen-Loci in unterschiedlichen Ereignissen des horizontalen Gentransfers erworben wurden und eine heterogenere Verteilung zeigen als der SPI2-Locus. Einen entsprechenden Hinweis gibt bereits *slrP*, ein Mitglied der STE-Proteinfamilie. Dieses Gen trägt zur Wirtsspezifität von *S. enterica* Serovar Typhimurium bei, so dass die Vermutung nahe liegt, dass auch andere STE-Gene an der Wirtsspezifität von *Salmonella*-Serovaren beteiligt sind. Sowohl *slrP*, *sspH2* (Tsolis *et al.*, 1999b) und *pipB* (Knodler *et al.*, 2002) als auch *sseI*, *sseJ*, *sifA* und *sifB* (diese Arbeit) sind nicht in *S. bongori* nachweisbar. *sspH1* dagegen, das durch das TTSS von sowohl SPI1 als auch SPI2 sekretiert werden kann, konnte in *S. enterica* und auch in *S. bongori* identifiziert werden (Tsolis *et al.*, 1999b). Die Abwesenheit von Genen für SPI2-spezifische Substratproteine spiegelt

die Abwesenheit des SPI2-kodierten TTSS in *S. bongori* wider. Die Loci von *sspH1*, *sspH2*, *sseJ* und *ssel* zeigen eine weitaus heterogenere Verteilung innerhalb der *S. enterica*-Subspezies (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001; Tsolis *et al.*, 1999b; diese Arbeit). Die Genomanalysen ergaben, dass die korrespondierenden Loci alle durch Prophagen-Gene oder tRNA-Gene flankiert sind. Der Beitrag dieser genetischen Elemente zum horizontalen Gentransfer von Virulenz-Genen ist häufig beobachtet worden (Boyd *et al.*, 2001) und könnte auch im Zusammenhang mit der variablen Verteilung von *sspH1*, *sspH2*, *ssel* und *sseJ* eine Rolle spielen. *ssel* liegt innerhalb des Prophagen *Gifsy-2*. Dieser Prophage enthält außerdem das Gen *sodC*, anhand dessen nachvollzogen werden konnte, dass *Gifsy-2* als voll funktionsfähiger Phage für den Transfer von genetischer Information induziert werden kann (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999). Daher war anzunehmen, dass dieser Prophage noch als Vehikel aktiv sein und innerhalb verschiedener *S. enterica*-Serovare zur Verteilung von Genen, die Effektorproteine kodieren, beitragen könnte.

Die Verteilung von *sspH1* innerhalb der Gattung *Salmonella* wurde schon vorher beschrieben (Tsolis *et al.*, 1999a), und kürzlich konnte gezeigt werden, dass *sspH1* auf dem Prophagen *Gifsy-3* lokalisiert ist (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Die Assoziation von Prophagen mit Virulenz-Genen ist auch für ein Effektorprotein der TTSS von SPI1 demonstriert worden, wo der Prophage SopE $\Phi$  das Gen *sopE* trägt und dieses durch horizontalen Gentransfer in andere *Salmonella*-Stämme übertragen kann (Mirolid *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu sind die Gene *sifA* und *sifB* auf kleinen „Pathogenitätsinselchen“ lokalisiert. Beide Gene sind innerhalb der *S. enterica* Subspezies I konserviert und in allen *S. enterica*-Subspezies mit Ausnahme von Subspezies IIIb zu finden. Die Abwesenheit von Prophagen-Genen oder IS-Elementen in den *sifA*- und *sifB*-Loci könnte deren Stabilität und homogene Verteilung innerhalb von *Salmonella* erklären. Das zu der Gruppe der STE-Gene gehörige *pipB* stellt eine Art Zwischenform zwischen den variabel verteilten Genen *sspH1*, *sspH2*, *ssel* und *sseJ* und den konservierten, auf „Pathogenitätsinselchen“ lokalisierten Genen *sifA* und *sifB* dar. Es ist auf der Pathogenitätsinsel SPI5 lokalisiert und innerhalb der *Salmonella*-Subspezies mit Ausnahme der Subspezies II konserviert (Knodler *et al.*, 2002). Da es auch keine Assoziation mit Phagen-Genen zeigt, könnte es zur Gruppe der stabil integrierten Gene *sifA* und *sifB* gezählt werden. Auf der anderen Seite weist die direkte Insertion von *pipB* am tRNA<sup>SerT</sup>-Gen und der niedrige G+C-Gehalt der *pipAB*-Insertion von

39,2% auf eine relativ neue DNA-Erwerbung über horizontalen Gentransfer hin. Das ebenfalls auf SPI5 lokalisierte *sopB* ist dagegen in sämtlichen *Salmonella*-Subspezies zu finden (Miroid *et al.*, 2001). SopB ist ein Virulenzprotein, das über das TTSS von SPI1 ausgeschleust wird und in *S. enterica* Serovar Dublin zur Virulenz im Kälbermodell beiträgt (Wood *et al.*, 1998). Es ist an der Invasion von *Salmonella* in die Zielzelle beteiligt (Miroid *et al.*, 2001). Eine Mutation in *pipA* zeigt einen Virulenzdefekt im Modell der murinen Salmonellose, für PipB dagegen konnte bisher keine direkte Relevanz für die Virulenz beobachtet werden (Knodler *et al.*, 2002). Beide Proteine, SopB und PipB, spiegeln die Verteilung SPI1- bzw. SPI2-Sekretionsmaschinen wider, mit Hilfe derer die Proteine aus dem Bakterium ausgeschleust werden. Sie können jedoch keinen klaren Hinweis zur Frage nach der Wirtsadaptation unterschiedlicher *Salmonella*-Subspezies geben.

Innerhalb der Spezies *S. enterica* konnte eine große Anzahl weiterer Virulenz-Determinanten mit variablen Verteilungsmustern identifiziert werden. Zu diesen gehören sowohl Fimbrien-Gene (Townsend *et al.*, 2001) als auch Gene für Effektorproteine der SPI1 (Miroid *et al.*, 2001) und das *Salmonella*-Virulenzplasmid (Gulig *et al.*, 1993; Libby *et al.*, 1997). Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Gene, die SPI2-Effektoren kodieren, ebenfalls zu dieser Gruppe von variablen Virulenz-Determinanten gehören. Die Identität der Effektoren gibt erste Hinweise auf Wirtsspezifität. Es kann nun darüber spekuliert werden, ob die spezifische Kombination dieser bekannten und möglicherweise auch weiterer unbekannter Virulenzfaktoren die Virulenz-Charakteristika sowie die Wirtsspezifität verschiedener *S. enterica*-Serovare bestimmt. Sowohl detaillierte Analysen der Rolle der STE-Proteine für die Virulenz von *Salmonella* spp. in unterschiedlichen Infektionsmodellen als auch die Charakterisierung der zellulären Phänotypen verschiedener STE-Mutanten können zum Verständnis dieser Phänomene beitragen.

#### **4.4 Kann das SPI2-TTSS den SPI2-Phänotyp im heterologen Wirt vermitteln?**

Der Erwerb des auf SPI2 kodierten Typ III-Sekretionssystems nimmt für die Evolution von *Salmonella* spp. als Erreger systemischer Infektionen eine Schlüsselposition ein. Die Gene, die das TTSS der SPI2 kodieren, sind in allen *Salmonella*-Subspezies bis auf *S. bongori* vorhanden (Hensel *et al.*, 1997). Während *S. bongori* primär aus

kaltblütigen Wirbeltieren isoliert wird, infiziert *S. enterica* hauptsächlich warmblütige Wirte. Beide Spezies besitzen SPI1 und das darauf kodierte TTSS, welches das Eindringen in nicht-phagozytische Zellen und damit die Besiedelung einer neuen Nische des Zellinneren erlaubt. Der zusätzliche Erwerb von SPI2 in einer späteren Phase der Evolution von *Salmonella* ermöglichte *S. enterica* die Erweiterung des Wirtsspektrums von Kalt- auf Warmblüter und die systemische Ausbreitung innerhalb des Wirtsorganismus, die zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen führen kann (Bäumler, 1997; Bäumler *et al.*, 1998). Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung des systemischen Infektionsphänotyps ist, die für diesen Phänotyp verantwortlichen Gene zu bestimmen und zu charakterisieren. Ein Ausschalten unterschiedlicher Gene des SPI2-TTSS führt zu einer Attenuierung der Mutanten im murinen Infektionsmodell (Hensel *et al.*, 1995). Außerdem ist sowohl die Überlebensfähigkeit von SPI2-Mutanten in unterschiedlichen Wirtszellen als auch ihre Fähigkeit zur intrazellulären Replikation reduziert (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Ochman & Groisman, 1996; Uchiya *et al.*, 1999). Für viele Darmbakterien konnte gezeigt werden, dass der Gewinn oder Verlust eines einzigen DNA-Segments einen Mikroorganismus in einen pathogenen Erreger umwandeln kann. So sind die Virulenz-Determinanten, welche die Invasion und intrazelluläre Verbreitung von *Shigella flexneri* bedingen, auf einem Virulenzplasmid kodiert (Parsot, 1994), dessen Transfer in einen *E. coli*-Laborstamm diesen invasiv machen kann (Sansonetti *et al.*, 1982). Ähnlich konnte durch den Transfer der 35 kBp großen LEE-Pathogenitätsinsel der auf LEE („locus of enterocyte effacement“) kodierte Phänotyp des Andockens an die epitheliale Zielzelle („attachment and effacement“) aus einem enteropathogenen *E. coli* in den *E. coli*-Laborstamm K-12 übertragen werden (McDaniel & Kaper, 1997). Vor kurzem ist nachgewiesen worden, dass durch den Transfer des Kernfragmentes der HPI („high-pathogenicity island“), das ein Eisenaufnahmesystem kodiert, der Phänotyp des Yersiniabaktin-Biosyntheseweges von *Yersinia enterocolitica* WA-C Serotyp O:8 auf den HPI-negativen Stamm *Y. enterocolitica* MRS40 übertragen werden kann. Gleichzeitig konnte durch dieses Fragment der HPI auch die Mausvirulenz des neuen Stammes erhöht werden (Pelludat *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob das auf SPI2 kodierte TTSS mit seinen Effektoren allein für den Phänotyp des intrazellulären Überlebens und der Proliferation verantwortlich ist. Hierzu wurde der Virulenz-relevante, ca. 25 kBp große Teil der SPI2, der das TTSS kodiert, kloniert und in den SPI2-negativen Wirt *S. bongori*

transferiert. *In vitro*-Analysen ergaben, dass die Expression der TTSS-Gene in *S. bongori* durch die gleichen Umweltsignale induziert werden kann wie die des chromosomal integrierten TTSS im *S. enterica* Serovar Typhimurium. Somit haben beide Organismen die gleichen Regulationsmechanismen für das SPI2-TTSS, obwohl sie unterschiedliche Habitate besiedeln.

*S. bongori* ist bisher fast ausschließlich aus Reptilien und anderen kaltblütigen Tieren isoliert worden (Reeves *et al.*, 1989), so dass warmblütige Organismen wie Maus und Mensch nicht zu den primären Wirten dieser Spezies gehören. Bisher wurde angenommen, dass *S. bongori* nicht in murinen Makrophagen überleben kann (Groisman & Ochman, 1997). Die hier durchgeführten Infektionsversuche von Maus-Makrophagen und humanen Epithelzellen mit *S. bongori* zeigen jedoch, dass diese Spezies sehr wohl in der Lage ist, diesen Zelltyp zu invadieren, wenngleich mit geringerer Effizienz als *S. enterica* Serovar Typhimurium. Das heterolog kodierte TTSS verleiht *S. bongori* jedoch nicht die Fähigkeit zur intrazellulären Replikation. Die intrazellulären Bakterien scheinen vielmehr den zellulären Abtötungsmechanismen entkommen zu sein und einen „schlafenden“ bzw. persistierenden Zustand des intrazellulären Überlebens erreicht zu haben, ohne sich jedoch weiter zu vermehren. Dieses Phänomen wurde vorher schon für intrazelluläre *S. enterica* Serovar Typhimurium mit Mutationen in SPI2 gezeigt (Shea *et al.*, 1999; Holden, persönliche Mitteilung; Hensel, unveröffentlicht). Obwohl das in *S. bongori* kodierte TTSS wie in *S. enterica* Serovar Typhimurium reguliert wird und Proteine sekretiert, konnte der SPI2-Phänotyp *in vivo* nicht übertragen werden. Daher lag die Vermutung nahe, dass es neben dem SPI2-Sekretionsapparat und den in diesem DNA-Fragment kodierten Effektorproteinen noch weitere SPI2-assoziierte Proteine geben musste. Die Gene dieser Effektoren, die eine Rolle bei der intrazellulären Replikation spielen, sind jedoch nicht im klonierten DNA-Abschnitt lokalisiert, sondern in außerhalb von SPI2 liegenden chromosomalen Bereichen. Vergleichbares ist auch für das auf SPI1 kodierte TTSS gezeigt worden, bei dem die Gene für die SPI1-Effektorproteine, welche die Invasion von *Salmonella* in die Zielzelle durch Zytoskelett-Umlagerungen induzieren, über das gesamte Genom von *Salmonella* verteilt sind (Miroid *et al.*, 2001; Zhou & Galan, 2001).

Auf der Suche nach weiteren SPI2-Effektoren, die in Kombination mit SPI2 den Virulenz-Phänotyp im SPI2-exprimierenden *S. bongori* hervorrufen können, wurde eine das Genom von *S. enterica* Serovar Typhimurium repräsentierende Cosmid-

bank in *S. bongori* transformiert. Anschließend wurden die Transformanten im Tiermodell der murinen Salmonellose analysiert. Es konnte jedoch kein *S. bongori*-Stamm reisoliert werden, so dass daher unter anderem angenommen werden konnte, dass mehr als ein außerhalb von SPI2 kodiertes Protein zusammen mit dem SPI2-TTSS für die intrazelluläre Replikation verantwortlich sein muss. Es sollte jedoch bei diesem Versuchsansatz auch der Einfluss der Wirtsspezifität in Betracht gezogen werden. Der hier eingesetzte *S. bongori*-Stamm SARC 12 ist ursprünglich aus einem Sittich isoliert worden (Boyd *et al.*, 1996) und ist somit möglicherweise *per se* und unabhängig vom SPI2-System nicht zur Besiedelung von murinen Wirten befähigt. Während kultivierte Zelllinien ein eher artifizielles Modell zum Studium intrazellulärer Lebensformen darstellen, ist ein lebender Organismus wie die Maus ein weitaus restriktiveres System. Die Umgehung der Problematik der Wirtsadaptation durch den Einsatz humanpathogener *S. bongori*-Stämme (Pignato *et al.*, 1998) blieb dahingehend ergebnislos, dass diese Isolate nicht in der Lage waren, in kultivierten humanen Epithelzellen oder murinen Makrophagen überhaupt zu überleben. Die eingesetzten *S. bongori*-Stämme sind ausschließlich aus Babies und Kleinkindern im Alter von 0 bis 3 Jahren isoliert worden und haben dort zum Teil schwere Durchfallerkrankungen und Fieber hervorgerufen (Pignato *et al.*, 1998). Vermutlich können diese Stämme nur Wirte mit noch nicht ausgebildetem Immunsystem infizieren und sind nicht in der Lage, die Immunabwehr von Zellen eines erwachsenen Organismus mit voll funktionsfähigem Immunsystem zu überleben. Somit stellt *S. bongori* nicht den idealen Organismus dar, um den intrazellulären Phänotyp im Tiermodell der Salmonellose zu analysieren.

#### 4.4.1 Das SPI2-TTSS als heterolog exprimierte Sekretionsmaschine

Die Identifizierung neuer SPI2-Effektoren gibt erste Hinweise auf die Wirtsspezifität von *Salmonella* spp. Durch die Abwesenheit des komplexen SPI2-Operons mit seinen ko-transkribierten Genen wird vermutlich das Spektrum an besiedelbaren Nischen bzw. Wirtsorganismen für *S. bongori* eingeschränkt.

Der Einbau des SPI2-TTSS als funktionelle Sekretionsmaschine in *S. bongori* veranschaulicht die schnelle Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen an sich ändernde Umweltbedingungen. Allein die Präsenz von SifA und dem SPI2-TTSS, zweier Virulenzfaktoren aus dem komplexen SPI2-Virulon, vermittelt im Zellkultur-Modell den Phänotyp der SIF-Bildung (s. 3.3.11.2, Abb. 28).

Eine Mutation in *sifA* zeigt einen massiven Virulenzdefekt von *S. enterica* Serovar Typhimurium im murinen Infektionsmodell (Stein *et al.*, 1996), jedoch führt SifA zusammen mit dem SPI2-TTSS nicht zur Virulenz im heterologen System von *S. bongori*. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Ruiz-Albert *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass die Ausbildung von SIFs durch die Funktion von SseJ, einem weiteren STE-Protein, gesteuert wird. Während intrazelluläre Vakuolen, die eine *sifA*-Mutante enthalten, ihre Vakuolenmembran verlieren, kommt es bei einer *sifA/sseJ*-Doppelmutante nicht zum Verlust der die Bakterien umgebenden Membran (Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Im Zusammenspiel mit SifA beeinflusst SseJ die dynamische Struktur von SCV im Zellkulturmodell, und auch der Virulenzdefekt einer *sifA/sseJ*-Doppelmutante ist im murinen Infektionsmodell höher als der einer *sifA*-Einzelmutante (Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Vermutlich ist die Bildung der tubulären Membranstrukturen weitaus komplexer als bisher angenommen (vgl. Abb. 33). In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass die Aggregation von endosomalen Kompartimenten durch Mutationen in den SPI2-Effektorgenen *sseF* und *sseG* reduziert wird (V. Kuhle und M. Hensel,). Diese Mutanten können die Ausbildung von filamentösen Strukturen induzieren. Jedoch unterscheiden sich diese Filamentstrukturen im Aufbau von denen, die durch Wildtyp-*Salmonella* induziert werden. Während letztere eine durchgehende Verteilung von lysosomalem Glykoprotein (Lgp) aufweisen, enthalten die durch *sseF*- und *sseG*-Mutanten hervorgerufenen Filamente weitaus weniger Lgp, das eher punktuell und nicht durchgehend innerhalb der Strukturen verteilt ist. Diese Strukturen wurden daher als Pseudo-SIFs bezeichnet (V. Kuhle und M. Hensel, Manuskript in Revision). Es ist auffallend, dass zahlreiche SPI2-Effektorproteine mit dem gleichen endozytischen Kompartiment interagieren, während die Effektoren aus anderen Organismen eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der Wirtszelle zeigen. So sind die SPI1-Effektoren SopE und SopE2 aus *Salmonella* spp. im Zytosol der Wirtszelle lokalisiert (Hardt *et al.*, 1998a; Stender *et al.*, 2000) und interagieren dort mit eukaryontischen Zielproteinen. Auch die Effektoren YopE (Rosqvist *et al.*, 1994) und YopH (Persson *et al.*, 1999) aus *Yersinia* spp. werden ins Zytoplasma der Wirtszelle transloziert, während YopO in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist (Hakansson *et al.*, 1996). Die bisher ausschließliche Ko-Lokalisation von SPI2-Effektoren mit Lgp-haltigen Membranen unterstreicht die Wichtigkeit dieser Strukturen für den SPI2-Phänotyp. Die genaue Bedeutung dieser

Filamentstrukturen und ihr Zusammenhang mit dem Virulenz-Phänotyp von SPI2 muss jedoch noch geklärt werden.

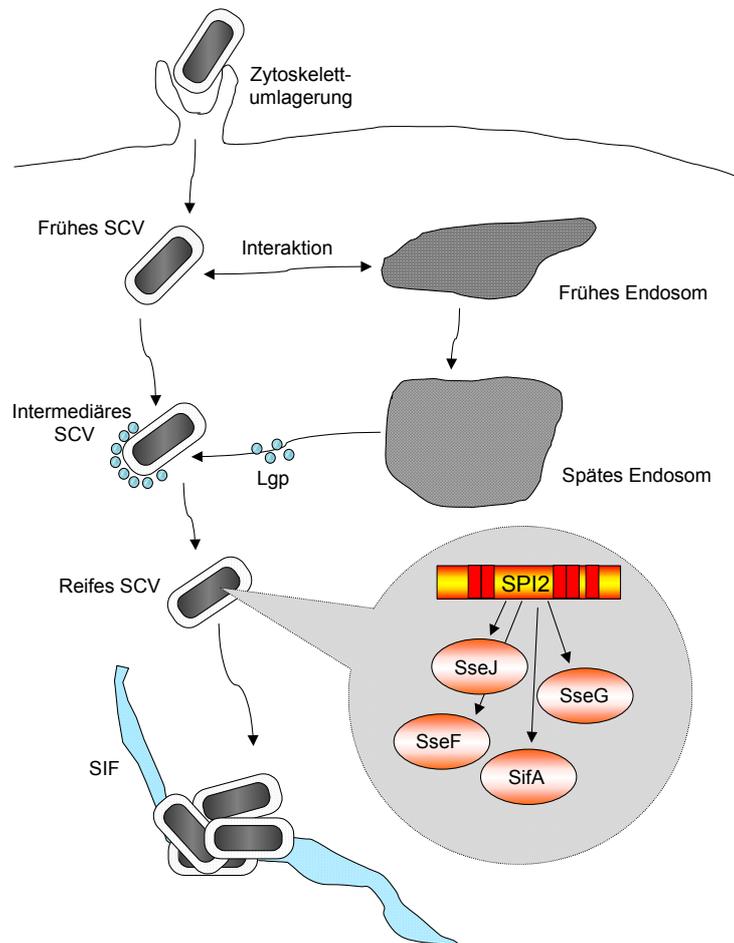


Abb. 33: Induktion der SIF-Bildung durch intrazelluläre *Salmonella* spp.

Nach der Internalisation befindet sich *Salmonella* in einer Vakuole (SCV, „*Salmonella* containing vacuole“). Dieses SCV interagiert mit dem frühen Endosom und reift zum intermediären SCV durch die Akkumulierung von u.a. lysosomalen Glykoproteinen (Lgp) wie LAMP-1, LAMP-2 und LAMP-3. Innerhalb des nun reifen SCV kann sich *Salmonella* replizieren, und es kommt zur Ausbildung der SIF-Strukturen durch die Funktion verschiedener SPI2-Effektoren (nach Gorvel & Meresse, 2001).

Mit Hilfe von plasmidkodiertem SseF konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das SPI2-TTSS heterolog zur Translokation SPI2-abhängiger Proteine fähig ist. Ob dieses durch *S. bongori* translozierte Protein eine ähnliche Lokalisation und Funktion in der Wirtszelle hat wie SseF in *S. enterica* Serovar Typhimurium, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es wäre denkbar, dass durch die Anwesenheit weiterer Faktoren aus dem SPI2-Regulon sowohl das Virulenz- als auch das Wirtsspektrum von *S. bongori* erweitert würde. Dadurch würde die Übertragung des Virulenz-Phänotyps von SPI2 in *S. bongori* denkbar.

## 4.5 Das Typ III-Sekretionssystem der SPI2 als Kern eines variablen Virulenzmoduls

Die in dieser Arbeit beobachtete Heterogenität der SPI2-Effektorgenen innerhalb der Gattung *Salmonella* steht im Kontrast zum Invasions-Virulon von SPI1, das eine komplexe, fest etablierte Einheit aus TTSS und SPI1-Effektorgenen darstellt. Dieses SPI1-Regulon muss mit Ausnahme von *avrA* und *sopE* nach der Teilung von *E. coli* und *Salmonella* vor ca. 100 bis 160 Mio. Jahren (Sensen *et al.*, 1996), aber noch vor der Differenzierung von *Salmonella* in ihre einzelnen Spezies vor ca. 50 Mio. Jahren (Lawrence & Ochman, 1997) durch horizontalen Transfer in das Genom von *Salmonella* gelangt sein (Miroid *et al.*, 2001). Dagegen deutet die Verteilung von SPI2-Effektorgenen innerhalb der Gattung *Salmonella* darauf hin, dass die Entwicklung des SPI2-Moduls innerhalb der rezenten *Salmonella*-Spezies und -Serovare nicht in einem, sondern in zahlreichen Schritten von Erwerb und Verlust verlaufen sein muss.

Bisher konnte nur wenigen STE-Proteinen ein Phänotyp im Tiermodell der Salmonellose zugewiesen werden. So war *S. enterica* Serovar Typhimurium mit einer Mutation in *sifA* im murinen Infektionsmodell stark attenuiert (Stein *et al.*, 1996). Dieser Effekt konnte durch eine Doppelmutation in *sifA* und *sseJ* noch erhöht werden (Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Infektionen mit Mutanten in *sspH1* bzw. *sspH2* zeigten unterschiedliche Krankheitsbilder im Kälbermodell und führten letztendlich zum Tod des Tieres. Dagegen verlief eine Infektion mit einer *sspH1/sspH2*-Doppelmutante nicht tödlich, obwohl das Kalb starke Durchfallerscheinungen zeigte (Miao *et al.*, 1999). Somit tragen *sspH1* und *sspH2* zur Virulenz von *Salmonella* im Kälbermodell bei, führen aber zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Eine Mutation in *slrP*, einem weiteren STE-Gen, zeigt einen Virulenzdefekt im murinen, nicht aber im Kälber-Infektionsmodell (Tsolis *et al.*, 1999b). Für alle weiteren bisher identifizierten STE-Proteine ist noch kein Phänotyp im Verlauf der Salmonellose im Tier beschrieben worden. Auch im Zellkultur-Modell zeigen *S. enterica* Serovar Typhimurium-Mutanten in den STE-Genen *slrP*, *sspH1*, *sspH2*, *sifA*, *sifB*, *ssel* und *sseJ* keinen Replikationsdefekt im Gentamicin-Schutz-Versuch zur Messung der intrazellulären Replikation (diese Arbeit, Daten nicht dargestellt).

Dies kann mehrere Gründe haben: Zum einen sind die durch *S. enterica*-Serovare verursachten Krankheitsbilder sehr unterschiedlich. Auch sind die zur phänotypi-

schen Untersuchung der *S. enterica*-Serovare eingesetzten Tiermodelle sehr verschieden und umfassen unter anderem das Mausmodell der systemischen Erkrankung mit Typhus-artigem Verlauf sowie das Infektionsmodell im Kalb, das sowohl zu Durchfallerscheinungen als auch zu systemischen Infektionen führen kann (Bispham *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001). Einzelne STE-Proteine können in unterschiedlichen Verlaufsformen von Salmonellosen in unterschiedlichen Wirten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung eine Rolle spielen. Daher kann ihre Bedeutung für die Pathogenese von *Salmonella* mit einem einzigen Versuchsaufbau wie der hier beschriebenen murinen systemischen Erkrankung nicht unbedingt erfasst werden.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass einige STE-Proteine synergistisch wirken bzw. in ihrer Funktion redundant sind. So kann ein Phänotyp nicht auf die Wirkung eines Proteins zurückgeführt werden, sondern auf das Zusammenwirken mehrerer Proteine, was unter Umständen eine Feinregulierung der Proteinwirkung ermöglicht. Diesem Phänomen entsprechend wurde anhand von SPI1-Effektoren nachgewiesen, dass der Phänotyp des „membrane ruffling“, der zur Invasion von *Salmonella* in die Zielzelle führt, durch mehrere einzelne Proteine induziert werden kann, dass diese jedoch erst in einem kooperierten Zusammenspiel zur vollen Auslösung dieses Phänotyps führen (Ehrbar *et al.*, 2002; Miold *et al.*, 2001).

Es darf außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass bisher nur ein Teil der für die Virulenz von *Salmonella* im Modell der murinen Salmonellose notwendigen SPI2-Effektoren gefunden wurde. Ein Großteil der bisher bekannten STE-Proteine wurde aufgrund einer konservierten N-terminalen Proteinsequenz identifiziert, die ein Translokationssignal enthält, welches vom SPI2-TTSS erkannt wird (Miao & Miller, 2000). Es gibt jedoch zahlreiche über das TTSS von SPI2 sekretierte Proteine, die dieses N-terminale Motiv nicht besitzen (Beuzon *et al.*, 1999; Guy *et al.*, 2000; Hansen-Wester *et al.*, 2002; Klein & Jones, 2001; Knodler *et al.*, 2002), so dass dieser Ansatz zur Identifizierung sämtlicher Effektoren nicht ausreichend sein kann.

Durch das heterolog kodierte SPI2-TTSS kann der ebenfalls heterolog kodierte Effektor SifA in die Zielzelle transloziert werden und dort die Bildung filamentöser Aggregate von Endosomen induzieren. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass das auf SPI2 kodierte Typ III-Sekretionssystem eine funktionelle Kasette darstellt, die den Kern eines oder mehrerer komplexer Virulenzfunktionen bildet. Die im Genom einzelner *Salmonella* spp. verteilten SPI2-Effektoren bilden zusammen mit

dem TTSS ein Virulenznetzwerk, das in seiner Zusammensetzung und Funktion für einzelne *Salmonella*-Spezies, Serovare und Stämme spezifisch ist (vgl. Abb. 34). Die Einheit des Typ III-Sekretionsapparates ist hochkonserviert und wird durch spezifische Umweltsignale reguliert. Hinzu kommen zahlreiche außerhalb der SPI2 kodierte Faktoren, die zusammen mit dem Sekretionssystem in einem regulatorischen Netzwerk durch die gleichen Signale wie der TTSS beeinflusst werden. Dabei kann man diese STE-Proteine in zwei Gruppen unterscheiden: Die einen sind hochkonserviert und in fast allen *Salmonella*-Subspezies zu finden, in denen auch SPI2 nachweisbar ist (i.e. *sifA*, *sifB* und *pipB*). Diese Gene sind mit keinerlei mobilen DNA-Fragmenten assoziiert und daher wahrscheinlich fest im *Salmonella*-Genom verankert. Die zweite Gruppe von Effektor-Genen umfasst die STE-Gene, die innerhalb der *Salmonella*-Subspezies unterschiedlich verteilt sind (*sseJ*, *ssel*, *sspH1*, *sspH2* und *slrP*). Neben ihrer heterogenen Verteilung ist ihnen allen die Assoziation mit mobilen Elementen gemeinsam. Vermutlich stellen diese Gene eine Gruppe an variabel verteilbaren Effektoren dar, mit deren Hilfe sich *Salmonella* relativ schnell und flexibel an neue Umweltbedingungen und neue Wirte anpassen kann (vgl. Abb. 34).

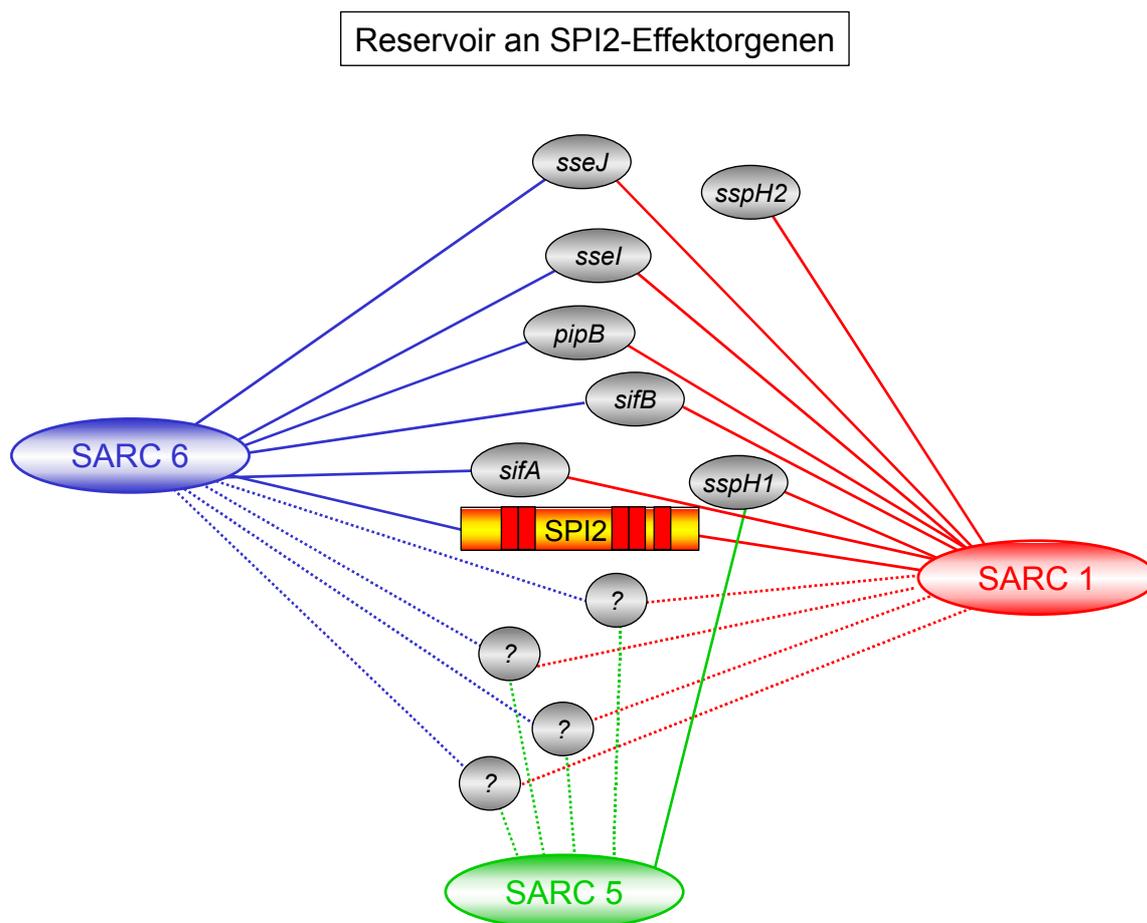


Abb. 34: Die Verteilung einzelner SPI2-Effektorgen bestimmt die *Salmonella*-Spezifität.

Der Pool aus Genen, deren Produkte über das SPI2-TTSS sekretiert werden, ist auf einzelne *Salmonella*-Spezies verschieden verteilt. Die Unterschiede in der Verteilung dieser Faktoren determiniert die Wirtsspezifität einzelner *Salmonella*-Isolate und den Verlauf der durch sie verursachten Krankheit. Mit „?“ wurden Gene gekennzeichnet, die noch unbekannte SPI2-Effektorgen repräsentieren. Die gestrichelten Linien zeigen das mögliche Vorhandensein der bisher unbekannt SPI2-Effektorgen in den einzelnen *Salmonella*-Subspezies an.

Ein vergleichbares Szenario scheint für das TTSS von SPI1 zuzutreffen: Neben den hochkonservierten Genen des TTSS und einiger Effektoren gibt es variable Effektor-Gene (*sopE* und *avrA*), die nur in einigen *Salmonella*-Subspezies gefunden wurden (Prager *et al.*, 2000; Miold, 2001). Diese Flexibilität in der genetischen Ausstattung von *Salmonella* kann mehrere mechanistische Hintergründe haben. Zum einen können Virulenzfaktoren durch horizontalen Transfer in das Genom gelangt sein, zum anderen können sich Gene dupliziert haben und so Homologe bilden, die in ihrer Funktion redundant sind oder aber auch synergistisch wirken. Letzteres wird durch die Beobachtung unterstützt, dass mittlerweile eine Reihe von Effektoren in

*Salmonella* identifiziert wurden, die strukturell homolog sind. Zu diesen zählen SspH1 und SspH2, welche nur in Kombination einen Phänotyp im Kälber-Virulenzmodell haben (Miao *et al.*, 1999). Eine weitere „Kopie“ stellt Ssel dar, das über einen Bereich von 142 Aminosäuren zu 89% identisch ist mit SspH2. Die Tatsache, dass das *sseI*-Gen innerhalb des Gifsy-2-Prophagen lokalisiert und dass dieser Phage induzierbar ist (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999; Miao & Miller, 2000), bestätigt die Annahme, dass diese duplizierten Effektoren flexibel transferiert werden können. Auch SopE und SopE2 sind strukturell homolog und funktionell am selben Phänotyp beteiligt (Miroid *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel für duplizierte Proteine liefern SifA und SifB, wobei letzteres zwar als transloziertes SPI2-Effektorprotein identifiziert, aber bisher mit keinem nachweisbaren Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden konnte (Miao & Miller, 2000). Vor kurzem ist ein weiteres Protein gefunden worden, das vermutlich durch Duplizierung von *pipB* ins *Salmonella*-Genom gelangt ist. Das Protein PipB2 ist jedoch bisher nicht weiter analysiert worden (Knodler *et al.*, 2002). Die Sequenzierung diverser *Salmonella*-Genome wird vermutlich die Präsenz weiterer Effektorproteine aufdecken, die sich aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu schon bekannten Proteinen identifizieren lassen. Die jeweilige Bedeutung für die Virulenz von *Salmonella* in unterschiedlichen Wirtsorganismen muss jedoch erst untersucht werden, wobei die Problematik der Tiermodelle einen nicht zu vernachlässigender Faktor darstellt. Anhand des SPI2-Virulons wird deutlich, dass einzelne Faktoren eines Virulenzmoduls in unterschiedlichen Organismen und verschiedenen Wirten eine Rolle spielen. Ein konserviertes Operon bildet zusammen mit nicht-konservierten ko-transkribierten Genen die Basis für eine schnelle Anpassungsfähigkeit an neue Umweltbedingungen durch horizontalen Gentransfer.

## 5 AUSBLICK

Das in dieser Arbeit entwickelte System der SPI2-Funktion im heterologen Wirt stellt ein wertvolles Hilfsmittel dar, um die differenzierte Funktion und Lokalisation von SPI2-Effektorproteinen im Zellkultur-System zu analysieren. Dabei kann die Bedeutung einer synergistischen und redundanten Wirkung kombinierter Effektorproteine untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die Funktion und Entwicklung im Rahmen der bakteriellen Evolution im Hinblick auf den horizontalen Gentransfer zu ziehen. Die Analyse der Sequenzvariabilität einzelner Effektoren kann über den ungefähren Zeitpunkt ihres Erwerbs im Laufe der Evolution und die evolutorische Differenzierung von *Salmonella* spp. zusammen mit ihrer Bedeutung für die Wirtsanpassung und Virulenz Aufschluss geben.

Weitere Studien werden zeigen, aus welchen Faktoren sich das SPI2-Virulon zusammensetzt, und ob sich durch dessen Transfer der intrazelluläre Phänotyp in SPI2-negative Wirte wie beispielsweise *S. bongori* übertragen lässt.

Die Analyse der Funktion einzelner SPI2-Effektoren kann zum größeren Verständnis der systemischen Infektionen durch *Salmonella* spp. beitragen und weitere Hinweise auf ihre Bedeutung für die Wirtsspezifität und den resultierenden Krankheitsverlauf geben. Die Kenntnis der relevanten Virulenzfaktoren kann zum einen diagnostisch genutzt werden, um Patientenisolat schnell und korrekt einzuordnen. Zum anderen können durch die Erzeugung von SPI2-Effektor-Mutanten neue attenuierte Lebendvakzine hergestellt werden, die entweder zur Vakzinierung gegen Salmonellosen oder aber als heterologe Trägerstämme rekombinanter Vakzine eingesetzt werden können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit setzt sich mit den molekularen Mechanismen der Evolution von Virulenzfaktoren in *Salmonella* auseinander. Es wurde ein auf Sequenzvergleichen basierendes Verfahren eingesetzt, um neue lateral erworbene Elemente zu identifizieren, die möglicherweise Hinweise auf die Entwicklung von Virulenz und Wirtsspezifität innerhalb der Gattung *Salmonella* geben können. Mit Hilfe genetischer Analysen sollte darüber Aufschluss gewonnen werden, auf welche Weise diese genetischen Elemente in neue Wirtsgenome gelangen können.

Des Weiteren wurde anhand der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) nach möglichen Vehikeln und Transfermechanismen für den horizontalen Gentransfer gesucht. Es wurde analysiert, wie neu erworbene genetische Elemente in das regulatorische Netzwerk neuer Wirte integriert werden können und ob es Zusammenhänge zwischen der genetischen Ausstattung mit Virulenzmodulen und der Wirtsspezifität verschiedener *Salmonella*-Serotypen gibt. Dabei wurde festgestellt, dass einzelne Effektoren des SPI2-Virulons, die zum Teil außerhalb des SPI2-Locus im Genom kodiert sind, sehr heterogen innerhalb von *Salmonella* spp. verteilt sind. Diese Variabilität kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich diese Faktoren nicht als ein initialer Komplex in der „Ur-*Salmonella*“ manifestiert haben, wie es im Invasions-Virulon von SPI1 der Fall ist. Vielmehr sind die SPI2-Effektoren vermutlich in mehreren Schritten im Laufe der Evolution in das Genom von *Salmonella* spp. gelangt und möglicherweise auch z.T. wieder deletiert worden. Die Bedeutung der Verteilung dieser Effektorproteine für die Virulenz und die Wirtsspezifität von *Salmonella* wird auch dadurch offensichtlich, dass *S. bongori* als Besiedler kaltblütiger Wirbeltiere keines dieser zum SPI2-Virulon gehörigen Gene besitzt, die im Zusammenspiel das intrazelluläre Replizieren innerhalb warmblütiger Wirbeltiere ermöglichen.

Das Kernstück des SPI2-Virulons, das für das intrazelluläre Replizieren und die systemische Ausbreitung von *S. enterica* im Wirtsorganismus verantwortlich ist, konnte erfolgreich transferiert werden. Der Einbau des SPI2-TTSS im SPI2-negativen System von *S. bongori* ermöglichte die heterologe Expression von SPI2-abhängigen Genen und die Sekretion von SPI2-Effektorproteinen *in vitro*. Durch die Etablierung des SifA-Phänotyps und den Nachweis der intrazellulären Lokalisation von SseF konnte gezeigt werden, dass das transferierte SPI2-TTSS zur heterologen

Translokation von SPI2-Effektorproteinen aus *S. bongori* in die eukaryontische Zielzelle in der Lage ist.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alpuche Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P. und Miller, S.I. (1992). *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10079-10083.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*, Wiley, New York.
- Bäumler, A.J. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* **5**, 318-322.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R., Ficht, T.A. and Adams, L.G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **66**, 4579-4587.
- Beltran, P., Plock, S.A., Smith, N.H., Whittam, T.S., Old, D.C. and Selander, R.K. (1991). Reference collection of strains of the *Salmonella typhimurium* complex from natural populations. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 601-606.
- Beuzon, C.R., Banks, G., Deiwick, J., Hensel, M. and Holden, D.W. (1999). pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **33**, 806-816.
- Beuzon, C.R., Meresse, S., Unsworth, K.E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S.R., Ryder, T.A., Boucrot, E. and Holden, D.W. (2000). *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of *sifA*. *EMBO J.* **19**, 3235-3249.
- Bispham, J., Tripathi, B.N., Watson, P.R. and Wallis, T.S. (2001). *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect. Immun.* **69**, 367-377.
- Blanc Potard, A.B. and Groisman, E.A. (1997). The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16**, 5376-5385.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H. and Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**, 606-614.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**, 731-753.

- Boyd, E.F., Davis, B.M. and Hochhut, B. (2001). Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* **9**, 137-144.
- Boyd, E.F., Wang, F.S., Beltran, P., Plock, S.A., Nelson, K. and Selander, R.K. (1993). *Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1125-1132.
- Boyd, E.F., Wang, F.S., Whittam, T.S. and Selander, R.K. (1996). Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 804-808.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A. and Carniel, E. (1998). The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol. Microbiol.* **30**, 965-978.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14648-14653.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2002). *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J. Exp. Med.* **195**, 1155-1166.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Cheetham, B.F. and Katz, M.E. (1995). A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* **18**, 201-208.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M. and Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.* **30**, 175-188.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6640-6645.
- Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, J.R. (1980). *A manual for genetic engineering: advanced bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. and Hensel, M. (1999). Environmental regulation of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* **31**, 1759-1754.
- Edwards, R.A., Olsen, G.J. and Maloy, S.R. (2002). Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol.* **10**, 94-99.

- Ehrbar, K., Miroid, S., Friebel, A., Stender, S. and Hardt, W.D. (2002). Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 479-485.
- Emmerth, M., Goebel, W., Miller, S.I. and Hueck, C.J. (1999). Genomic subtraction identifies *Salmonella typhimurium* prophages, F- related plasmid sequences, and a novel fimbrial operon, *stf*, which are absent in *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* **181**, 5652-5661.
- Fetherstone, J.D., Lillard, J.W. Jr. and Perry, R.D. (1995). Analysis of the pesticin receptor from *Yersinia pestis*: role in iron-deficient growth and possible regulation by its siderophore. *J. Bacteriol.* **177**, 1824-1833.
- Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G. and Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5189-5193.
- Fierer, J. and Guiney, D.G. (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J. Clin. Invest.* **107**, 775-780.
- Figueroa-Bossi, N. and Bossi, L. (1999). Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol. Microbiol.* **33**, 167-176.
- Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. and Bossi, L. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **39**, 260-271.
- Garcia del Portillo, F. and Finlay, B.B. (1995). The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol.* **3**, 373-380.
- Garcia del Portillo, F., Zwick, M.B., Leung, K.Y. and Finlay, B.B. (1993). *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10544-10548.
- Ginocchio, C.C., Rahn, K., Clarke, R.C. and Galan, J.E. (1997). Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **65**, 1267-1272.
- Gorvel, J.P. and Meresse, S. (2001). Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect.* **3**, 1299-1303.
- Groisman, E.A. and Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**, 791-794.
- Groisman, E.A. and Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**, 343-349.

- Groisman, E.A., Saier, M.H.Jr. and Ochman, H. (1992). Horizontal transfer of a phosphatase gene as evidence for mosaic structure of the *Salmonella* genome. *EMBO J.* **11**, 1309-1316.
- Groisman, E.A., Sturmoski, M.A., Solomon, F.R., Lin, R. and Ochman, H. (1993). Molecular, functional, and evolutionary analysis of sequences specific to *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1033-1037.
- Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M. and Miller, S.I. (2000). A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* **182**, 4077-4086.
- Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F. and Rhen, M. (1993). Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol. Microbiol.* **7**, 825-830.
- Guy, R.L., Gonias, L.A. and Stein, M.A. (2000). Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the *fms-aroE* intragenic region. *Mol. Microbiol.* **37**, 1417-1435.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and Goebel, W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**, 213-225.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. and Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**, 1089-1097.
- Hacker, J. and Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 641-679.
- Hakansson, S., Galyov, E.E., Rosqvist, R. and Wolf Watz, H. (1996). The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol.* **20**, 593-603.
- Haller, J.C., Carlson, S., Pederson, K.J. and Pierson, D.E. (2000). A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol. Microbiol.* **36**, 1436-1446.
- Hansen-Wester, I., Stecher, B. and Hensel, M. (2002). Type III secretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG. *Infect. Immun.* **70**, 1403-1409.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. and Galan, J.E. (1998a). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815-826.

- Hardt, W.D., Urlaub, H. and Galan, J.E. (1998b). A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2574-2579.
- Hare, J.M., Wagner, A.K. and McDonough, K.A. (1999). Independent acquisition and insertion into different chromosomal locations of the same pathogenicity island in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **31**, 291-303.
- Heesemann, J. (1987). Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 229-233.
- Hensel, M. (2000). *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.* **36**, 1015-1023.
- Hensel, M., Hinsley, A.P., Nikolaus, T., Sawers, G. and Berks, B.C. (1999a). The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **32**, 275-288.
- Hensel, M., Nikolaus, T. and Egelseer, C. (1999b). Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.* **31**, 489-498.
- Hensel, M., Shea, J.E., Bäumler, A.J., Gleeson, C., Blattner, F.R. and Holden, D.W. (1997). Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**, 1105-1111.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E. and Holden, D.W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**, 400-403.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. and Holden, D.W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **30**, 163-174.
- Hof, H., Dörries, R., und Müller, R.L. (2000). Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- Hou, Y.-M. (1999). Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 295-298.
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.
- Karlin, S. (2001). Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **9**, 335-343.
- Kim, U.J., Birren, B.W., Slepak, T., Mancino, V., Boysen, C., Kang, H.L., Simon, M.I. and Shizuya, H. (1996). Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **34**, 213-218.

- Klein, J.R. and Jones, B.D. (2001). *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect. Immun.* **69**, 737-743.
- Knodler, L.A., Celli, J., Hardt, W.D., Vallance, B.A., Yip, C. and Finlay, B.B. (2002). *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **43**, 1089-1103.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara, T.M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-605.
- Kuhle, V., and Hensel, M. SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. Manuskript in Revision.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawrence, J.G. (1997). Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends Microbiol.* **5**, 355-359.
- Lawrence, J.G. and Ochman, H. (1997). Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J. Mol. Evol.* **44**, 383-397.
- Libby, S.J., Adams, L.G., Ficht, T.A., Allen, C., Whitford, H.A., Buchmeier, N.A., Bossie, S. and Guiney, D.G. (1997). The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect. Immun.* **65**, 1786-1792.
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N. and Novick, R.P. (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **29**, 527-543.
- Lio, P. and Vannucci, M. (2000). Finding pathogenicity islands and gene transfer events in genome data. *Bioinformatics* **16**, 932-940.
- Liu, S.L. and Sanderson, K.E. (1995). Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1018-1022.
- Maloy, S.R., Stewart, V.L. and Taylor, R.K. (1996). *Genetic analysis of pathogenic bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G. and Finlay, B.B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* **2**, 145-156.

- Maurelli, A.T., Fernandez, R.E., Bloch, C.A., Rode, C.K. and Fasano, A. (1998). "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3943-3948.
- McClelland, M., Florea, L., Sanderson, K., Clifton, S.W., Parkhill, J., Churcher, C., Dougan, G., Wilson, R.K. and Miller, W. (2000). Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4974-4986.
- McDaniel, T.K. and Kaper, J.B. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **23**, 399-407.
- Miao, E.A. and Miller, S.I. (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7539-7544.
- Miao, E.A., Scherer, C.A., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G., Baumler, A.J. and Miller, S.I. (1999). *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **34**, 850-864.
- Mirold, S., Ehrbar, K., Weissmuller, A., Prager, R., Tschape, H., Russmann, H. and Hardt, W.D. (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. *J. Bacteriol.* **183**, 2348-2358.
- Mirold, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E. and 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. USA* **96**, 9845-9850.
- Mirold, S. (2001). Anpassung von *Salmonella* spp. an neue Wirte durch horizontalen Transfer translozierter Effektorproteine. Dissertation LMU München.
- Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J.A., Schröder, W., Miller, S.I. and Hensel, M. (2001). SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J. Bacteriol.* **183**, 6036-6045.
- Obert, S., O'Connor, R.J., Schmid, S. and Hearing, P. (1994). The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1333-1346.
- Ochman, H., Elwyn, S. and Moran, N.A. (1999). Calibrating bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12638-12643.
- Ochman, H. and Groisman, E.A. (1996). Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **64**, 5410-5412.

- Ochman, H., Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299-304.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F. and Groisman, E.A. (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7800-7804.
- Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B. and Altwegg, M. (1995). Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* **3**, 253-255.
- Pang, T., Levine, M.M., Ivanoff, B., Wain, J. and Finlay, B.B. (1998). Typhoid fever--important issues still remain. *Trends Microbiol.* **6**, 131-133.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523-527.
- Parsot, C. (1994). *Shigella flexneri*: genetics of entry and intercellular dissemination in epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**, 217-241.
- Pelludat, C., Hogardt, M. and Heesemann, J. (2002). Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect. Immun.* **70**, 1832-1841.
- Persson, C., Nordfelth, R., Andersson, K., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. and Fallman, M. (1999). Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol. Microbiol.* **33**, 828-838.
- Pignato, S., Giammanco, G., Santangelo, C. and Giammanco, G.M. (1998). Endemic presence of *Salmonella bongori* 48:z35:- causing enteritis in children in Sicily. *Res. Microbiol.* **149**, 429-431.
- Popoff, M.Y., Bockemuhl, J. and McWhorter Murlin, A. (1992). Supplement 1991 (no. 35) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **143**, 807-811.
- Popoff, M.Y., Bockemuhl, J. and McWhorter Murlin, A. (1993). Supplement 1992 (no. 36) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **144**, 495-498.
- Prager, R., Miold, S., Tietze, E., Strutz, U., Knuppel, B., Rabsch, W., Hardt, W.D. and 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.

- Rathman, M., Barker, L.P. and Falkow, S. (1997). The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect. Immun.* **65**, 1475-1485.
- Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D. and Farmer, J.J.3. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 313-320.
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E. and Wolf Watz, H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**, 964-972.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X.J., Beuzon, C.R., Blakey, A.N., Galyov, E.E. and Holden, D.W. (2002). Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol. Microbiol.* **44**, 645-661.
- Ruzin, A., Lindsay, J. and Novick, R.P. (2001). Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 365-377.
- Saier, M.H. Jr (1995). Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett.* **362**, 1-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J. and Formal, S.B. (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **35**, 852-860.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G. and Bäumlner, A.J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* **3**, 1335-1344.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* **266**, 368-379.
- Schicklmaier, P. and Schmieger, H. (1995). Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1637-1640.
- Schmieger, H. (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol. Gen. Genet.* **119**, 75-88.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. and Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11638-11643.

- Sensen, C.W., Klenk, H.P., Singh, R.K., Allard, G., Chan, C.C., Liu, Q.Y., Penny, S.L., Young, F., Schenk, M.E., Gaasterland, T., Doolittle, W.F., Ragan, M.A. and Charlebois, R.L. (1996). Organizational characteristics and information content of an archaeal genome: 156 kb of sequence from *Sulfolobus solfataricus* P2. *Mol. Microbiol.* **22**, 175-191.
- Shea, J.E., Beuzon, C.R., Gleeson, C., Mundy, R. and Holden, D.W. (1999). Influence of the *Salmonella typhimurium* Pathogenicity Island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect. Immun.* **67**, 213-219.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C. and Holden, D.W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2593-2597.
- Siebers, A. and Finlay, B.B. (1996). M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* **4**, 22-29.
- Slauch, J., Taylor, R. and Maloy, S. (1997). Survival in a cruel world: how *Vibrio cholerae* and *Salmonella* respond to an unwilling host. *Genes Dev.* **11**, 1761-1774.
- Stein, M.A., Leung, K.Y., Zwick, M., Garcia del Portillo, F. and Finlay, B.B. (1996). Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **20**, 151-164.
- Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S. and Hardt, W. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol. Microbiol.* **36**, 1206-1221.
- Susskind, M.M. and Botstein, D. (1980). Superinfection exclusion by lambda prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. *Virology* **100**, 212-216.
- Tamano, K., Aizawa, S.I., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. and Sasakawa, C. (2000). Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* **19**, 3876-3887.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Townsend, S.M., Kramer, N.E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J., Dougan, G. and Bäumlner, A.J. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect. Immun.* **69**, 2894-2901.

- Tsolis, R.M., Adams, L.G., Ficht, T.A. and Bäumlér, A.J. (1999a). Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* **67**, 4879-4885.
- Tsolis, R.M., Townsend, S.M., Miao, E.A., Miller, S.I., Ficht, T.A., Adams, L.G. and Bäumlér, A.J. (1999b). Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* **67**, 6385-6393.
- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D. and Groisman, E.A. (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* **18**, 3924-3933.
- Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1997). Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**, 2007-2011.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T. and Fang, F.C. (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**, 804-808.
- Waldor, M.K. and Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910-1914.
- Wang, R.F. and Kushner, S.R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195-199.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S. and Galyov, E.E. (1998). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol. Microbiol.* **29**, 883-891.
- Yoshida, T., Kim, S.R. and Komano, T. (1999). Twelve *pil* genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus. *J. Bacteriol.* **181**, 2038-2043.
- Young, B.M. and Young, G.M. (2002). YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **184**, 1324-1334.
- Young, G.M., Schmiel, D.H. and Miller, V.L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6456-6461.
- Zhang, X.L., Morris, C. and Hackett, J. (1997). Molecular cloning, nucleotide sequence, and function of a site-specific recombinase encoded in the major 'pathogenicity island' of *Salmonella typhi*. *Gene* **202**, 139-146.
- Zhang, X.L., Tsui, I.S., Yip, C.M., Fung, A.W., Wong, D.K., Dai, X., Yang, Y., Hackett, J. and Morris, C. (2000). *Salmonella enterica* serovar *typhi* uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**, 3067-3073.

Zhou, D. and Galan, J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* **3**, 1293-1298.

## 8 LEBENS LAUF

Name: Imke Hansen-Wester  
Geburtstag: 13.10.1970 in Bremen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung:

1976-1980	Grundschule in Hagen/Niedersachsen
1980-1981	Orientierungsstufe in Hagen/Niedersachsen
1981-1989	Max-Planck-Gymnasium in Kiel, Abschluss Abitur
1989-1991	Ausbildung zur Landwirtschaftlich Technischen Assistentin an der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel
1991-1998	Biologiestudium mit Diplomabschluss an der Georg-August-Universität in Göttingen
Januar-August 1995	Praktikum an der University of Cape Town in Kapstadt/Südafrika im Rahmen des Biologiestudiums
1997	Anfertigung der Diplomarbeit an der University of Cape Town in Kapstadt/Südafrika. Titel der Diplomarbeit: „Biological control of the sugarcane pest <i>Eldana saccharina</i> by expression of a cloned <i>Bacillus thuringiensis cry1Ac7</i> gene in the endophytic bacterium <i>Herbaspirillum seropedicae</i> “
August 1998	Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU in München
Dezember 2000	Fortführung der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der FAU in Erlangen/Nürnberg

## 9 DANKSAGUNG

Mein erster Dank richtet sich an Prof. Volker Müller. Er hat mich auf den Pfad der Infektionsbiologie gebracht und mich darauf während der gesamten Zeit meiner Promotion mit Rat, interessanten Diskussionen und viel Zeit begleitet.

Anschließend möchte ich Prof. Michael Hensel danken, der mich immer darin bestärkte, dass das, was ich da beforschte, gut und richtig war. Er stand mir zu jeder Zeit an jedem Ort mit Rat und Tat zur Seite.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Laborkollegen und Leidensgenossen sowohl in München als auch in Erlangen. Sie alle zu nennen, würde den Rahmen sprengen, doch sollen hier zumindest der GLP-Spezialist Thomas und sein Gegenpart Jörg Erwähnung finden, ebenso wie Dany, die mir meine Laborlaunen im Park vertrieb, Gigi und der Oppa, die immer für gute Stimmung sorgten, und Dirk, den ich phasenweise um seine Unerschütterlichkeit beneidet habe. Ebenso sei meinen Mitstreitern in Erlangen gedankt, insbesondere Volker, mit dem ich so manches Leid und manches Bier geteilt habe, und Dipa, die mich in die Geheimnisse von iNOS und indischer Kochkunst eingeführt hat.

Mein besonderer Dank gilt Holger, der alles ertragen hat und mir ständig mit guten Ideen helfend zur Seite stand. Seine Langmut beim Erstellen und Korrekturlesen dieser Arbeit ist bewundernswert.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle herzlich dafür danken, dass sie mich in den unzähligen Jahren meiner Ausbildung stets tatkräftig unterstützt. Ihre Bestärkung in meinen Wünschen erwies sich retrospektiv fast schon als weise.



....zur Erklärung neuer Projekte  
ist jedes Hilfsmittel recht....

- mit Michael im „*St. Doltore*“ -