

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung einer  
neuen genomischen Insel in einer endemisch verbreiteten  
monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sandra Simon

aus Arnstadt

|                                     |                            |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 1. Referentin:                      | Prof. Dr. Antje Flieger    |
| 2. Referent:                        | Prof. Dr. Michael Steinert |
| eingereicht am:                     | 07.01.2013                 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 12.04.2013                 |

Druckjahr 2013

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Trüpschuch, S., Laverde Gomez, J. A., Ediberidze, I., Flieger, A. & Rabsch, W.: Characterisation of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the thrW tRNA locus. *Int J Med Microbiol.* 2010 Jun; 300(5):279-88.

### **Tagungsbeiträge**

Trüpschuch S., Laverde Gómez, J., Ediberidze I., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel 18.65 kb genomic island within the thrW tRNA locus of monophasic *Salmonella* Typhimurium DT193 strains. (Poster). 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Göttingen (2009)

Trüpschuch S., Laverde Gómez, J., Ediberidze I., Prager, R., Fruth, A., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel genomic island in multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. (Poster). 3. gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Hannover (2010).

Trüpschuch S., Laverde Gómez, J., Ediberidze I., Prager, R., Fruth, A., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel genomic island in multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. (Poster). 13S International Symposium Salmonella and Salmonellosis. St. Malo, Frankreich (2010)

Trüpschuch S., Laverde Gómez, J., Ediberidze I., Prager, R., Fruth, A., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of an 18.4 kb phage remnant in endemic monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. (Poster). 9th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-9), Wernigerode (2010)

Trüpschuch S., Laverde Gómez, J., Ediberidze I., Prager, R., Fruth, A., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel genomic island in multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. (Poster). 1st North-Regio-Day on Infection (NORDI, Braunschweig (2010)

Simon S., Prager, R., Fruth, A., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel 18.4 kb genomic island in endemic monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. (Poster). 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Essen (2011)

Simon S., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel genomic island in a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium. (Poster). Jahrestagung der Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Tübingen (2012)

Simon S., Flieger A. & Rabsch W.: Characterisation of a novel genomic island in a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium. (Poster). 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Hamburg (2012)



# Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>                                 | <b>V</b>    |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                    | <b>VIII</b> |
| <b>SUMMARY .....</b>  | <b>X</b>    |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>                                       | <b>1</b>    |
| 1.1 DIE GATTUNG <i>SALMONELLA</i> .....                         | 1           |
| 1.1.1 <i>Geschichte</i> .....                                   | 1           |
| 1.1.2 <i>Taxonomie</i> .....                                    | 1           |
| 1.1.3 <i>Verbreitung und Lebensweise</i> .....                  | 4           |
| 1.2 DIE PATHOGENESE VON <i>SALMONELLA</i> -INFEKTIONEN .....    | 5           |
| 1.3 MECHANISMEN DES HORIZONTALER GENTRANSFERS .....             | 8           |
| 1.3.1 <i>Salmonella Pathogenitätsinseln (SPI)</i> .....         | 11          |
| 1.3.2 <i>Modulation der Virulenz durch Bakteriophagen</i> ..... | 18          |
| 1.3.3 <i>Weitere mobile genetische Elemente (MGE)</i> .....     | 21          |
| 1.4 <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM .....                         | 22          |
| 1.4.1 <i>Die monophasische Variante sv. 4,[5]12:i:-</i> .....   | 24          |
| 1.5 ZIELE DIESER ARBEIT .....                                   | 25          |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>                            | <b>27</b>   |
| 2.1 GERÄTE UND SOFTWARE .....                                   | 27          |
| 2.1.1 <i>Geräte</i> .....                                       | 27          |
| 2.1.2 <i>Software</i> .....                                     | 29          |
| 2.2 MATERIALIEN .....   | 30          |
| 2.2.1 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....                        | 30          |
| 2.2.2 <i>Chemikalien</i> .....                                  | 32          |
| 2.2.3 <i>Anzuchtmedien und Antibiotika</i> .....                | 34          |
| 2.2.4 <i>Bakterienstämme</i> .....                              | 36          |
| 2.2.5 <i>Eukaryotische Zelllinien</i> .....                     | 38          |
| 2.2.6 <i>Oligonukleotide</i> .....                              | 38          |
| 2.2.7 <i>Plasmide und Vektoren</i> .....                        | 39          |
| 2.3 PHENOTYPISCHE UND GENOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG .....      | 40          |
| 2.3.1 <i>Kultivierung und Stammhaltung</i> .....                | 40          |
| 2.3.2 <i>Serotypie</i> .....                                    | 40          |
| 2.3.3 <i>Lysotypie</i> .....                                    | 41          |
| 2.3.4 <i>Resistenzbestimmung</i> .....                          | 41          |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.3.5    | <i>Multilocus-Sequenztypisierung (MLST)</i>   | 41        |
| 2.4      | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN   | 42        |
| 2.4.1    | <i>Nukleinsäure-Extraktion, -Reinigung und -Amplifikation</i>                       | 42        |
| 2.4.2    | <i>DNA Sequenzierung</i>  | 45        |
| 2.4.3    | <i>Herstellen elektrokompenter Zellen und Elektroporation</i>                       | 46        |
| 2.4.4    | <i>Deletion der 18.4 kb Insel</i>   | 47        |
| 2.4.5    | <i>Übertragung der Resistenz-Kassette durch Transduktion</i>                        | 48        |
| 2.4.6    | <i>Epitopmarkierung einzelner Leserahmen der 18.4 kb Insel</i>                      | 50        |
| 2.4.7    | <i>N-terminale Verkürzung von ORF10</i>   | 51        |
| 2.4.8    | <i>Klonierung der markierten und gekürzten Leserahmen in pBAD24</i>                 | 51        |
| 2.4.9    | <i>Anfügen eines Selektionsmarkers an die 18.4 kb Insel</i>                         | 53        |
| 2.4.10   | <i>Detektion eines zirkulären Intermediates der 18.4 kb Insertion</i>               | 54        |
| 2.4.11   | <i>Horizontale Übertragung des 18.4 kb Elements</i>                                 | 55        |
| 2.5      | ZELLINFEKTIONSVERSUCHE  | 57        |
| 2.5.1    | <i>Zellkultur</i>   | 57        |
| 2.5.2    | <i>Infektion von RAW 264.7-Mausmakrophage</i>                                       | 58        |
| 2.5.3    | <i>Infektion von MDCK polarisierten Epithelzellen</i>                               | 59        |
| 2.5.4    | <i>Maus-Infektion (Colitis-Modell)</i>  | 59        |
| 2.6      | PROTEINPRÄPARATION UND WESTERNBLOT  | 60        |
| 2.6.1    | <i>Präparation der 3x FLAG-getaggen ORF-Proteine</i>                                | 60        |
| 2.6.2    | <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>                               | 61        |
| 2.6.3    | <i>Coomassie-Färbung</i>  | 62        |
| 2.6.4    | <i>Westernblot</i>  | 63        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>65</b> |
| 3.1      | CHARAKTERISIERUNG VON 4,[5],12:I:- ISOLATEN UNTER EPIDEMIOLOGISCHEN GESICHTSPUNKTEN | 65        |
| 3.1.1    | <i>Lysotypie</i>  | 66        |
| 3.1.2    | <i>Prophagengehalt</i>  | 67        |
| 3.1.3    | <i>Nachweis eines S. Typhimurium-spezifischen Insertionselementes</i>               | 69        |
| 3.1.4    | <i>Genetische Determination des vorherrschenden Resistenzphenotyps ASSuT</i>        | 70        |
| 3.1.5    | <i>Ausmaß der Deletionen im fljB-umgebenden Gencluster</i>                          | 71        |
| 3.1.6    | <i>Sequenztypen mono- und biphasischer STM-Isolate</i>                              | 72        |
| 3.2      | DETEKTION EINES NEUARTIGEN 20 KB FRAGMENTES   | 73        |
| 3.2.1    | <i>Amplifikation der tRNA-Genloci</i>   | 73        |
| 3.2.2    | <i>Long Template PCR</i>  | 74        |
| 3.2.3    | <i>Screening von Salmonella Typhimurium auf das 18.4 kb Element</i>                 | 75        |
| 3.3      | CHARAKTERISIERUNG DES 18.4 KB FRAGMENTES  | 78        |
| 3.3.1    | <i>Sequenzierung</i>  | 78        |

|          |  |              |
|----------|--|--------------|
| 3.3.2    | Definition offener Leserahmen und BLAST-Analysen .....                                     | 79           |
| 3.3.3    | Weiterführende in silico-Analysen .....  | 82           |
| 3.3.4    | Single-ORF-PCR .....   | 87           |
| 3.3.5    | Nachweis der Transkription .....   | 90           |
| 3.4      | DELETION UND RE-INSERTION DES 18.4 KB FRAGMENTES .....                                     | 93           |
| 3.4.1    | Vergleichende Lysotypie.....   | 93           |
| 3.4.2    | Zellinfektionsversuche.....  | 94           |
| 3.4.3    | Wildtyp, Deletionsmutante und Revertante im Maus-Colitismodell.....                        | 96           |
| 3.5      | UNTERSUCHUNGEN ZUR MOBILISIERBARKEIT DER 18.4 KB INSEL .....                               | 97           |
| 3.5.1    | Nachweis eines zirkulären Zwischenproduktes.....   | 97           |
| 3.5.2    | Übertragung der Insel durch Konjugation.....   | 98           |
| 3.5.3    | Integration der transferierten Insel in das <i>S. Typhimurium</i> -Chromosom.....          | 100          |
| 3.6      | UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON PROTEINEN AUSGEWÄHLTER LESERAHMEN .....                    | 100          |
| 3.6.1    | C-terminale Markierung der ORFs 3a und 9a.....   | 100          |
| 3.6.2    | Detektion der Genprodukte mittels Westernblot.....   | 101          |
| 3.6.3    | Nachweis des ORF 10-Proteins in Typ III-Sekretionsmutanten von <i>S. Typhimurium</i> ..... | 103          |
| 3.6.4    | Sekretion von N-terminal verkürzten ORF 10-Varianten.....                                  | 104          |
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>107</b>   |
| 4.1      | DAS SEROVAR 4,[5],12:I:- UNTER EPIDEMIOLOGISCHEN GESICHTSPUNKTEN.....                      | 107          |
| 4.2      | BEDEUTUNG DER 2. GEIßELPHASE FÜR <i>SALMONELLA</i> SPP.....                                | 108          |
| 4.3      | TRAGEN DIE MONOPHASISCHEN ISOLATE EINE NEUE ANTIBIOTIKA-RESISTENZ-INSEL? .....             | 110          |
| 4.4      | EINE NEUE GENOMISCHE INSEL IN MONOPHASISCHEN <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM .....           | 111          |
| 4.4.1    | Verbreitung der 18.4 kb Insel.....   | 112          |
| 4.4.2    | Strukturelle und funktionelle Charakteristika der 18.4 kb Insel .....                      | 113          |
| 4.4.3    | Replikationsfähigkeit der 18.4 kb Insel .....  | 120          |
| 4.4.4    | Horizontale Übertragbarkeit der 18.4 kb Insel.....   | 122          |
| <b>5</b> | <b>AUSBLICK .....</b>  | <b>126</b>   |
|          | <b>ANHANG.....</b>   | <b>X</b>     |
|          | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>XX</b>    |
|          | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>  | <b>XXIV</b>  |
|          | <b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>  | <b>XXVI</b>  |
|          | <b>REFERENZEN.....</b>   | <b>XXVII</b> |
|          | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>XL</b>    |

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat sich eine monophasische *Salmonella* Typhimurium-Variante, die nicht mehr in der Lage ist, das alternative Geißel-Antigen (H2) zu exprimieren, zu einem der bedeutendsten Erreger lebensmittel-assoziiierter humaner Infektionen in Deutschland entwickelt. Obwohl es Abweichungen in Lysotyp, Pulsfeldgelelektrophorese-Muster (PFGE) oder Antibiotika-Resistenzprofil innerhalb dieser Variante gibt, sind in Deutschland Stämme des Lysotyps DT193 mit dem PFGE-Muster STYMXB.0131 und einer Vierfachresistenz gegen die Antibiotika Ampicillin, Streptomycin, Sulfamerazin und Tetracyclin klar vorherrschend. Die starke Zunahme von Isolaten mit den genannten Charakteristika wurde auch aus anderen europäischen Staaten gemeldet. Genom-basierte Untersuchungen zeigten benachbart dem *thrW* tRNA-Locus ein neuartiges 18.4 kb Fragment, das verglichen mit dem *S. Typhimurium* LT2-Referenzgenom einen deutlich niedrigeren G+C-Gehalt aufwies (47.4% vs. 52.2%), was vermuten ließ, dass es sich um ein horizontal erworbenes Element handelte. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Struktur und die Verbreitung der Insertion analysiert. Nachfolgend sollten die funktionellen Eigenschaften der Insel untersucht werden, um Rückschlüsse auf eine mögliche Virulenz- oder Fitnesssteigerung in den Isolaten der sich rasant verbreitenden monophasischen *Salmonella* Typhimurium Variante ziehen zu können.

Die *in silico* Leserahmensuche sagte 27 ORFs (*open reading frames*) voraus, von denen sich mehrheitlich Analoge in *E. coli* und *Shigella*-Genomen finden liessen. Für 26 Leserahmen konnten Transkripte nachgewiesen werden. Der Abgleich mit Protein-Datenbanken ergab v. a. Übereinstimmungen mit Phagen-assoziierten Proteinen, denen bislang keine bestimmte Funktion zugeordnet werden konnte. Zudem wurden *in silico* drei ORF-Produkte als putative Typ III-abhängig sekretierte Effektoren identifiziert. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Insel in der Lage ist, außerhalb des Chromosoms ein zirkuläres Intermediat zu bilden. Dieses mobile Element konnte durch Konjugation in einen geeigneten Rezipienten übertragen werden. *In vitro* Infektionsversuche mit einer polarisierten Epithelzell- sowie einer Makrophagenzelllinie ergaben keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Invasions- bzw. intrazelluläre Replikationsvermögen zwischen dem Wildtyp und einer insel-deletierten Mutante. Diese Resultate wurden auch *in vivo* in einem Streptomycin-Mausmodell bestätigt. Hinsichtlich der Funktionsaufklärung der einzelnen Leserahmen lag der Fokus auf ORF 10, bei dessen Produkt es sich um ein Typ III-Effektorprotein handeln könnte. Die Ergebnisse diverser Western Blot-Experimente zeigten das Genprodukt eindeutig in der Überstandsfraktion, die

Sekretion erfolgt aber wahrscheinlich weder über eines der bekannten Typ III-Sekretionssysteme (T3SS) noch über das SPI6-kodierte Typ VI-Sekretionssystem (T6SS) von *S. Typhimurium*. Zusammenfassend ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit umfassende Informationen zur Struktur, Verbreitung und Übertragbarkeit der neuen genomischen Insel. Ihre Rolle im Lebenszyklus der monophasischen *Salmonella* Typhimurium-Variante konnte dagegen bislang nicht geklärt werden und lässt somit Raum für zukünftige Untersuchungen.

## Summary

A monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium not expressing the second phase flagellar antigene has become one of the predominant agents causing foodborne infections in humans in Germany. In spite of variations in phage type, PFGE and resistance pattern within the emerging monophasic strains one type characterised by phage type DT193, PFGE pattern STYMXB.0131 and tetra-drug resistance towards antibiotics including ampicillin, streptomycin, sulfamerazine and tetracycline clearly dominates in Germany. To this day the same kind of strains has been attracting attention in various European countries. Genome-based analyses displayed an 18.4 kb fragment adjacent to the *thrW* tRNA locus in this dominant strain type. Sequencing of the detected insertion revealed 27 open reading frames and a significantly lower G+C content compared to the closely related *S. Typhimurium* LT2 genome (47.4% vs. 52.2%), indicating its acquisition via horizontal gene transfer. Aim of this study was to provide information on the relevance of the novel island for bacterial fitness or pathogenicity in the emerging monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium. Homologous sequences for most of the open reading frames were found at the nucleotide level in *E. coli* and *Shigella* genomes. Transcripts have been shown for all but three ORFs. Protein BLAST analyses revealed mainly uncharacterized but probably phage-related gene products and further *in silico* applications predicted three putatively type III-secreted effectors. Moreover, it had been shown that the island is able to form a circular intermediate and therefore can be mobilized under certain conditions. Broth mating experiments resulted in the successful conjugational transfer of the 18.4 kb island from the donor to an appropriate *Salmonella* recipient strain. *In vitro* infection experiments with polarized epithelial and macrophage-like cell lines showed no differences between the wildtype and the island-deleted mutant strain regarding the invasion or intracellular replication capacities, respectively. These results were confirmed *in vivo* using a mouse colitis model. To elucidate the function of the gene products, this study focussed on ORF 10 since it was predicted to code for a T3SS effector. Western Blot experiments clearly showed the product in the supernatant fraction but secretion probably occurred neither via the SPI1-, SPI2- or flagella-T3SS nor by the SPI6-encoded T6SS described for *S. Typhimurium*. So, although this study provides detailed information about the structure, the dissemination and the transferability of the novel genomic island, its role in the life cycle of the monophasic *Salmonella* Typhimurium variant remains unclear and awaits further investigation.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Salmonella*

### 1.1.1 Geschichte

Der Erreger des Typhus wurde erstmals 1880 von Karl Joseph Eberth beschrieben, Georg Gaffky, ein Mitarbeiter Robert Kochs, konnte das Bakterium ein Jahr später isolieren (Gaffky-Eberth-Bacillus). 1887 entdeckte Theobald Smith, der Assistent des amerikanischen Tierarztes Daniel Elmer Salmon, auf der Suche nach dem Erreger des Schweinefiebers (*hog cholera*) einen weiteren Vertreter der Gattung und nannte ihn *Salmonella* Choleraesuis. Das Serovar *S. Enteritidis* wurde 1888 zuerst von August Gärtner beschrieben (Gärtner-Bacillus) und Friedrich Loeffler isolierte *S. Typhimurium* 1892 während einer Mäuseepidemie in Greifswald. Die Zusammenfassung der einzelnen Erreger zu einer Gattung und deren Benennung in *Salmonella* zu Ehren von David Elmer Salmon erfolgte im Jahr 1900 [1]. Die zur damaligen Zeit beobachteten Folgen einer Infektion spiegeln sich häufig in der Bezeichnung wider: *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Abortusbovis* (heute *S. Abony*) etc. Nachdem man feststellte, dass meist keine ausgeprägte Wirtsspezifität besteht, wurden neu entdeckte Serovare der Subspez. I häufig nach dem Ort benannt, an dem der Stamm zuerst isoliert wurde (*S. Dublin*, *S. Oranienburg*, *S. Newport* etc.). Bis heute wurden mehr als 2600 Serovare beschrieben und im White-Kauffmann-Le Minor-Schema zusammengefasst [2].

### 1.1.2 Taxonomie

Bei *Salmonella* spp. handelt es sich um Gram-negative Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, welche wiederum der Klasse der Gammaproteobakterien zuzuordnen ist. *Salmonella* spp. können sowohl fakultativ anaerob als auch intrazellulär leben und sind aufgrund ihrer peritrichen Begeißelung lebhaft beweglich. Die aktualisierte Klassifizierung der Gattung *Salmonella* veranschaulicht Abbildung 1.1.

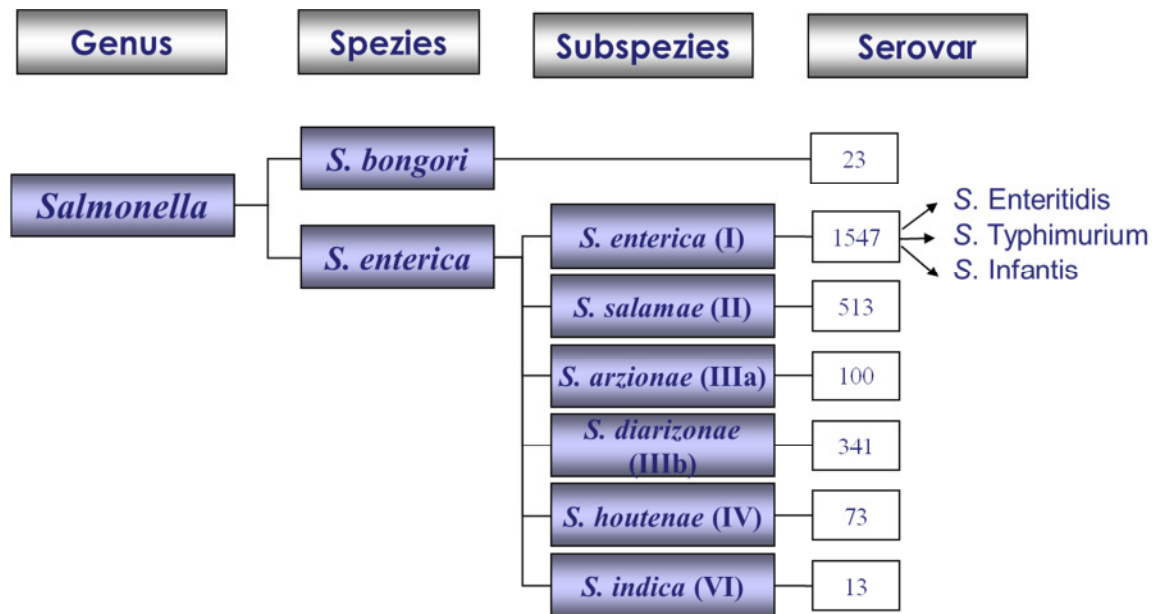
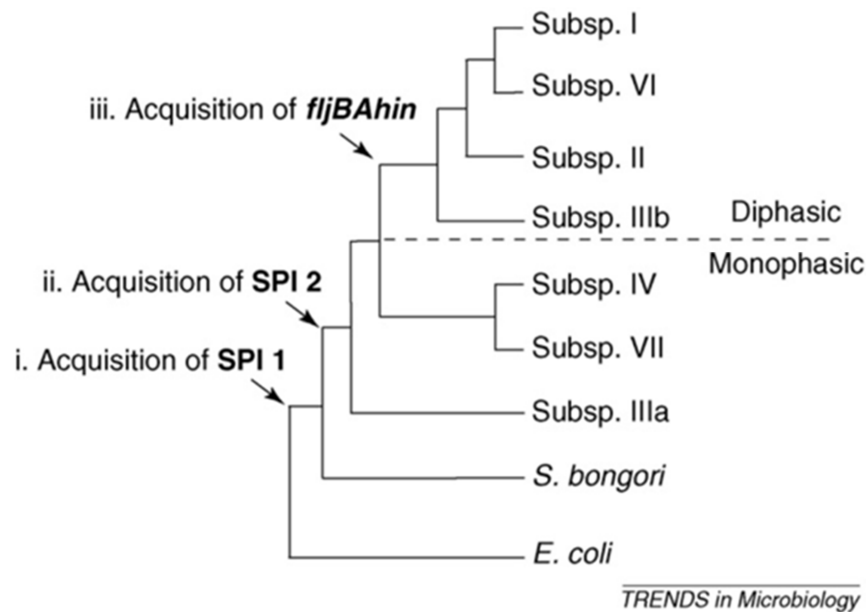


Abbildung 1.1: *Salmonella*-Klassifizierung

Nach Guibourdenche *et al.*, Supplement Nr. 47 zum White-Kauffmann-Le Minor Schema [3]

Die phylogenetische Abspaltung von anderen *Enterobacteriaceae* wie *Escherichia coli* und *Shigella* spp. erfolgte vermutlich vor ca. 100 – 160 Mio. Jahren, u. a. durch Aquisition der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1). Mit Aufnahme der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) spaltete sich *S. enterica* vor ca. 25 Mio. Jahren von *S. bongori* ab [4]. Ein weiteres bedeutendes Ereignis in der Evolution von *Salmonella enterica* war der Erwerb des *fljBA*hin-Genclusters, das die Möglichkeit der Phasenvariation eröffnete und damit den Übergang von den monophasischen zu den biphasischen Subspezies einleitete. Die drei genannten Meilensteine in der Evolution der Gattung *Salmonella* nach McQuiston *et al.* [5] sind in Abbildung 1.2 dargestellt.





**Abbildung 1.2: Die wichtigsten Ereignisse in der Evolution der Gattung *Salmonella***

Aus McQuiston *et al.* [5]

Die Unterscheidung der einzelnen Spezies / Subspezies erfolgt mit biochemischen Methoden, die z. B. die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen nachweisen. Die Einteilung in Serovare beruht auf immunologischen Reaktionen der *Salmonella*-Antigene mit entsprechenden anti-*Salmonella*-Serum. Die Seroformel setzt sich typischerweise zusammen aus dem somatischen (O-) Antigen, einem Bestandteil des Lipopolysaccharids (LPS) und den beiden alternativ exprimierten Flagella- oder Geißel-Antigenen (H1 und H2), die jeweils durch Doppelpunkt voneinander abgegrenzt werden (O:H1:H2). Einige Serovare der Ssp. I haben die Fähigkeit des Phasenwechsels während der Evolution wieder verloren. Sie exprimieren nur eine Geißelphase und werden daher als monophasisch bezeichnet (z. B. *S. Enteritidis*; *S. Dublin*). Auch unbegeißelte Serovare kommen vor (*S. Gallinarum*). Die Serovare *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* und *S. Dublin* können zudem ein Kapselantigen (Vi) exprimieren. Die insbesondere unter epidemiologischen Gesichtspunkten (z. B. im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen) notwendige weitere Subdifferenzierung einzelner Serovare erfolgt auf Grundlage zellbiologischer (z. B. Lysotypie, Resistenzbestimmung) und molekularbiologischer Methoden (PFGE, MLST, MLVA etc.).

### 1.1.3 Verbreitung und Lebensweise

Die Gattung *Salmonella* ist weltweit verbreitet und ihre Vertreter besiedeln vornehmlich den Gastrointestinaltrakt warm- und kaltblütiger Tiere. Die Serovare der *S. enterica* Ssp.I sind dabei v.a. bei Warmblütern zu finden, während die Vertreter der anderen Subspezies sowie *S. bongori* häufig bei poikilothermen Lebewesen auftreten. Durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit – die Bakterien vermehren sich beispielsweise bei Temperaturen zwischen 4°C und 45°C – können Salmonellen eine Vielzahl ökologischer Nischen besetzen und auch außerhalb tierischer Wirte in Habitaten wie Boden, Gewässern, Abwässern sowie in Pflanzen monate- bis jahrelang überleben [6]. Der *Salmonella*-Nachweis aus Umweltproben gestaltet sich jedoch oft schwierig und ist nur mit Hilfe selektiver Anreicherungsverfahren möglich, da die Keimzahl im Verhältnis zur mikrobiellen Gesamtflora sehr gering ist. Von besonderer Bedeutung für die Persistenz außerhalb eines Wirtsorganismus ist zudem die Fähigkeit, sich unter nicht optimalen Bedingungen (z. B. Eisenmangel, niedrige Umgebungstemperaturen) in Biofilmen zu organisieren [7,8]. *Salmonella* spp. können darüber hinaus in einen „Ruhezustand“ übergehen, in welchem sie zwar nach wie vor infektiös sind, sich aber nicht anzüchten lassen und so der Detektion entgehen [9]. Finden sie wieder optimale Bedingungen vor, können die Erreger möglicherweise aus diesem sog. VBNC-Status (*viable but nonculturable*) reaktiviert werden.

Salmonellen sind Zoonose-Erreger, die vom Tier auf den Menschen (und umgekehrt) übertragen werden können. Viele Serovare besitzen ein breites Wirtsspektrum (z. B. *S. Typhimurium*), einige zeigen aber auch eine strenge Wirtsadaptation (z. B. *S. Typhi* an den Menschen, *S. Dublin* an Rinder, *S. Gallinarum* an Hühnervögel). Nach den beim Menschen hervorgerufenen Erkrankungen kann man typhoide und nicht-typhoide (enterische) Salmonellen unterscheiden. Während letztere meist lokal begrenzte, selbstlimitierende Gastroenteritiden / Enterocolitiden verursachen, führen Infektionen mit typhoiden Salmonellen wie *S. Typhi* oder *S. Paratyphi* A und B zu lebensbedrohlichen systemischen Krankheitsverläufen, die v. a. in Entwicklungs- und Schwellenländern ein schwerwiegendes gesundheitspolitisches Problem darstellen. In Deutschland kommen Typhus- und Paratyphus-Infektionen nur sporadisch vor und resultieren meist aus (Urlaubs-)Reisen in Endemiegebiete. Allerdings können auch enterische *Salmonella*-Serovare u. U. invasive Verlaufsformen mit schwerem Fieber, Septikämie etc. bedingen (s. 1.2). Besonders betroffen sind dabei Säuglinge und Kleinkinder sowie ältere und immunsupprimierte Patienten. Ein Hauptreservoir für Enteritis-Salmonellen stellen landwirtschaftliche Nutztiere wie Schweine, Rinder und Geflügel

dar, in denen die Bakterien subklinisch oder symptomlos persistieren. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt i. d. R. über Lebensmittel, die entweder bereits intravital infiziert sind oder während des Verarbeitungsprozesses kontaminiert werden [6]. Die Majorität der durch kontaminierte Lebensmittel verursachten Salmonellosen (>99.5%) wird durch Serovare der Subspezies I verursacht, wobei *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* klinisch und epidemiologisch die größte Bedeutung zukommt. Salmonellen konnten bereits in den verschiedensten Lebensmitteln nachgewiesen werden, so in Gewürzen [10], Tee [11], Schokolade [12], Erdnussbutter [13], frischem Salat, Keimspussen [14], Fruchtsäften [15] etc. Dennoch bleiben rohe oder unzureichend gegarte tierische Lebensmittel wie Eier und Roheiprodukte (z. B. Mayonnaise, Speiseeis) sowie Geflügel- oder Schweinefleisch die häufigsten Infektionsquellen. Die für eine erfolgreiche Infektion nötige Keimzahl hängt sowohl vom Serovar als auch vom Immunstatus des Wirtes ab. So geht man für enterische Serovare beim gesunden Erwachsenen von  $10^5 - 10^6$  Keimen aus, während bei immungeschwächten Personen und Kindern bereits  $< 100$  Keime ausreichen, um eine Salmonellose auszulösen [10]. Bei einigen Serovaren ist die nötige Infektionsdosis mit  $10^2 - 10^3$  Bakterien viel geringer [16].

## 1.2 Die Pathogenese von *Salmonella*-Infektionen

Die Infektion mit *Salmonella* spp. erfolgt i. d. R. durch orale Aufnahme der Bakterien über kontaminierte Lebensmittel; auch eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung durch Schmierinfektion ist möglich. Obwohl die Erreger u. U. eine gewisse Säure-Toleranz ausbilden können [17], sind sie nicht säurefest, so dass der saure pH-Wert des Magens beim gesunden Erwachsenen einen Großteil der Bakterien abtötet – womit die hohen erforderlichen Keimzahlen für eine erfolgreiche Infektion erklärbar sind. Kleinkinder und ältere Personen produzieren weniger Magensäure, daher können bei ihnen bereits wenige Bakterien eine Erkrankung hervorrufen. Mit besonders fettreichen Speisen aufgenommene Erreger entgehen der Abtötung durch den Magensaft durch Bildung von Mizellen [6]. Die niedrige Infektionsdosis bei typhoiden Salmonellen beruht möglicherweise darauf, dass diese vorrangig mit dem Trinkwasser oder wasserreichen Lebensmitteln (frisches Obst, Salate etc.) aufgenommen werden. Das Wasser verdünnt die Magensäure und verkürzt die Verweildauer im Magen, wodurch mehr Bakterien unbeschadet den Dünndarm erreichen [6]. Dort angelangt, sind die Erreger bestrebt, den Mechanismen des angeborenen Immunsystems sowie der Konkurrenz durch die kommensale mikrobielle Darmflora durch Eindringen in die

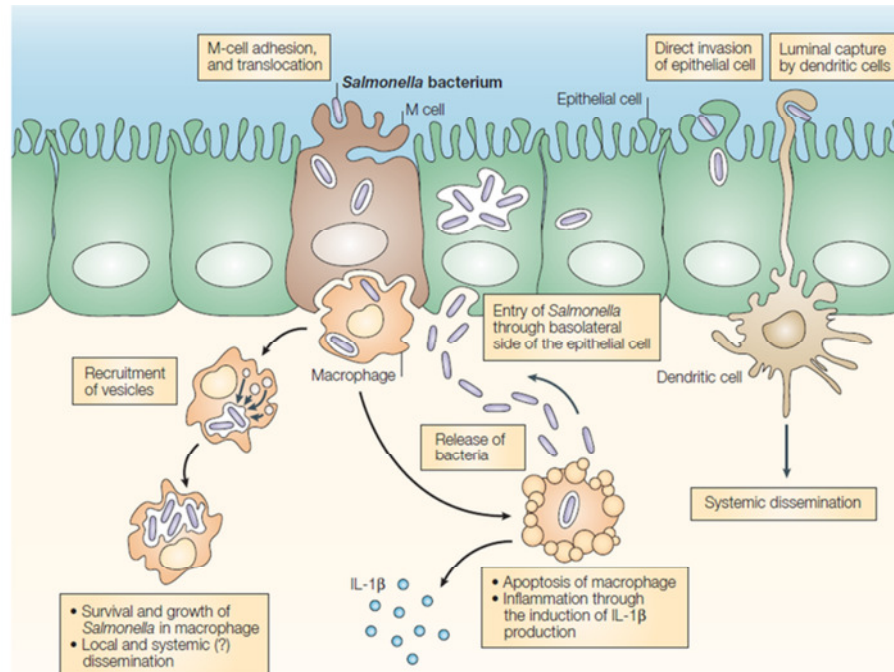
Zellen des Darmepithels zu entgehen. Dies geschieht entweder aktiv durch Invasion oder passiv durch Phagozytose.

In nicht-phagozytierenden Zellen wie den Enterozyten kann *Salmonella* nach erfolgter Fimbrien-vermittelter Adhäsion seine Aufnahme über die Ausschüttung von SPI1-Effektoren induzieren, die eine Umlagerung des eukaryontischen Zytoskeletts bewirken. Über die so entstehenden Membranausstülpungen (*membrane ruffles*), die die Erreger umschließen, werden die Bakterien internalisiert und anschließend von der apikalen zur basolateralen Seite der Epithelzellen transloziert. Innerhalb der membranumschlossenen Vesikel, den sog. *Salmonella containing vacuoles* (SCV), sind die Erreger nicht nur in der Lage, den unspezifischen Abwehrmechanismen der Wirtszelle zu entgehen, sie können sich in der Vakuole auch vermehren, wofür hauptsächlich die SPI2-Effektoren verantwortlich sind. In den Enterozyten stimulieren die Bakterien verschiedene Signaltransduktionskaskaden, was die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-8, ein Chemoattraktant für Leukozyten), die Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*; PMNs) sowie die Aktivierung der Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion zur Folge hat und schließlich die typischen Symptome einer Gastroenteritis bzw. Enterocolitis (kolikartige Bauchschmerzen, Diarrhoe, Fieber) verursacht [18]. Die Bakterien werden an der basalen Membran durch Exozytose wieder freigesetzt [19,20] und können dann benachbarte Epithelzellen infizieren oder von zirkulierenden antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden. Gelingt die Elimination der Keime nicht (z. B. in Patienten mit eingeschränkter Funktion des Immunsystems), kann es zur systemischen Ausbreitung des Erregers kommen. Bleibt die Infektion auf den Darm begrenzt, wird i. d. R. von einer antimikrobiellen Therapie abgesehen, da die Symptome nach wenigen Tagen von selbst abklingen. Aufgrund der ohnehin bereits stark ausgeprägten Unempfindlichkeit (insbesondere bei *S. Typhimurium*) würde eine Antibiotika-Behandlung den Selektionsdruck erhöhen und die Entstehung weiterer Resistenzen begünstigen, zudem würde u. U. die Ausscheidungsdauer des Erregers verlängert und damit die Gefahr der Übertragung erhöht. Bei sog. Dauerausscheidern gelangen die Bakterien über die Leber in die Gallenblase wo sie persistieren können. Besonders betroffen sind Patienten mit Gallensteinen, da *Salmonella* auf deren Oberfläche Biofilme ausbilden kann [21]. Dieser Vorgang wurde kürzlich für die Serovare Typhimurium, Enteritidis und Typhi gezeigt [22].

Bevorzugte Eintrittspforte bei systemischen Krankheitsverläufen stellen allerdings die M-Zellen dar, die sich vereinzelt im Epithel zwischen den Enterozyten befinden. Es handelt sich dabei um Zellen des follikel-assoziierten Epithels mit sehr hoher Endozytose-Aktivität, die auf das „Einfangen“ von Antigenen aus dem Darmlumen spezialisiert sind und die Bakterien in die darunter liegenden Peyer'schen Plaques (Ansammlung von Lymphfollikeln in der Dünndarm-Mucosa) einschleusen. Hase *et al.* identifizierten kürzlich das spezifisch an der apikalen Plasmamembran von M-Zellen exprimierte Glycoprotein 2 (GP2) als einen Transzytose-vermittelnden Rezeptor. GP2 erkennt FimH, eine Komponente von Typ I-Pili auf der Oberfläche verschiedener kommensaler und pathogener Enterobakterien-Spezies wie *E. coli* und *S. enterica* [23]. Diese Form der Aufnahme ist SPI1-unabhängig, da *E. coli* diese Pathogenitätsinsel nicht besitzen und auch *Salmonella*-Mutanten mit Invasions-Gendefekten in M-Zellen invadieren können. Möglicherweise werden über die SPI1 aber unterstützende Effekte vermittelt, da beobachtet wurde, dass invasive *Salmonella*-Stämme effektiver aufgenommen wurden als nicht-invasive *E. coli*-Isolate [24]. Nach der Translokation vom apikalen zum basolateralen Pol der M-Zelle werden die Erreger von Makrophagen, PMNs und dendritischen Zellen aufgenommen [25]. Innerhalb ihres membranumschlossenen Kompartiments, der SCV, sind die Erreger in der Lage, das Milieu zu ihren Gunsten zu verändern und die Reifung der Phagosomen zu bakteriziden Phagolysosomen zu verhindern. Hierzu sind vorrangig die Effektoren der SPI2, aber auch die der SPI1 erforderlich. Die Bakterien gelangen daraufhin in das retikulo-endotheliale System und können sich anschließend systemisch in Organen wie Milz und Leber ausbreiten. Alternativ können die Salmonellen über die Aktivierung der Caspase 1 die Pyroptose ihres Wirtsmakrophagen einleiten und damit die Inflammation des Darmepithels fördern [26]; die dabei frei werdenden Mikroorganismen können wiederum benachbarte Zellen infizieren und damit ebenfalls zur systemischen Verbreitung beitragen.

Von Vazquez-Torres und Kollegen wurde zudem ein alternativer Weg beschrieben, über den zumindest *Salmonella* Typhimurium in der Lage ist, sich SPI1-unabhängig im Gesamtorganismus zu verbreiten. Ermöglicht wird dies durch das  $\beta$ 2-Integrin CD18 exprimierende Leukozyten (wahrscheinlich dendritische Zellen und / oder Gewebe-Makrophagen), die sich in der Darmschleimhaut befinden und die Erreger ohne Beteiligung des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes über den Blutstrom zur Milz transportieren [27,28]. Die direkte Aufnahme von *S. Typhimurium* durch dendritische Zellen in der Lamina propria des Dünndarmepithels, die ihre Pseudopodien zwischen den Epithelzellen hindurch

bis ins Darmlumen schicken und die Erreger damit förmlich „einfangen“, wurde von Niess *et al.* beschrieben [29]. Eine Übersicht über die Aufnahme von *Salmonella* in die verschiedenen Zellen des Dünndarmepithels zeigt Abbildung 1.3 [30].

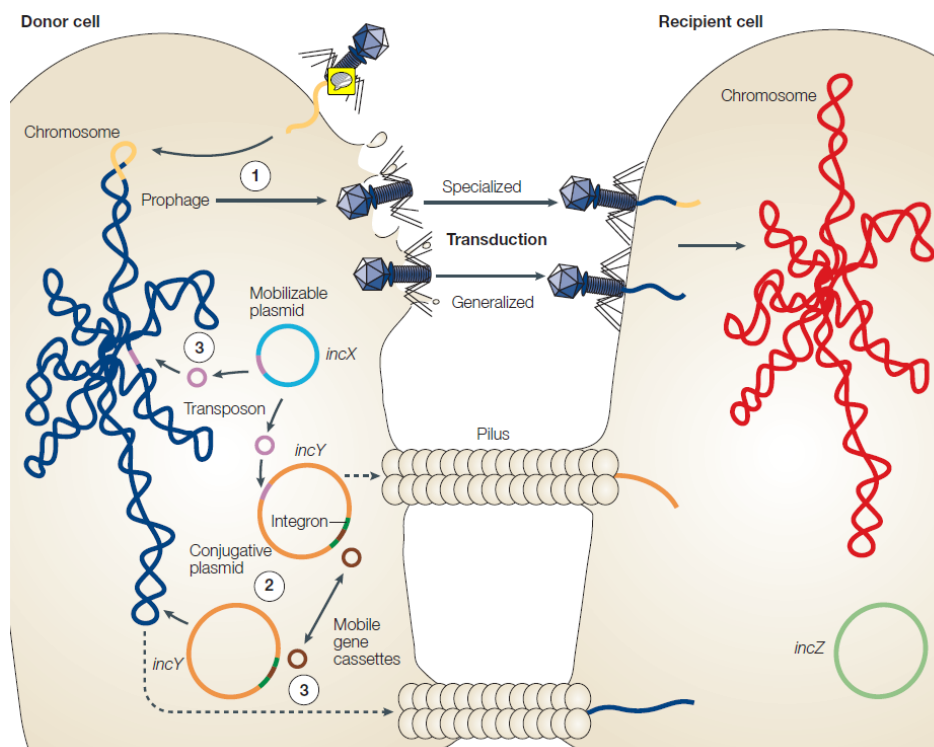


**Abbildung 1.3: Wechselwirkungen von *Salmonella* mit Zelltypen des Dünndarmepithels**

Aus „War and peace at mucosal surfaces“ von P. J. Sansonetti [30]

### 1.3 Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Die bakterielle Evolution wird maßgeblich durch das Vermögen der Mikroorganismen geprägt, genetisches Material horizontal auszutauschen. Einen Überblick über die Möglichkeiten des horizontalen Gentransfers (HGT) gibt Abbildung 1.4. aus einem *Nature Review* von Frost *et al.* [31]. Durch Transformation, Transduktion und Konjugation können Gene bzw. Gencluster von einer Bakterienzelle auf eine andere - u. U. auch spezies- und gattungsübergreifend [32] - übertragen werden. Der Transfer von genetischem Material über Plasmide und Phagen wurde bereits in den 1950er Jahren beschrieben [33,34]. Auch die Entwicklung vom apathogenen zum pathogenen Mikroorganismus beruht im Wesentlichen auf der Anpassung an spezielle Nischen sowie der Akquirierung von Virulenzgenen [35].

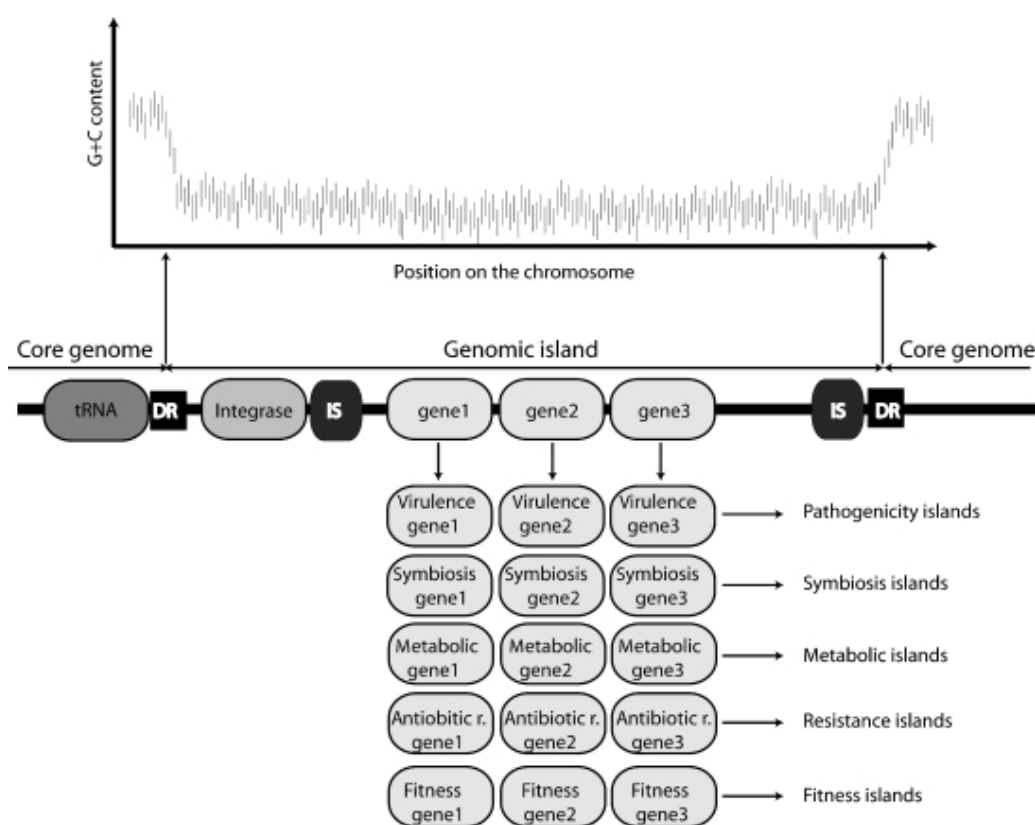


**Abbildung 1.4: Horizontaler Gentransfer zwischen Bakterienzellen**

**Möglichkeiten zum Austausch genetischen Materials nach Frost *et. al.* [31]**

Das Spektrum der Virulenzfaktoren umfasst dabei sowohl strukturelle als auch funktionelle Proteinkomplexe wie z. B. Fimbrien, Flagellen, Invasionsfaktoren, Toxine u.a. Durch weiterführende Untersuchungen zur Lokalisation von Virulenzgenen sind in den vergangenen Jahren sog. Pathogenitätsinseln (PAI) ins Zentrum des Interesses gerückt. Erstmals beschrieben wurden diese durch Hacker *et al.* für uropathogene *E. coli* [36]. In der Folge wurden diese genetischen Elemente in einer Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterienspezies identifiziert [37,38]. Die typischen Charakteristika von Pathogenitätsinseln wurden ebenfalls von Hacker und Kollegen beschrieben [38]. Demnach handelt es sich um 10 bis 200 kb große chromosomale Bereiche, die oft mit tRNA-Loci assoziiert sind, einen vom übrigen Genom abweichenden G+C-Gehalt aufweisen und häufig von repetitiven Elementen / Insertionselementen flankiert sind. Zudem enthalten PAIs häufig Virulenz-assoziierte Loci sowie (z. T. kryptische) Gene, wie Integrasen, Excisionasen oder Transposasen, die darauf hinweisen, dass es sich um mobile Elemente handelt oder einst handelte. Allerdings erfüllen nur wenige Pathogenitätsinseln alle diese Kriterien, so ist z. B. die *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) nicht an einem tRNA-Locus ins Genom integriert und die G+C-Gehalte mancher Inseln unterscheiden sich kaum von dem des Gesamtgenoms.

Daneben weisen viele dieser Elemente Gene auf, deren Produkte nur mittelbar mit einer Virulenzsteigerung in Verbindung stehen und sich eher auf die Förderung der bakteriellen Fitness, auf metabolische Funktionen oder die Resistenz gegen Chemotherapeutika auswirken. Entsprechend ihrer Funktionen werden diese Inseln als Metabolische Inseln, Fitness- oder Resistenzinseln bezeichnet [39,40] und unter dem Oberbegriff „Genomische Inseln“ (GEI) zusammengefasst (Abbildung 1.5). Genomische Inseln haben häufig die Fähigkeit der horizontalen (Selbst-)Übertragbarkeit verloren und gelten als stabil in das Rezipientengenom integriert. Diese Immobilisierung kommt durch den Verlust funktionaler Mobilisierungs- und / oder Transfergene zustande und wird als Mechanismus betrachtet, der die Stabilisierung und Archivierung von Genen, die für das Bakterium von Vorteil sind, zum Ziel hat [41]. Unter Umständen können genomische Inseln aber durch andere selbstübertragbare Elemente in *cis* oder in *trans* mobilisiert und transferiert werden [42,43].



**Abbildung 1.5: Unterteilung genomischer Inseln nach funktionellen Gesichtspunkten**

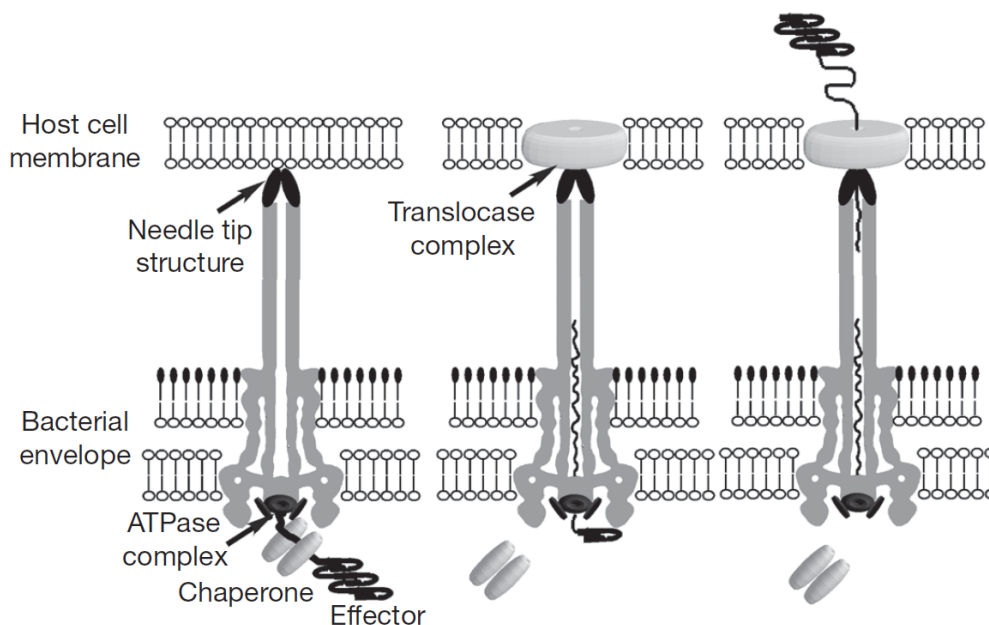
aus Juhas *et al.* "Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution" [40]



### 1.3.1 *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI)

Für die Gattung *Salmonella* wurden bis heute 22 PAIs bzw. SPIs (*Salmonella* pathogenicity island) beschrieben [44,45]. Wie unter 1.1.2 erwähnt, sind die SPIs 1 und 2 evolutionsgeschichtlich sehr alt und ihre Akquisition leitete die Abspaltung der Gattung *Salmonella* von anderen Mitgliedern der Enterobacteriaceae-Familie (SPI1) ein bzw. trennte die Gattung in die beiden Spezies *S. enterica* und *S. bongori* (SPI2) [4]. Beide Pathogenitätsinseln sind damit in allen Vertretern der Spezies *S. enterica* vorhanden und besitzen fundamentale Bedeutung für deren Pathogenese, weshalb nachfolgend etwas näher auf ihre Funktion eingegangen werden soll. Andere SPIs finden sich dagegen nur in bestimmten *Salmonella enterica* Subspezies oder sogar nur in einzelnen Serovaren [44,46]. Diese SPIs sind phylogenetisch jünger und wahrscheinlich mit der Adaption an bestimmte Wirte oder ökologische Nischen verknüpft. Durch die verschiedenen Wege des horizontalen Gentransfers unterliegt das akzessorische Genom von *Salmonella* spp. stetigen Veränderungen; im Gegenzug erlauben kontinuierlich weiter entwickelte Sequenzierungsmethoden die effiziente Analyse kompletter Bakteriengnome, so dass die Zahl der identifizierten Pathogenitätsinseln (bzw. genomischen Inseln) in Zukunft sicher weiter zunehmen wird.

Die Bedeutung der *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 und 2 beruht hauptsächlich auf den Insel-kodierten Typ III-Sekretionssystemen (T3SS) und deren Effektorproteinen, die im Fall der SPI1 die Invasion nicht-phagozytierender Wirtszellen vermitteln bzw. im Fall der SPI2 das intrazelluläre Überleben und die Replikation in Makrophagen ermöglichen. Typ III-Sekretionssysteme gleichen einem Nadelkomplex (Injectisom), durch den Effektoren aus dem Bakterium entweder ins umgebende Medium sekretiert oder direkt ins Zytosol der Wirtszelle transloziert werden können. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten wird vermutet, dass T3SS aus dem Flagella-Sekretionsapparat Gram-negativer Bakterien hervorgegangen sein könnten [47]. Der prinzipielle Aufbau eines Typ3-Injectisoms aus Galan *et al.* [48] ist in Abbildung 1.6 gezeigt.



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines Typ3-Nadelkomplexes**

Übernommen von Galan und Wolf-Watz [48]

Typ3-Sekretions-Komplexe bestehen aus mehr als 20 Proteinen; neben den Strukturkomponenten sind das v. a. Effektoren, aber auch akzessorische Proteine wie Chaperone, ATPasen und Translokator- sowie regulatorische Proteine. T3SS sind auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene streng regulierte Sekretionsmaschinen, wodurch die räumlich und zeitlich koordinierte Sekretion / Translokation in Abhängigkeit vom Stadium des Infektionszyklus gewährleistet wird. So wird das SPI1-T3SS, das die Invasion nicht-phagozytierender Wirtszellen vermittelt, bereits im Darmlumen exprimiert, während das für das intrazelluläre Überleben notwendige SPI2-T3SS erst aktiviert wird, wenn das Bakterium sich in der Wirtszelle befindet [49]. Die verschiedenen Stadien des *Salmonella*-Infektionszyklus sowie die jeweils exprimierten SPI1- und SPI2-Effektoren [50] sind in Abbildung 1.7 veranschaulicht.

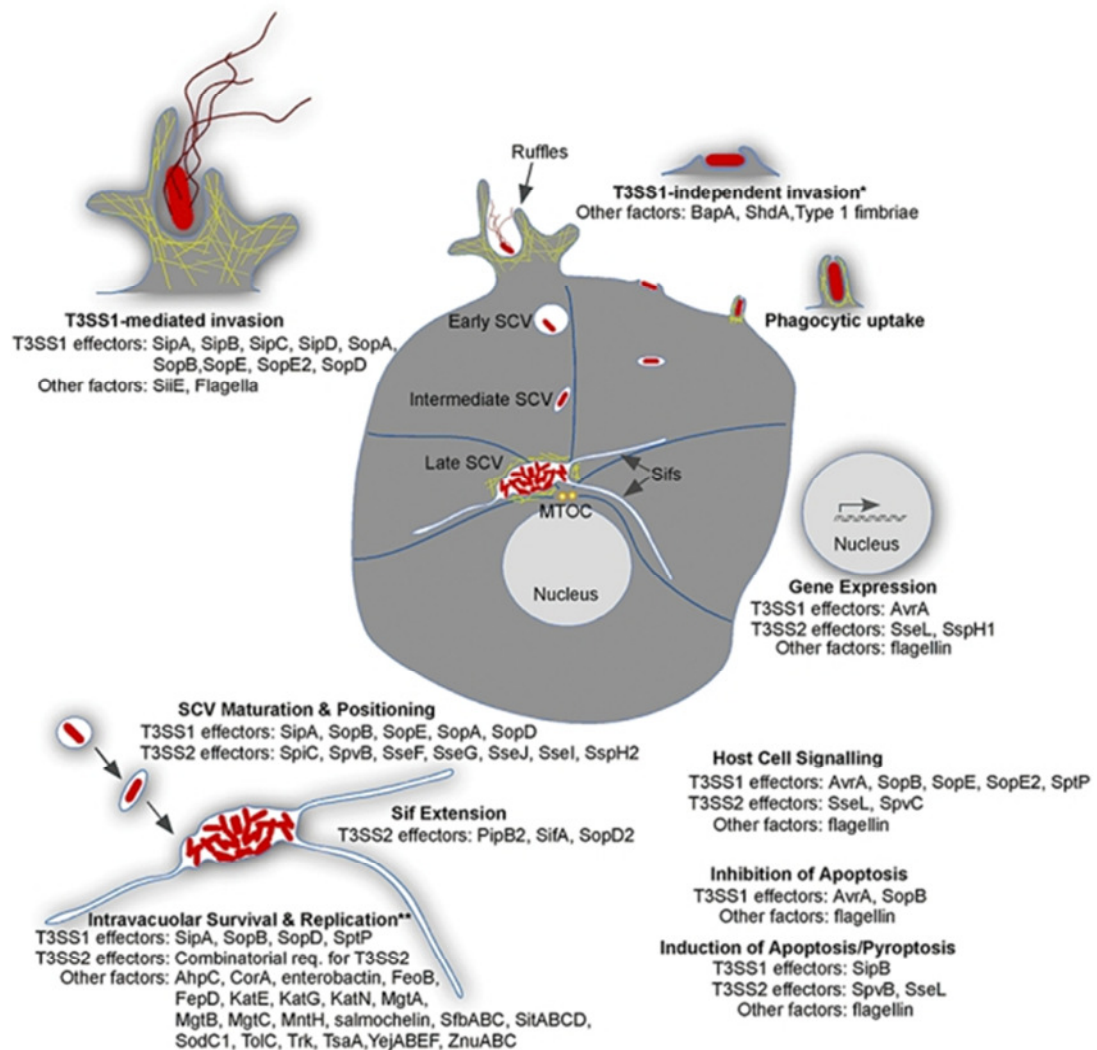


Abbildung 1.7: Virulenzfaktoren im Infektionszyklus von *Salmonella enterica*

Aus Ibarra und Steele-Mortimer: "Salmonella - the ultimate insider" [50].

### 1.3.1.1 Die Funktionen des SPI1-T3SS

Die ca. 40 kb umfassende SPI1 ist auf dem Centisom 63 des *Salmonella*-Chromosoms lokalisiert und wurde erstmals von Mills *et al.* beschrieben [51]. SPI1 ist nicht mit einem tRNA-Locus assoziiert. Sie kodiert neben den T3SS-Strukturproteinen für diverse Effektorproteine, Chaperone, Translokatoren und Regulatoren sowie ein Eisen-Aufnahmesystem [46]. Nicht alle durch das SPI1-T3SS sekretierten Effektoren sind auf SPI1 kodiert (SopB z. B. auf SPI5 und SopE auf dem Phagen SopEφ), so dass die Invasion nicht-phagozytischer Wirtszellen durch *Salmonella* spp. wahrscheinlich erst durch die Akquisition mehrerer voneinander unabhängiger genetischer Elemente möglich wurde [52]. *In vitro* wird das SPI1-T3SS während der späten logarithmischen Wachstumsphase induziert, *in vivo* leiten u. a. eine geringe

Sauerstoffkonzentration und hohe Osmolarität des umgebenden Mediums die Expression ein [53]. Die Umweltsignale werden durch die Sensorkinasen bakterieller Zweikomponenten-Systeme (BarA/SirA, OmpR/EnvZ, PhoBR und PhoPQ) registriert; die phosphorylierten Response-Regulatoren vermitteln dann die Expression lokaler Regulator-Proteine wie HilA (Transkriptionsfaktor), InvF (Transkriptionsregulator) u. a., die letztlich die Synthese der Struktur- und Effektorproteine bewirken [46]. Das SPI1-T3SS wird demnach bereits vor dem Kontakt mit der intestinalen Epithelzelle aktiviert, so dass nach erfolgter Adhäsion der Effektor-Pool innerhalb weniger Sekunden durch den ebenfalls bereits assemblierten Nadelkomplex in das Wirtszell-Zytosol entleert werden kann [54]. Hier aktivieren die Effektoren SopB (indirekt über Second Messenger), SopE2 und SopE die eukaryotischen Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42, indem sie sog. *G-nucleotide exchange factors* mimikrieren und so über den *NFκB*-Signalweg das Wirtszell-Signalling modellieren [54-57], während die Effektorproteine SipA und SipC direkt auf die Aktin-Filamentbildung Einfluss nehmen [58]. Das Ergebnis dieser Vorgänge ist die Umbildung des Wirtszell-Zytoskeletts und die Bildung sog. *membrane ruffles*, die das Bakterium umschließen und durch Makropinozytose internalisieren. In der Zelle werden die Effekte durch SptP, einen weiteren SPI1-Effektor, der ebenfalls auf Rac1 und Cdc42 wirkt, antagonisiert, die ursprüngliche Zytoskelett-Struktur wird wieder hergestellt [59]. SopB werden darüber hinaus Funktionen bei der Reifung der SCV sowie dem Schutz infizierter Epithelzellen vor Apoptose zugeschrieben [54]. Zudem wurde in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass die Inaktivierung von SopB die Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion sowie die Einwanderung von Leukozyten zum Ort der Entzündung mindert, dieser Effekt wird durch SopD-Inaktivierung verstärkt [18]. SipA ist ebenfalls an der Rekrutierung von PMNs beteiligt, während SipB (ein SPI1-Translokator-Protein, das gleichzeitig Effektorfunktion besitzt) über die Bindung an Caspase-1 die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 bewirkt, was zur sog. „Pyroptose“ (einer Form des Zelltods, die sowohl Charakteristika von Apoptose als auch Nekrose aufweist) infizierter Makrophagen und damit zur Verstärkung der intestinalen Entzündungsreaktion führt [57]. Die Effektoren des SPI1-T3SS vermitteln demnach nicht nur die Aufnahme des Bakteriums in nicht-phagozytierende Wirtszellen, sondern sie sind daneben auch an der Ausprägung der Symptome einer Salmonellen-Enteritis beteiligt.

### 1.3.1.2 Die Funktionen des SPI2-T3SS

Die Effektoren des SPI2-T3SS sind vornehmlich für das Überleben und die Replikation von *S. enterica* innerhalb der Wirtszelle von Bedeutung. Sie werden, im Gegensatz zu den Effektorproteinen der SPI1, nicht von außen ins Zytosol der Wirtszelle transloziert, sondern durch die Membran der SCV. Die SPI2 wurde fast zeitgleich mit der SPI1 als Pathogenitätsinsel identifiziert [60]; sie ist ebenfalls ca. 40 kb groß und liegt auf Centisom 31, benachbart dem *vaI/V* tRNA-Gen. Die Insel wurde wahrscheinlich in mehreren Schritten erworben, da sie aus zwei Teilen besteht, von denen der erste ca. 15 kb große Abschnitt einen Tetrathionatreduktase-Komplex kodiert, der lange als unbedeutend für die Pathogenese angesehen wurde. Neueste Untersuchungen von Winter *et al.* zeigen jedoch, dass dieser Komplex es *Salmonella* ermöglicht, Tetrathionat als Elektronenakzeptor und damit zur Energiegewinnung zu nutzen. Tetrathionat entsteht als Nebenprodukt der inflammatorischen Immunantwort, wenn reaktive Sauerstoffspezies im Darmlumen Schwefelverbindungen oxidieren. Die durch *Salmonella*-Virulenzfaktoren ausgelöste Entzündungsreaktion verschafft dem Erreger damit einen signifikanten Wachstumsvorteil, mit dessen Hilfe er sich im entzündeten Darm gegen die fermentierende natürliche Flora behaupten kann [61]. Der zweite, ca. 25 kb große Abschnitt der SPI2 trägt die virulenz-relevanten Gene für das T3SS, seine Effektoren und Chaperone sowie das SsrAB-Zweikomponentensystem. Zudem ist das 15 kb Fragment auch in *S. bongori* zu finden, das 25 kb Teilstück dagegen nur in *S. enterica*, was dafür spricht, dass der virulenz-assoziierte Part phylogenetisch jünger ist als der Tetrathionatreduktase-Komplex [62]. Zwischenzeitlich wurde eine Vielzahl von SPI2-Effektoren identifiziert, von denen aber nur drei auf der Insel selbst kodiert sind: SpiC, SseF und SseG [63]. Die Kontrolle der SPI2-Sekretion erfolgt lokal durch das auf der Insel kodierte SsrAB-Zweikomponentensystem; globale Regulatoren sind u. a. die Zweikomponentensysteme EnzV/OmpR und PhoPQ. Zu den Umweltfaktoren, die eine SPI2-Induktion vermitteln, gehören z. B. die Absenkung des pH-Werts, Phosphatmangel sowie niedrige  $Mg^{2+}$ - oder  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen [64].

Die durch das SPI2-T3SS sekretierten Effektoren ermöglichen das Überleben und die Vermehrung der Bakterien innerhalb der SCV, indem sie den Vesikeltransport entlang der Mikrotubuli der Wirtszelle für die Bereitstellung von Nährstoffen und Membranbestandteilen manipulieren. Weiterhin können SPI2-Effektoren vor den antimikrobiellen Aktivitäten der Wirtszelle schützen, indem sie z. B. die Co-Lokalisation der SCV mit der NADPH phagozytischen Oxidase (PHOX) sowie der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase (iNOS)

inhibieren und damit die Exposition gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies [65] oder Stickstoff-Intermediaten [66] verhindern. Frühere Daten zeigten zudem, dass SPI2-Effektoren (namentlich SpiC) die Fusion der Vakuole mit zellulären Lysosomen verhindern [67]. Neuere Studien dagegen belegen, dass die SCV durchaus mit terminalen Lysosomen fusionieren kann [68]. Die Biogenese der SCV kann in drei Phasen gegliedert werden [69]:

- (i) Die frühe Phase bis ca. 30 min. nach Aufnahme in die Wirtszelle. In diesem Stadium ist die SCV durch frühe endosomale Marker gekennzeichnet.
- (ii) Die Mittlere Phase von ca. 30 min. bis 5h nach Invasion. Sie ist charakterisiert durch späte endosomale Marker; der pH-Wert in der Vakuole wird auf ca. 4.5 abgesenkt und die SCV wird nun entlang der Mikrotubuli zum Zellkern hin bewegt.
- (iii) Die späte Phase ab 5h nach Aufnahme in die Zelle. Die Vakuole befindet sich juxtanuclear nahe dem Golgi-Apparat. Durch Interaktion mit dem tubulären Motorprotein Dynein werden Mikrotubuli um die SCV herum gebündelt [70] und sekretorische Vesikel angesammelt. Die Bakterien beginnen sich zu replizieren.

Damit modifiziert *Salmonella enterica* den exozytotischen Transport von Cargo-Vesikeln vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran der Wirtszelle [71]. Außerdem werden in der späten Phase entlang der Mikrotubuli sog. *Salmonella-induced filaments* (SIFs) gebildet [72], deren Bedeutung derzeit noch nicht geklärt ist. An der ersten Phase sind die SPI1-Effektoren SipA, SopA, SopB und SopD beteiligt. Die mittlere und späte Phase der SCV-Reifung werden durch SPI2-Effektoren vermittelt [69]. Ausnahme: SipA; der SPI1-Effektor ist an der Aufrechterhaltung der SCV in der späten Reifungs-Phase beteiligt [73].

Obwohl die T3SS der beiden beschriebenen *Salmonella*-Pathogenitätsinseln unabhängig voneinander erworben wurden und zu verschiedenen Zeiten des Infektionszyklus durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden, sind ihre Funktionen dennoch koordiniert. Beispielsweise zeigten Deiwick *et al.* [74], dass bestimmte Mutationen in SPI2 die Expression von SPI1-Genen beeinflussen. Zudem können die Effektorproteine SspH1, SirP und SseK1 von den T3SS beider Pathogenitätsinseln transloziert werden [63]. Außerdem wirken der SPI1-Effektor SipA und der SPI2-Effektor SifA in der späten Phase der SCV-Reifung zusammen [73].

### **1.3.1.3 Weitere Pathogenitätsinseln, die für Sekretionssysteme kodieren**

Wie bereits erwähnt, wurden neben den SPIs 1 und 2 bis heute noch 20 weitere *Salmonella*-Pathogenitätsinseln identifiziert, von denen mindestens zwei für weitere Sekretionssysteme

kodieren [44,45]. Die etwa 25 kb große SPI4 beispielsweise beinhaltet ein T1SS (ABC-Transporter) mit dem gleichfalls auf der Insel determinierten SiiE als sekretiertem Effektor. Mit fast 600 kDa ist SiiE das größte Protein des *Salmonella*-Proteoms, es enthält 53 repetitive Immunglobulin-Domänen und stellt funktional ein nicht fimbriales Adhäsın dar, das für die Anheftung von *Salmonella* an polarisierte Epithelzellen benötigt wird. Gerlach und Kollegen zeigten außerdem, dass die Kooperation zwischen dem SPI4-Adhäsın und den Effektoren des SPI1-T3SS nötig ist, um polarisierte Epithelzellen von der apikalen Seite aus zu infizieren [75].

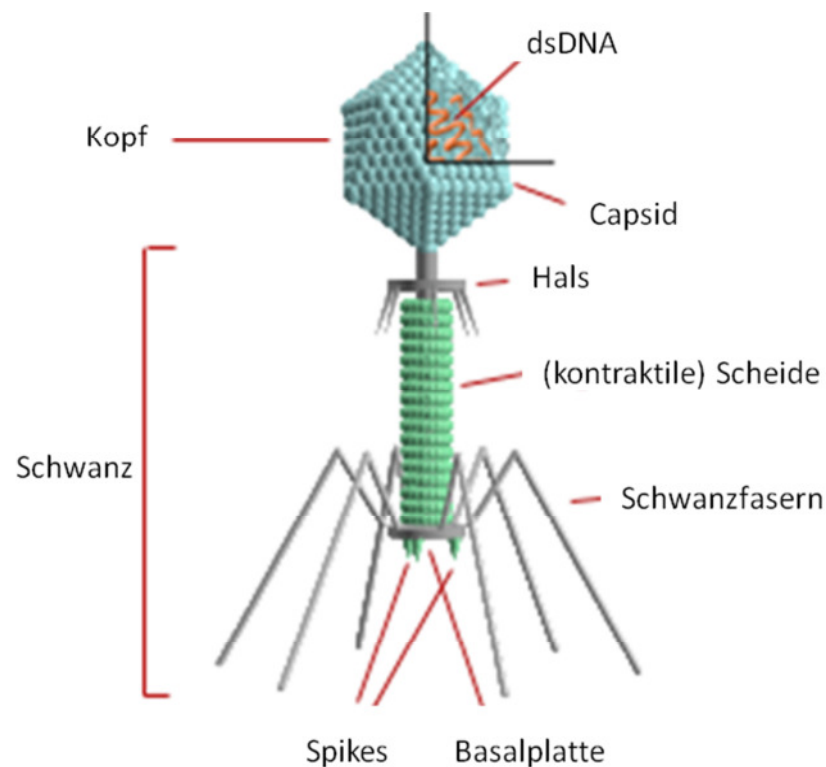
In den letzten Jahren wurden zudem mehrere Loci identifiziert, die für Typ VI-Sekretionssysteme (T6SS) kodieren. Ihre Verteilung innerhalb der Gattung *Salmonella* ist unterschiedlich [76]. Am besten charakterisiert ist das T6SS der SPI6, ehemals SCI (*Salmonella enterica* centisome 7 island) [77], die sich benachbart dem tRNA(AspV)-Locus befindet und in den meisten Serovaren von *S. enterica* vorkommt (in *S. Enteritidis* nur teilweise). Die Insel ist ca. 47 kb groß und enthält neben dem genannten T6SS auch zwei Fimbrien-Operons (*saf* und *tcf*) sowie das Adhäsın / Invasin *pagN*. Bemerkenswert an T6SS ist, dass der Sekretionsapparat einem invertierten kontraktilen Phagenschwanz gleicht [78,79]. Mit dessen Hilfe könnten Typ VI-Effektoren sowohl in eukaryotische Wirtszellen als auch in Bakterienzellen der gleichen oder einer anderen Spezies injiziert werden. Die beschriebenen Funktionen von T6SS in *Salmonella* erscheinen vielschichtig, teils sogar widersprüchlich und umfassen die Beteiligung an der Pathogenese in Mäusen und Makrophagen [80] ebenso wie Virulenzminderung bzw. Förderung der längerfristigen Besiedlung eines Wirtes [81]. Außerdem wurden Typ VI-vermittelte Interaktionen zwischen Bakterien beschrieben [82,83].

Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die horizontale Übertragung genetischen Materials sind Typ 4-Sekretionssysteme. Forschungsergebnisse der letzten Jahre belegen, dass die konjugative Übertragung in einer Vielzahl Gram-positiver und Gram-negativer Erreger über Typ 4-Sekretionssysteme vermittelt wird [84]. Das Besondere an T4SS ist ihre Vielseitigkeit: neben der Zell-zu-Zell-Übertragung von DNA durch Konjugation sind sie in der Lage, DNA-Moleküle aus dem extrazellulären Milieu aufzunehmen bzw. in dieses zu entlassen (z. B. in *Helicobacter pylori* und *Neisseria gonorrhoeae*) sowie die Sekretion von Effektorproteinen ins Wirtszell-Zytosol zu vermitteln (wie in *Helicobacter pylori* und *Legionella pneumophila*) [85]. Funktionale T4SS bestehen aus den Bausteinen für den Paarungskomplex, welcher einen Kanal durch die Donor-Zellmembranen bildet und (meistens) einem Pilus, der den Zellkontakt zum Rezipienten vermittelt [86]. Kürzlich wurde ein neuer Typ von T4SS

entdeckt, der scheinbar mit der Verbreitung genomischer Inseln assoziiert ist und u. a. auf SPI7 detektiert wurde, die bislang in *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* und *S. Dublin* gefunden wurde [87,88].

### 1.3.2 Modulation der Virulenz durch Bakteriophagen

Bakteriophagen sind Viren, die sich auf Bakterien als Wirtsorganismus spezialisiert haben. *Salmonella*-Phagen gehören zur Ordnung der *Caudovirales* (Schwanzviren). Sie besitzen ein ikosaedrisches Capsid, das mit dsDNA gefüllt ist. Der prinzipielle Aufbau eines Schwanzphagen ist in Abbildung 1.8 gezeigt. Je nach Länge und Kontraktilität des Phagenschwanzes unterscheidet man drei Familien (*Myo*-, *Sipho*- und *Podoviridae*), auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.



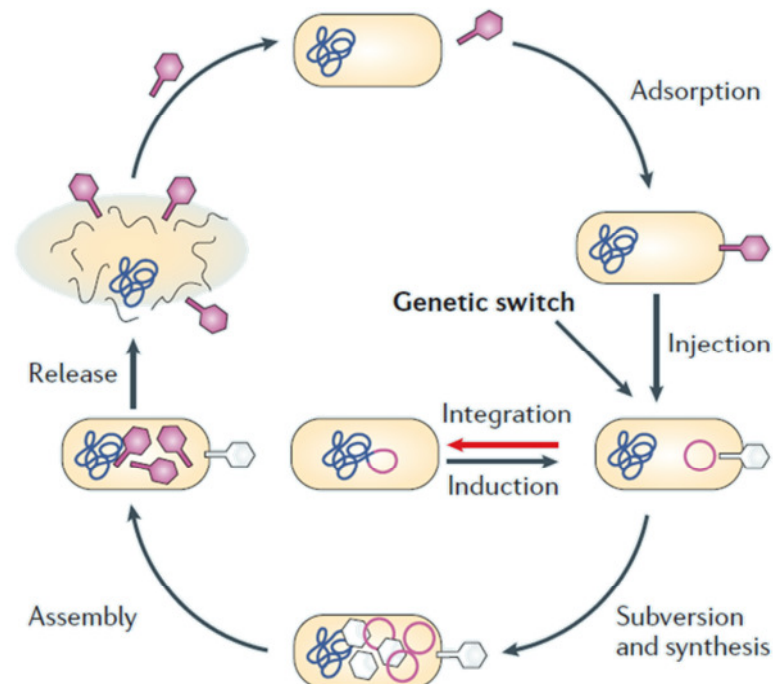
**Abbildung 1.8: Prinzipieller Aufbau eines Bakteriophagen [89]**

Nach Anheftung an das Wirtsbakterium injiziert der Phage die im Capsid verpackte DNA ins Zytosol des Wirtes. Dort wird diese entweder vervielfältigt, transkribiert und schließlich zu neuen Phagenpartikeln assembliert, was die Lyse der Wirtszelle zur Folge hat (lytischer



Zyklus) oder die DNA integriert ins Genom des Bakteriums und wird mit diesem repliziert (lysogener Zyklus).

Die Gattung *Salmonella* dient einer Vielzahl von Bakteriophagen als Wirt. Diesen Umstand macht man sich bei der Subtypisierung einiger Serovare mittels Lysotypie zunutze (s. 2.2.3). Bei dieser Methode werden serovar-spezifische Phagensets verwendet, die das zu testende *Salmonella*-Isolat lysieren können. Neben diesen lytischen Phagen gibt es aber auch eine Reihe von temperenten *Salmonella*-Phagen, die das Wirtsbakterium nicht sofort lysieren, sondern in dessen Genom integrieren und mit diesem repliziert werden. Man spricht dann von einem Prophagen. Während dieses lysogenen Stadiums unterdrückt ein Phagenrepressor die Transkription der „frühen“ Gene (einschließlich des für die Mobilisierung benötigten Integrase-Gens *int*). Unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei Schädigung der Wirtszell-DNA, wird der Prophage induziert, d. h. der Repressor wird entweder proteolytisch gespalten oder durch Bindung eines Antirepressor-Proteins inaktiviert, der lytische Zyklus wird eingeleitet. Abbildung 1.9 aus einem Nature Review beschreibt die verschiedenen Stadien einer Bakteriophageninfektion.



**Abbildung 1.9: Stadien der Bakteriophageninfektion**

Lysogener und lytischer Zyklus nach Sturino und Klaenhammer [90].

Prophagen integrieren nicht willkürlich in das bakterielle Genom, sondern über homologe Rekombination an sog. *attachment sites* – kurzen chromosomalen Sequenzen (*attB*), die eine Entsprechung im Phagengenom haben (*attP*). Die bakteriellen *attachment sites* befinden sich häufig benachbart zu tRNA Loci. Für *S. Typhimurium* wurden bislang acht Prophagen-Integrationsstellen beschrieben [91]. Prophagen tragen aber nicht nur zur genetischen Diversität ihrer Wirtsorganismen bei, sie sind auch maßgeblich an der Ausprägung und Verbreitung von Virulenz- oder Fitnessseigenschaften beteiligt [92]. Dies erfolgt über Gene, deren Produkte für die Phagenfunktion nicht essenziell sind, sog. Cargo-Gene oder Morone [93,94]. Diese Gene können z. B. von vorangegangenen Wirten stammen und durch fehlerhafte Excision ins Phagengenom gelangt sein, was ihre bevorzugte Position an den Phagenenden erklären würde. Wenn ein solches Extra-Gen die Anpassung an eine spezielle Nische begünstigt oder auf andere Weise die bakterielle Fitness steigert, wirkt sich das indirekt auch positiv auf die Verbreitung des Prophagen aus, die ja mit dem Wirtsbakterium erfolgt [95]. Andererseits ist dieser Selektionsvorteil für das Bakterium an das Vorhandensein des Prophagen gebunden, was mitunter durch den Verlust der Integrations- bzw. Excisionsfunktion realisiert wird (*int*- oder *xis*-Mutanten) [96]. Über verschiedene phagen-vermittelte Immunitätsmechanismen kann zudem die Superinfektion durch lytische Phagen unterbunden und die Wirtszelle auf diese Art geschützt werden (*superinfection exclusion*) [90,97]. Ändert sich der Phenotyp eines Bakteriums durch Integration eines Prophagen, spricht man von lysogener Konversion. So sind eine Reihe von Toxingenen verschiedener Bakteriengattungen auf temperenten Phagen kodiert, beispielsweise die Shigatoxine Stx1 und Stx2 in *E. coli*, das Neurotoxin C1 von *Clostridium botulinum*, das Diphtheriatoxin von *Corynebacterium diphtheriae* oder das Cholera-toxin von *Vibrio cholerae* sowie verschiedene *Staphylococcus aureus*-Enterotoxine [98]. In *Salmonella enterica* sind u. a. diverse Typ3-Effektoren der SPIs 1 und 2 auf Prophagen determiniert, z. B. SopE, SseI und SspH1 [99-101], aber auch andere Virulenzfaktoren wie Superoxid-Dismutasen (SodCI, SodCIII), die möglicherweise am Schutz des Bakteriums vor radikalen Sauerstoff-Spezies in der SCV beteiligt sind [92,102]. Brüssow und Kollegen sehen in der phagen-vermittelten Kombination von Virulenz- und Fitnessfaktoren die treibende Kraft bei der Optimierung von *Salmonella*-Wirts-Interaktionen, die neue epidemische Klone hervorbringt [95].

### 1.3.3 Weitere mobile genetische Elemente (MGE)

Das Spektrum mobiler genetischer Elemente umfasst neben Plasmiden, Bakteriophagen und genomischen Inseln noch eine Reihe weiterer Vektoren wie Integrone, IS-Elemente, Transposons, integrative konjugative Elemente (einschließlich konjugativer Transposons), integrative mobilisierbare Elemente etc. Aufgrund ihrer, durch die hohe Rekombinationskapazität bedingten, mosaikartigen Struktur ist die Klassifizierung dieser Module schwierig [31]. Die in der Literatur verwendeten Termini sind oft uneindeutig, was die Zuordnung eines mobilen Elements zu einer der genannten Gruppen erschwert [103]. Roberts *et al.* haben deshalb eine Revision der Nomenklatur vorgeschlagen [104]. Integrone können ins bakterielle Chromosom, aber auch in Plasmide oder Transposons eingefügt werden. Über spezifische Rekombinationssequenzen (keine Repeats!) nehmen sie Genkassetten (häufig Antibiotika-Resistenzgene) auf. Daneben kodieren sie für eine Integrase zur Insertion bzw. Excision sowie einen Promotor zur Expression der aufgenommenen Genkassette [105]. Transposons dagegen sind Insertionselemente, die von repetitiven Sequenzen (*direct* oder *inverted repeats*) flankiert werden. Sie sind in der Lage, innerhalb einer Zelle an verschiedene Stellen des Chromosoms oder auf Plasmide zu springen – in letzterem Fall können sie so auch horizontal übertragen werden. Ihre Insertion ins Genom erfolgt an zufälliger Stelle. Transposons können selbst-replikativ oder nicht selbst-replikativ sein, d. h. die Transposition läuft entweder nach dem „*cut and paste*“- oder dem „*copy and paste*“-Mechanismus ab. Im zweiten Fall wird die Kopienzahl in der Zelle erhöht. Vermittelt wird der Ortswechsel durch eine Transposase, die entweder auf dem Element selbst kodiert ist oder von einem anderen Transposon stammen kann. Bakterielle Transposons enthalten häufig zusätzliche Gene, die nicht für die Transposition benötigt werden (z. B. Resistenzgene). Die Eigenschaft, an willkürlicher Stelle ins Genom zu integrieren und damit Genloci zu zerstören, macht man sich bei der sog. Transposon-Mutagenese zunutze.

Integrative konjugative Elemente (ICEs) sind eine weitere Form genetischer Vektoren, die diverse Merkmale verschiedener anderer mobiler Elemente aufweisen. So sind sie über einen konjugativen Mechanismus, der die Bildung eines zirkulären Zwischenproduktes einschließt, selbstübertragbar (ähnlich Plasmiden). Lange ging man davon aus, dass das ringförmige Intermediat instabil ist und sich nicht extrachromosomal replizieren kann, so dass die Vervielfältigung ausschließlich als integriertes Fragment mit dem Genom der Bakterienzelle erfolgt [106], analog einem Prophagen. Inzwischen konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die autonome Replikation einiger ICEs, beispielsweise durch Induktion einer SOS-

Antwort, stimuliert werden kann [107]. Manche ICEs besitzen eine spezifische Integrationsstelle, wie man sie bei genomischen Inseln findet, bei anderen ist die Sequenzspezifität gering (konjugative Transposons) [31,108]. Während man bei den meisten genomischen Inseln davon ausgeht, dass sie nicht (mehr) selbstübertragbar sind [109,110], kodieren ICEs funktionelle Typ IV-Sekretionssysteme (T4SS), die ihren Transfer vermitteln [108]. Kürzlich wurde zudem beschrieben, dass genomische Inseln durch ICEs mobilisiert werden können [43].

## 1.4 *Salmonella Typhimurium*

*Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhimurium trägt die Seroformel 4,[5],12:i:1,2. Dabei stehen 4, 5 und 12 für die O-Antigene (LPS-Antigene). Während O4 und O12 in allen Isolaten des Serovars exprimiert werden, handelt es sich bei O5 nicht um ein eigenständiges Antigen, sondern um eine Variante von O4, bei der der Abequose-Rest des LPS-Polymers azetyliert ist. Die Modifikation wird durch die O5-Azetyltransferase OafA vermittelt. Fehlt das Enzym und ist O5 damit nicht nachweisbar, spricht man von der Variante Copenhagen. Eine fehlende O5-Expression kann durch verschiedene Mutationen im *oafA*-Gen verursacht werden und hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *S. Typhimurium* [111]. Die beiden alternativ exprimierten Flagella- oder Geißel-Antigene Hi und H1,2 werden durch die Gene *fliC* und *fljB* kodiert, die an unterschiedlichen Stellen auf dem Chromosom lokalisiert sind. *fljB* bildet mit *fljA*, einem posttranskriptionellen Inhibitor von FliC, ein Operon. *Upstream* von diesem befindet sich der *hin*-Locus, der eine Rekombinase kodiert. Der Mechanismus der Phasenvariation beruht auf der Hin-vermittelten Inversion des *fljBA*-Promotors, was zur Folge hat, dass weder FljB (H1,2) noch FljA (FliC-Inhibitor) exprimiert werden können, während die FliC (Hi)-Translation nicht mehr gehemmt wird (Abbildung 1.10). Das Phänomen des Phasenwechsels ist einzigartig für *Salmonella enterica* und es wird angenommen, dass es sich dabei entweder um einen Mechanismus handelt, der dazu dient, der Immunreaktion des Wirtes zu entgehen, oder dass die verschiedenen Flagelline unter unterschiedlichen Bedingungen bevorzugt exprimiert werden und so der Anpassung an bestimmte Wirte oder ökologische Nischen dienen [5].

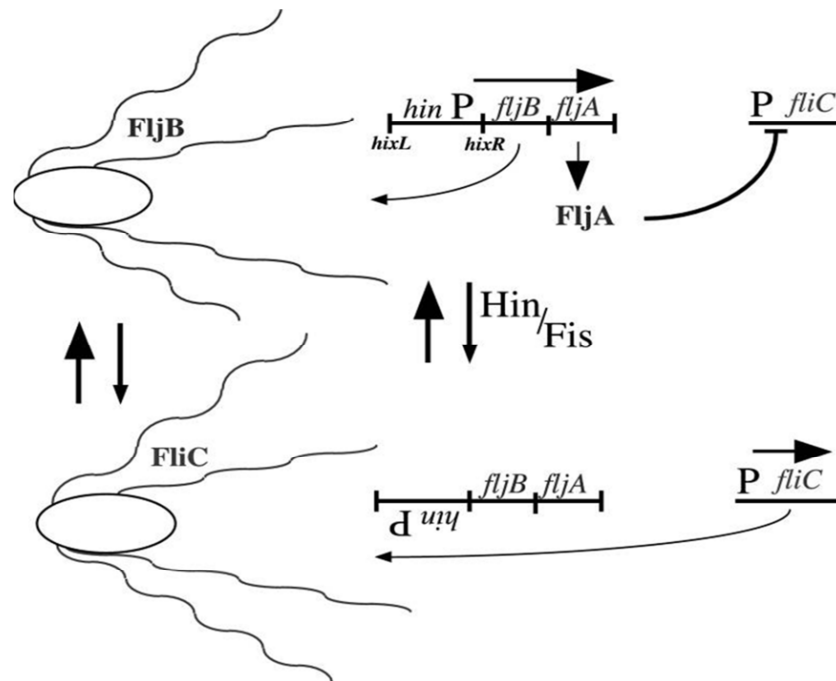


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des Phasenwechsels in *S. enterica*

**Oben:** *fljBA* wird transkribiert und das FljB-Flagellin produziert, während die FliC-Translation durch FljA gehemmt wird. **Unten:** Der *fljBA*-Promotor wurde durch Hin-vermittelte Rekombination invertiert, FliC kann translatiert werden. Aus Aldridge et. al. [112]

*S. Typhimurium* ist neben *S. Enteritidis* das am häufigsten isolierte Serovar in Deutschland und den meisten europäischen Staaten [113]. Während letzteres hauptsächlich mit Geflügel und Roh-Ei assoziiert ist, findet man *S. Typhimurium* v. a. in Fleischprodukten, z. B. Hackfleisch und Roh-Wurst. In den letzten Jahren mehren sich aber auch Infektionen durch kontaminierte pflanzliche Lebensmittel. Im Jahr 2011 waren deutschlandweit 35 dem RKI gemeldete *Salmonella*-Ausbrüche und -Gruppenerkrankungen auf das Serovar Typhimurium zurückzuführen (Quelle: RKI; SalmoDB). Insgesamt wurden dem RKI im Jahr 2011 8346 *S. Typhimurium*-Infektionen angezeigt [114].

Das Serovar Typhimurium hat prinzipiell ein breites Wirtsspektrum, obwohl einige seiner Lysotypen stark wirtsadaptiert sind (DT2 an Tauben, DT40 an Singvögel, DT8 an Wassergeflügel). *S. Typhimurium* wurde 1892 von Friedrich Loeffler aus Mäusen isoliert und gehört damit zu den ersten beschriebenen Vertretern der Gattung *Salmonella*. Die Bezeichnung Typhimurium lässt bereits erkennen, dass die Erreger in Mäusen typhus-ähnliche Erkrankungen verursachen, während sie im (ansonsten gesunden) Menschen zumeist lokal begrenzte, selbstlimitierende gastroenterale Infektionen auslösen, die häufig durch

Brechdurchfall und leichtes Fieber gekennzeichnet sind. Schwere systemische Verläufe, bei denen die Keime in die Blutbahn gelangen und Septikämien und Organschäden verursachen, kommen selten vor und betreffen dann i. d. R. Patienten mit eingeschränkter Immunabwehr wie ältere Menschen, Kleinkinder oder Personen mit anderen Grunderkrankungen. Durch die Besiedlung von Nutztierbeständen, in denen die Erreger meist symptomlos persistieren, gelangen sie in die Nahrungskette [115,116]. Problematisch in diesem Zusammenhang ist die zunehmende Resistenzentwicklung, die sicher auch durch den Einsatz sub-inhibitorischer Antibiotikakonzentrationen in der intensivierten Nutztierhaltung (v. a. in Geflügel- und Schweinebeständen) gefördert wurde. So beschrieben Foley und Kollegen basierend auf Daten des *National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems* (NARMS), dass 2003 22.5% der humanen nicht-typhoiden *Salmonella*-Isolate resistent gegen mindestens ein Antibiotikum waren, während es im Veterinär- und Schlachttierbereich 44% waren [116]. Das Serovar Typhimurium ist von dieser Entwicklung besonders betroffen, wie aus dem Antibiotika- und Resistenzatlas für Deutschland GERMAP 2010 hervorgeht [117]. Dem Bericht zufolge nimmt der Anteil sensibler humaner *S. Typhimurium*-Isolate stetig ab (32% 1999 vs. 12% 2008), während nach wie vor ca. 95% der humanen *S. Enteritidis*-Stämme sensibel sind. Demnach bildet die Resistenzsituation in Salmonellen v. a. die Entwicklung in *S. Typhimurium* ab. Auch die nach 2008 das NRZ gesandten *S. Typhimurium*-Isolate sind mehrheitlich mono- oder multiresistent gegen die getesteten Antibiotika. Von 399 im Jahr 2011 eingesandten humanen STM-Isolaten waren lediglich 54 (13.5%) sensitiv gegenüber allen getesteten Chemotherapeutika (Quelle: RKI, SalmoDB).

#### **1.4.1 Die monophasische Variante sv. 4,[5]12:i:-**

Wie unter 1.1.2 beschrieben, sind die meisten Serovare der Subspezies I generell in der Lage, zwei verschiedene Flagella-Formen alternativ zu exprimieren. Vorrangig wird das *fliC*-kodierte Flagellin der 1. Geißelphase gebildet. Die Frequenz des Phasenwechsels wird in der Literatur mit  $1 \times 10^{-3}$  bis  $1 \times 10^{-5}$  pro Bakterium und Generation angegeben [118], zur Funktion dieses Switching-Mechanismus existieren nach wie vor verschiedene Hypothesen (s. 4.2). Manche Serovare dieser Subspezies haben die Fähigkeit des Phasenwechsels im Laufe der Evolution wieder verloren und können nur noch einen Geißeltyp ausbilden (z. B. *S. Enteritidis*).

Doch auch von prinzipiell biphasischen Serovaren kommen gelegentlich monophasische Varianten vor, die auf spontane Mutationen / Deletionen im Flagella-Gencluster

zurückzuführen sind. Auch von *S. Typhimurium* wurden seit jeher sporadisch Stämme isoliert, die entweder nur Hi oder nur H1,2 exprimieren konnten [119]. In den letzten Jahren hat sich jedoch die monophasische Variante 4,[5],12:i:- in einem Maße etabliert, dass sie die „normale“ biphasische Form zu verdrängen scheint (s. 3.1). Auch dieser monophasischen Variante ist es gelungen, in Nutztierbestände einzudringen und sich so über die Nahrungskette zu verbreiten. EU-weit nimmt dieses Serovar den vierten Rang der aus Schlachtschweinen isolierten *Salmonella*-Serotypen ein, in Deutschland steht es dies bezüglich sogar an zweiter Stelle nach der biphasischen *S. Typhimurium*-Variante [120]. In Deutschland und anderen europäischen Staaten handelt es sich dabei vornehmlich um Stämme des Lysotyps DT193, die mindestens eine Vierfach-Resistenz gegen Ampicillin, Streptomycin, Sulfamerazin und Tetracylin (ASSuT) aufweisen. Nur 0.8% der 624 humanen Einsendungen an das NRZ im Jahr 2011 waren sensitiv (Quelle: RKI, SalmoDB). Die ungewöhnlich schnelle und starke Verbreitung dieser Isolate gab den Anstoß für die vorliegende Arbeit.

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Seit 2006 wurde am Nationale Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger (NRZ) eine starke Zunahme von *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- Isolaten beobachtet. Auch aus anderen europäischen Staaten wurde eine durch diese monophasische *Salmonella*-Variante verursachte Häufung von Einzel- und Gruppen-erkrankungen gemeldet [121-125]. Zunächst sollte geklärt werden, ob es sich bei den Stämmen, die die Fähigkeit zur Bildung der 2. Geißelphase verloren haben, tatsächlich um eine Typhimurium-Variante handelt, da lt. dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema beispielsweise auch eine monophasische *S. Lagos*-Variante in Frage käme; beide Serovare unterscheiden sich serotypisch nur in der Ausprägung der 2. Geißelphase. Außerdem sollten mögliche Ursachen für die rasche Ausbreitung dieser Variante gefunden werden. Isolate mit der Seroformel 4,[5],12:i:- wurden bereits früher sporadisch nachgewiesen, konnten sich aber nicht gegen *S. Typhimurium* durchsetzen. Die nun beobachtete starke Verbreitung ließ vermuten, dass diese Stämme jetzt einen Selektionsvorteil, beispielsweise in Form von gesteigerter Virulenz oder Fitness bzw. besserer Anpassung an eine spezielle Nische, besitzen. Da solche Eigenschaften i. d. R. durch horizontalen Gentransfer (HGT) erworben werden, lag das Hauptaugenmerk auf der Detektion möglicherweise horizontal erworbener Elemente. Um neuartige genomische Inseln oder Prophagen zu erfassen, wurde deren Eigenschaft ausgenutzt, bevorzugt an tRNA-Loci ins Genom zu integrieren [110] und ein tRNA-Screen

durchgeführt. Dieser ergab eine bislang unbekannte ca. 18.4 kb Insertion am *thrW* tRNA-Locus. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass das Fragment 27 offene Leserahmen enthält, deren Genprodukte v. a. Ähnlichkeiten zu phagen-assoziierten und hypothetischen Proteinen aufweisen. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der strukturellen, insbesondere aber in der funktionellen Charakterisierung dieses neuartigen Elements. Daneben sollte seine Präsenz bzw. Verbreitung in *Salmonella enterica* unter besonderer Berücksichtigung seiner horizontalen Übertragbarkeit untersucht werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Software

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1 zeigt die zur Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Geräte einschließlich deren Hersteller.

| Instrument   | Modell                                   | Hersteller  |
|--|--|---|
| <i>Agarosegelelektrophorese</i>                    |  |   |
| Dokumentationssystem                               | GelDoc XR                                | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                        |
| Elektrophoresekammern                              | PerfectBlue Gelsystem<br>Mini M / L      | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen                      |
| Mikrowelle   | Micro-Chef FM B935, 1100 W               | Moulinex / Krups GmbH, Offenbach / Main                   |
| Stromversorgungsgerät                              | Electrophoresis Power Supply<br>EV243    | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen                      |
| Videodrucker                                       | VP-1200                                  | SEIKO Precision (Europe), Neu-Isenburg                    |
| <i>Bakterienanzucht</i>                            |  |   |
| Brutschränke                                       | HeraCool 40, FunctionLine u. a.          | Heraeus Holding GmbH, Hanau                               |
| Koloniezählgerät                                   | aCOLyte                                  | Synbiosis, Cambridge, UK                                  |
| Plattiergeräte                                     | Whitley Automated Spiral<br>Plater       | Meintrup DWS Laborgeräte GMBH,<br>Lähden-Holte            |
|  | Eddy Jet 2                               | IUL Instruments GmbH, Königswinter                        |
| Drehrad  | <i>Roller Drum</i>                       | New Brunswick Scientific                                  |
| Schüttelinkubatoren                                | CERTOMAT® H                              | Sartorius AG, Göttingen                                   |
|  | innova® 42 Incubator Shaker<br>System    | New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen                  |
| Spektrophotometer                                  | BioPhotometer plus                       | Eppendorf AG, Hamburg                                     |
| Elektroporator                                     | MicroPulser™                             | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                        |
| Kamera   | EOS 450D digitale<br>Spiegelreflexkamera | Canon Deutschland GmbH, Krefeld                           |
| Kamerastativ mit integrierter<br>Durchlichteinheit | Copylizer eVision exe.cutive HF          | Kaiser Fototechnik GmbH & Co.KG, Buchen                   |
| <i>PCR</i>   |  |   |
| Gradientencycler                                   | SensoQuest LabCycler Gradient            | SensoQuest GmbH, Göttingen                                |
| Thermocycler                                       | Thermal Cyclcr 2710                      | Applied Biosystems Applera Deutschland<br>GmbH, Darmstadt |

|                            |                                       |   |
|----------------------------|---------------------------------------|---|
| Thermomixer                | 5436                                  | Eppendorf AG, Hamburg                                   |
| Vortexer                   | VF2                                   | IKA® Labortechnik Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen |
| pH-Meter                   | S20-Seven easy™ pH                    | Mettler-Toledo GmbH, Giessen                            |
| Pipetten                   | Eppendorf Research®, variabel         | Eppendorf AG, Hamburg                                   |
| Reinstwasser-Anlage        | Milli-Q Advantage A10                 | Millipore GmbH, Schwalbach                              |
| <i>SDS-PAGE</i>            |                                       |   |
| Dokumentationssystem       | GelDoc 2000                           | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                      |
| Elektrophoresekammern      | Mini-PROTEAN® Tetra Cell              | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                      |
| Stromversorgungsgerät      | PowerPac Basic                        | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                      |
| Sonicator                  | Digital Sonifier® Cell Disruptor      | Branson Ultraschall GmbH, Dietzenbach                   |
| Waagen                     | BP610, BP2100                         | Sartorius AG, Göttingen                                 |
| <i>Western Blot</i>        |                                       |   |
| Chemilumineszenzimager     | Chemismart 3000                       | VILBER LOURMAT GmbH, Eberhardzell                       |
| Geltrockner                | Gel Dryer Model 583                   | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                      |
| Laborwippe                 | Tumbling Table WT12                   | Biometra GmbH, Göttingen                                |
| Semi-Dry Blotter           | Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                      |
| Stromversorgungsgerät      | PowerPac Basic                        | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                      |
| <i>Zellkultur</i>          |                                       |   |
| Absaugsystem               | BioChem-VacuuCenter BVC 21            | VACUUBRAND GmbH & Co. KG, Wertheim                      |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator | HERA Cell 240i                        | Thermo Fisher Scientific, Langenselbold                 |
| Mikroskop                  | Axiovert 40 CFL                       | Carl Zeiss, Göttingen                                   |
| Pipettierhilfe             | PIPETBOY acu                          | INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald                      |
| Sterile Werkbank           | Hera safe                             | Heraeus Holding GmbH, Hanau                             |
| Wasserbad                  | Lauda AL5                             | Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen          |
| <i>Zentrifugen</i>         |                                       |   |
| Minizentrifuge             | Spectrafuge™ Mini Centrifuge          | Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA             |
| Tischzentrifuge, kühlbar   | SIGMA 3-30K                           | Sartorius AG, Göttingen                                 |
| Tischzentrifuge, kühlbar   | Biofuge fresco                        | Heraeus Holding GmbH, Hanau                             |
| Laborzentrifuge, kühlbar   | Avanti™ J-25                          | Beckman Coulter GmbH, Krefeld                           |
| Ultrazentrifugen, kühlbar  | L60; XL70                             | Beckman Coulter GmbH, Krefeld                           |

Tabelle 2.1: Geräte

### 2.1.2 Software

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Software-Programme sind alphabetischer Reihenfolge in Tabelle 2.2 aufgeführt.

| Programm                     | Anwendung   | Hersteller / Referenz          |
|------------------------------|---|--------------------------------|
| Adobe Photoshop CS5          | Bildbearbeitung   | Adobe Systems Inc. USA         |
| Artemis 14.0.0               | Sequenzanalyse und Bearbeitung,                         | Freeware, Sanger Institute     |
| Clone Manager Professional 9 | Sequenzanalyse und Bearbeitung, Primerdesign            | Sci Ed Software, USA           |
| ClustalW                     | Sequenz-Alignment                                       | Freeware, EMBL-EBI*            |
| DS Gene 1.5                  | Sequenzanalyse und Bearbeitung, Primerdesign            | Accelrys Inc., San Diego, USA  |
| Effective T3                 | TypIII-Effektor-Vorhersage                              | Freeware [126]                 |
| EndNote X5                   | Literaturverwaltung                                     | Thomson Reuters, New York, USA |
| gecco!®                      | TypIII-Effektor-Vorhersage                              | Freeware [127]                 |
| NCBI BLAST                   | Paarweise und multiple Sequenzvergleiche                | Freeware [128]                 |
| LaserGene 10.0               | Sequenzanalyse und Bearbeitung                          | DNASTAR, Madison, USA          |
| PRED TMBB                    | Vorhersage transmembraner beta-Faltblätter              | Freeware [129]                 |
| Quantity One                 | Geldokumentation  | BioRad, München                |
| SignalP 4.0                  | Signalpeptid-Vorhersage                                 | Freeware [130]                 |
| Softberry BProm              | Promotorenvorhersage                                    | Freeware [131]                 |
| SoftBerry FgenesB            | Vorhersage von Operonstrukturen                         | Freeware [132]                 |
| SOSUI                        | Vorhersage transmembraner alpha-Helices                 | Freeware [133]                 |
| SOSUI-GramN                  | Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen | Freeware [134]                 |

**Tabelle 2.2: Software**

\* European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2.3 sind die zur Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmittel mit ihrer Bezugsquelle aufgeführt.

| Materialbezeichnung   | Beschreibung  | Hersteller  |
|---|---|---|
| <i>Antikörper</i>   |   |   |
| anti-FLAG   | anti-FLAG clone M2, produced in mouse                           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                          |
| anti-HA   | anti-HA High Affinity IgG1, produced in rat                     | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim                |
| anti-DnaK   | anti-dnaK clone 8E2/2, produced in mouse                        | Enzo Life Sciences  |
| anti-Flagellin ( <i>Salmonella</i> group flagellar antigen) | anti-Flagellin clone 4h2, produced in mouse                     | BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln                             |
| Sekundär-Antikörper, HRP-gekoppelt                          | anti-Mouse-HRP und anti-Rat-HRP, produced in goat               | DIANOVA GmbH, Hamburg,                                      |
| Anti- <i>Salmonella</i> Seren                               | polyklonale Antiseren gegen <i>Salmonella</i> O- und H-Antigene | SIFIN Institut für Immunpräparate u. Nährmedien-GmbH Berlin |
| <i>Enzyme und Substrate</i>                                 |   |   |
| DNase   | TURBO DNase™  | Ambion®, Life Technologies™ GmbH, Darmstadt                 |
| DNA-Ligase  | T4 DNA-Ligase   | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
| Enhanced Chemielumineszenz (ECL-) Substrat                  | SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate              | Thermo Fisher Scientific (Pierce), Rockford, USA            |
| Lysozym   | Lysozym aus Hühnereiweiß  | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg                      |
| Restriktionsendonukleasen                                   | <i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i> , <i>DnaN</i> , <i>XhoI</i> etc.     | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
| RNase OUT™  | RNase-Inhibitor   | Invitrogen™ / Life Technologies™ GmbH, Darmstadt            |
| <i>Kits</i>   |   |   |
| DNA-Isolation(Gesamtzell-)                                  | DNeasy Blood and Tissue Kit                                     | Qiagen GmbH, Hilden   |
| DNA-Isolation (Plasmid-)                                    | GeneJet Plasmid Miniprep Kit                                    | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
|   | Purelink HiPure Plasmid Midiprep Kit                            | Invitrogen™ / Life Technologies™ GmbH, Darmstadt            |
| Reinigung vom PCR-Produkten / Gelbanden                     | NucleoSpinExtract II  | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren                         |
| PCR (Polymerase-Kits)                                       | Expand 20 kb <sup>PLUS</sup> PCR System                         | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim                |
|   | High Fidelity PCR Master  | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim                |
|   | HotStar Taq Plus Master Mix Kit                                 | Qiagen GmbH, Hilden   |

|                                      |  |   |
|--------------------------------------|--|---|
| RT-PCR                               | One Step RT-PCR Kit                              | Qiagen GmbH, Hilden   |
| <i>Marker</i>                        |  |   |
| DNA-Marker                           | 50 bp O'Gene Ruler™, ready to use                | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
|                                      | 1 kb <sup>plus</sup> O'Gene Ruler™, ready to use | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
|                                      | λ-DNA/HindIII-Marker                             | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
| DNA-Ladepuffer                       | 6x Orange DNA Loading Dye                        | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
| Protein-Marker                       | PageRuler™ Prestained Protein Ladder             | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
|                                      | Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder     | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                                |
| <i>Nährmedien</i>                    |  |   |
|                                      | Blaumedium-Agar                                  | Labor für Nährmedien des RKI                                |
|                                      | Brain Heart Infusion (BHI) Agar / Bouillon       | SIFIN Institut für Immunpräparate u. Nährmedien-GmbH Berlin |
|                                      | Endo-Agar  | SIFIN Institut für Immunpräparate u. Nährmedien-GmbH Berlin |
|                                      | Luria Agar / Bouillon                            | SIFIN Institut für Immunpräparate u. Nährmedien-GmbH Berlin |
|                                      | Luria-Bertani Agar / Bouillon                    | SIFIN Institut für Immunpräparate u. Nährmedien-GmbH Berlin |
|                                      | Lyso-Bouillon                                    | Labor für Nährmedien des RKI                                |
|                                      | Nutrient-Agar                                    | Difco™ Voigt Global Distribution Inc. Lawrence, KS, USA     |
|                                      | Oxoid-3-Agar (Lyso)                              | Labor für Nährmedien des RKI                                |
|                                      | SOC  | Labor für Nährmedien des RKI                                |
|                                      | Sven Gard Schwärm-Agar                           | Labor für Nährmedien des RKI                                |
|                                      | T+He-Agar  | Labor für Nährmedien des RKI                                |
|                                      | Tryptic-Soy-Agar (TSA)                           | Labor für Nährmedien des RKI                                |
| <i>Zellkulturmedien und -zusätze</i> |  |   |
| PBS (Phosphate buffered saline)      | Dulbecco's PBS (10x)                             | PAA Laboratories GmbH, Cölbe                                |
| MEM (Minimal Essential Medium)       | with Earle's Salts and L-Glutamine               | PAA Laboratories GmbH, Cölbe                                |
| DMEM (Dulbecco's MEM)                | High Glucose with stable Glutamine               | PAA Laboratories GmbH, Cölbe                                |
| Accutase                             | Accutase cell detachment solution                | PAA Laboratories GmbH, Cölbe                                |
| FCS (Fetal Calf Serum)               |  |   |
| L-Glutamin                           | GlutaMAX™ (100x)                                 | Invitrogen™ / Life Technologies™ GmbH, Darmstadt            |
| <i>Sonstiges</i>                     |  |   |
| BugBuster® Master Mix                | Protein Extraction Reagent                       | Novagen   |

|                                     |   |   |
|-------------------------------------|---|---|
| Elektroporationsküvetten            | Polycarbonat, 2 mm, einzeln verpackt                      | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf               |
| Filter                              | Minisart Spritzenvorsatzfilter; 0.45 µm und 0.2 µm        | Sartorius AG, Göttingen                               |
|                                     | Membranfilter Zelluloseacetat d = 50 mm; 0.45 µm          | Sartorius AG, Göttingen                               |
|                                     | Filterpapier für Western Blot (Gel Blotting Paper 0.8 mm) | Whatman GmbH  |
| Fotometerküvetten                   | Einmalküvetten Plastibrand® Halbmikro; PMMA               | Brand GmbH, Wertheim                                  |
| Glas-Anzuchtröhrchen                |   | Schott  |
| Kryogefäße                          |   | Nalgene, Rochester, NY, USA                           |
| Mikroliterspritzen                  | 10 µl und 25 µl   | ILS GmbH, Stützerbach                                 |
| Oligonukleotid-Primer               | s. Tabelle A.1  | metabion GmbH, Martinsried ;<br>biomers.net GmbH, Ulm |
| Pipettenspitzen                     | Ep-Tips Standard, versch. Volumina                        | Eppendorf AG, Hamburg                                 |
| PVDF-Membran                        | Sequi-Blot, 0.2 µm  | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                    |
| Reaktionsgefäße                     | 1.5 ml und 2.0 ml Safe-Lock Tubes                         | Eppendorf AG, Hamburg                                 |
|                                     | PCR-Gefäße, 250 µl; 8er Streifen                          | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    |
| RNA-Isolation                       | PeqGOLD RNA Pure™   | PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen                  |
| RNA Stabilisierung                  | RNA Protect Cell Reagent                                  | Qiagen GmbH, Hilden                                   |
|                                     | RNase away  | MBP, San Diego, USA                                   |
| SDS-Gradientengele                  | Tris-SDS IDMax Gel S; 4 - 12% und 10 - 20%                | Nippon Genetics Europe GmbH, Dören                    |
| Serologische Pipetten               | 5 ml, 10 ml und 25 ml                                     | Greiner bio-one GmbH, Solingen                        |
| Zählkammer                          | Marienfeld superior Neubauer improved                     | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda<br>Königshofen   |
| Zellkulturflaschen und -<br>platten | 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> , Filter-Cap    | Nunc / Thermo Fischer Scientific,<br>Langensfeld      |
|                                     | 24-Well-Platten   | Greiner bio-one GmbH, Solingen                        |
| Zentrifugengefäße                   | Polycarbonat-Flaschen 500 ml                              | Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA               |
| Zentrifugenröhrchen                 | 15 ml und 50 ml   | Greiner bio-one GmbH, Solingen                        |

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

### 2.2.2 Chemikalien

Bei der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente kamen die in Tabelle 2.4 aufgeführten Chemikalien zum Einsatz.

| Substanz                                   | Bezeichnung   | Hersteller  |
|--|---|---|
| Acrylamid / Bisacryl                       | 30% Acrylamide / Bis Solution<br>37.5 : 1                 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                  |
| Agarose                                    | Agarose Typ II  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
|  | Top Vision Agarose  | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot                        |
| Antibiotika                                | Carbenicillin, Chloramphenicol,<br>Kanamycin, Tetracyclin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
|  | Gentamicin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
|  | Penicillin/Streptomycin (100x)                            | PAA Laboratories GmbH, Cölbe                        |
| APS (Ammoniumoersulfat)                    |   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
| Arabinose                                  | L-(+)-Arabinose   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
| β-Mercaptoethanol                          |   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
| BigDye®                                    | BigDye® Terminator 3.1 Cycle<br>Sequencing Kit            | Applied Biosystems, Darmstadt                       |
| Borsäure                                   | ≥ 99.8%   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| BSA  | Bovines Serum-Albumin                                     | PAA Laboratories GmbH, Cölbe                        |
| Coomassie R250                             | Coomassie Brillant Blau                                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| DEPC-Wasser                                | UltraPure™ DEPC-treated Water                             | Invitrogen™ / Life Technologies™ GmbH,<br>Darmstadt |
| DMSO                                       | Dimethylsulfoxid  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| EDTA (ethylenediamine<br>tetraacetic acid) | EDTA Dinatriumsalz Dihydrat                               | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| ε-Aminocaprinsäure                         |   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| Essigsäure, Eisessig                       | Essigsäure Rotipuran® 100%                                | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| Ethanol, reinst                            | Ethanol ≥ 99.5%   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| Ethidiumbromid                             | Ethidiumbromidlösung 1%                                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| Glycerol                                   | Glycerol Solution 85%                                     | Fluka / Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München          |
| Laufpuffer-Komponenten<br>(SDS-PAGE)       | Tris-Glycin-SDS Running Buffer<br>Powder (1x)             | Nippon Genetics Europe GmbH, Düren                  |
| TBS (Tris buffered saline)                 | 10x TBS-Konzentrat  | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                  |
| Magermilchpulver                           | Non-fat skimmed milk powder                               | Biomol GmbH, Hamburg                                |
| Methanol                                   | Methanol Rotipuran® ≥ 99.9%                               | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| Natriumazetat                              | Natriumazetat-Trihydrat                                   |   |
| Natriumhydroxid, NaOH                      |   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |
| PMSF (Proteaseinhibitor)                   | Phenylmethylsulfonyl Fluoride                             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                  |
| 2-Propanol, Isopropanol                    |   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                  |

|  |                                       |                                    |
|--|---------------------------------------|------------------------------------|
| Protein-Ladepuffer                     | Roti®Load1, reduzierend, 4x konz.     | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| SDS                                    | Sodium-Dodezylsulfat                  | Biomol GmbH, Hamburg               |
| TEMED                                  | Tetramethylethyldiamin                | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Trichloressigsäure                     | TCA ≥ 99%                             | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) | TRIS Ultra Qualität Pufferan* ≥ 99.9% | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Triton-X100                            |                                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Trypanblau                             |                                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Tween 80                               | Sigma Ultra                           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

**Tabelle 2.4: Chemikalien****2.2.3 Anzuchtmedien und Antibiotika**

Zur *Salmonella*-Serotypisierung wurden Endo-Agar und Sven Gard-Schwärmagar verwendet. Für die Lysotypie sowie für Transduktionsexperimente kamen Lyso-Bouillon, Oxoid-3- und Blaumedium-Agar zum Einsatz. Phagenbouillon wurde zur Anreicherung des P22-Phagen benötigt. Die Anzucht von *S. Typhimurium* und *E. coli* für molekularbiologische Untersuchungen erfolgte in Luria- oder Luria-Bertani-Medium, ggf. unter Zusatz entsprechender Antibiotika. Als Transformationsmedium wurde reichhaltiges SOC-Medium benutzt. Für Konjugationsversuche wurden T+He-Agarplatten verwendet. Die verwendeten Anzuchtmedien wurden durch Autoklavieren bei 121°C / 1 bar für 15 min. sterilisiert. Für die Herstellung von Festmedium wurden 1.5% (w/v) Agar zugesetzt. Glucose, Arabinose, Wasserblau sowie Antibiotika (steril filtriert) wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

Luria-Bouillon (LB)

1% Trypton  
 0.5% Hefeextrakt  
 0.5% Natriumchlorid  
 0.2% Glucose p.a.  
 10 mg/l Thiamin HCl  
 20 mg/l Tyrosin  
 pH 7.6

Luria-Bertani-Bouillon (LBB)

1% Trypton  
 0.5% Hefeextrakt  
 0.5% Natriumchlorid  
 pH 7.6



Lyso-Bouillon

2% Nutrient Broth (Difco™)

0.85% NaCl

Oxoid-3-Agar

2% Natrium Broth

0.85% NaCl

1.3% Agar Nr. 3

0.2% Hefeextrakt

0.1% Caseinpepton Pankreas

0.2% Bactopepton

5.0 ml/l Spurenelemente Schlösser

1.0 ml/l 0.1M CaCl<sub>2</sub>

1.0 ml/l 1.0M MgCl<sub>2</sub>

pH 7.4

Phagen-Bouillon

2% Nutrient Broth (Difco™)

0.75% NaCl

Blaumedium-Agar

1.7% Bacto-Agar (Difco™)

0.5% Bactopepton

0.5% NaCl

0.5% Hefeextrakt

0.1% Fleischextrakt

0.5% Casaminoacid

1.2% Glucose

240 mg/l Wasserblau

pH 7.3

Endo-Agar (Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar)

1.0% Endo-Agar (SIFIN)

2.4% Nutrient Agar

0.3% Fleischextrakt

0.3% Hefeextrakt

0.6% Lactose

pH 7.5

T+He-Agar (Trocken + Hefe)

Nähragar I (SIFIN)

0.2% Hefeextrakt

pH 7.3

SOC-Medium

2% Trypton

0.5% Hefeextrakt

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

10mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

20mM Glucose

pH 7.2

Die eingesetzten Antibiotika und Zusätze können aus Tabelle 2.5 entnommen werden.

| Antibiotikum / Zusatz   | Stammlösung (Lösungsmittel) | Endkonzentration |
|-------------------------|-----------------------------|------------------|
| Ampicillin (Ap; A)      | 100 mg/ml (A. bidest.)      | 100 µg/ml        |
| Carbenicillin (Carb)    | 50 mg/ml (50% Ethanol)      | 50 µg/ml         |
| Chloramphenicol (Cm; C) | 20 mg/ml (Ethanol)          | 20 µg/ml         |
| Kanamycin (Km; K)       | 50 mg/ml (A. bidest.)       | 50 µg/ml         |
| Tetracyclin (Tc; T)     | 20 mg/ml (Ethanol)          | 20 µg/ml         |
| Arabinose               | 1 M (A. bidest.)            | 10 mM            |

**Tabelle 2.5: Antibiotika und Zusätze**

### 2.2.4 Bakterienstämme

Für die epidemiologischen Fragestellungen dieser Arbeit wurden hauptsächlich humane *Salmonella* Typhimurium-Isolate verwendet, die zur Typisierung an das NRZ für Salmonellen gesandt worden waren. Ergänzend wurden auch Stämme aus anderen europäischen Staaten sowie den USA analysiert: *Luxemburg* (J. Mossong, National Health Laboratory, Luxembourg), *Belgien* (S. Bertrand, Scientific Institute of Public Health, Brüssel), *Niederlande* (M. Heck, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven), *Österreich* (Ch. Kornschöber, Austrian Agency for Health and Food Safety, Graz), *Schweiz* (H. Haechler, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Universität Zürich), *Frankreich* (F.-X. Weill, Institut Pasteur, Paris), *Spanien* (B. Guerra, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany), *Italien* (I. Luzzi, Istituto Superiore di Sanità, Rome), *England* (E. de Pinna, Salmonella Reference Unit, HPA Centre for Infections, London), *Irland* (M. Cormican, National *Salmonella* Reference Laboratory, Galway), *Dänemark* (M. Torpdahl, Statens Serum Institut, Kopenhagen), *Finnland* (A. Siitonen, National Institute for Health and Welfare, Helsinki) und *USA* (J. P. McDermott, Centre for Veterinary Medicine, U.S. Food and Drug Administration, Laurel, MD and J. Whichard, Department of Health & Human Service, CDC, Atlanta, GA).

Als Rezipient für Konjugationsexperimente wurde LB5010 verwendet, ein Abkömmling von *S. Typhimurium* LT2, der aber aufgrund einer *galE*-Mutation serologisch rau ist, als zweite Geißelphase e,n,x anstelle des Typhimurium-typischen 1,2 exprimiert und eine Tetracyclin-Resistenzkassette trägt. Durch Mutation aller drei chromosomalen Restriktions-

Modifikationssysteme ist dieser Stamm besonders als Rezipient für Konjugationsexperimente geeignet [135].

| Stamm-Bezeichnung   | Verwendung   | Herkunft / Referenz  |
|---|--|--|
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>                                     | Transformationsstamm   | Invitrogen®  |
| Monophasischer STM<br>RKI 06-01900  | Teststamm; ASSuT-resistent                                     | NRZ  |
| Monophasischer STM<br>RKI 08-05217  | Teststamm; sensitiv  | NRZ  |
| <i>S. Typhimurium</i> LT2<br>RKI 01-10141                                     | biphasischer STM-Referenzstamm,<br>sensitiv                    | GB Accession No. AE006468.1<br>überlassen von A. Eisenstark (Cancer<br>Research Center, Columbia, USA) |
| <i>S. Typhimurium</i> SL1027  | P22-Phagenanreicherung   | [136]  |
| <i>S. enterica</i> LB5010<br>WR1569   | Konjugationsrezipient  | [137]  |
| MvP818 $\Delta invC::FRT$   | SPI1-T3SS-Mutante von STM NCTC 12023;<br>Sekretionsanalyse     | [75]   |
| P2D6 <i>ssaV::mTn5</i> , Kan <sup>R</sup>                                     | SPI2-T3SS-Mutante von STM NCTC 12023;<br>Sekretionsanalyse     | [60]   |
| WRG 107 (11/22), $\Delta invC::FRT$ ,<br><i>ssaV::mTn5</i> , Kan <sup>R</sup> | Doppelmutante von STM NCTC 12023;<br>Sekretionsanalyse         | K. Blank, unveröffentlicht   |
| MvP1213 $\Delta flil$   | Flagella-T3SS-Mutante von STM NCTC 12023;<br>Sekretionsanalyse | M. Hensel, unveröffentlicht  |
| MvP919 $\Delta SPI6::aph$   | SPI6-T6SS-Mutante von STM NCTC 12023;<br>Sekretionsanalyse     | [75]   |

**Tabelle 2.6: Bakterienstämme**

In der nachfolgenden Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Insel-Mutanten aufgeführt.

| WR-Nr.  | Genotyp  | AB-Resistenz       | Bemerkungen   |
|---------|--|--------------------|---|
| WR 2039 | 08-05217 $\Delta thrW$ -Insel:: <i>aph</i>                     | Km                 | Austausch der Insel gegen die Km-Kassette                   |
| WR 2073 | 06-01900 $\Delta thrW$ -Insel:: <i>aph</i><br>(P22HT(WR 2039)) | Ap, Km, Su, Sm, Tc | Transduktion der Km-Kassette,<br>dadurch Deletion der Insel |
| WR 2076 | 08-05217 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17</sub> :: <i>cat</i> ) | Cm                 | Cm-Markierung der Insel                                     |

|         |  |                    |  |
|---------|--|--------------------|--|
| WR 2077 | STM LT2 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17::cat</sub> )<br>(P22HT(WR 2076))       | Cm                 | Transduktion der Cm-markierten Insel in WT-STM                 |
| WR 2078 | STM A36 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17::cat</sub> )<br>(P22HT(WR 2076))       | Cm                 | Transduktion der Cm-markierten Insel in WT-STM                 |
| WR 2079 | STM ATCC14028 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17::cat</sub> )<br>(P22HT(WR 2076)) | Cm                 | Transduktion der Cm-markierten Insel in WT-STM                 |
| WR 2080 | STM SL1344 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17::cat</sub> )<br>(P22HT(WR 2076))    | Cm                 | Transduktion der Cm-markierten Insel in WT-STM                 |
| WR 2081 | 06-01900 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17::cat</sub> )<br>(P22HT(WR 2076))      | Ap, Cm, Su, Sm, Tc | Austausch der unmarkierten gegen die Cm-markierte Insel        |
| WR 2106 | 06-01900 $\Delta$ <i>thrW</i> -Insel::FRT                                      | Ap, Su, Sm, Tc     | Km-Kassette aus WR 2073 mit pCP20 entfernt                     |
| WR 2107 | WR 2073 ( <i>thrW</i> -Insel <sub>ORF17::cat</sub> )<br>(P22HT(WR 2076))       | Ap, Cm, Su, Sm, Tc | Transduktion der Cm-Insel in die Deletionsmutante → Revertante |
| WR 2130 | WR 1569 x WR 2077  | Cm, Tc             | Insel-Transkonjugante  |

Tabelle 2.7: Relevante Insel-Mutanten

### 2.2.5 Eukaryotische Zelllinien

Für Infektionsversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 (ATCC® Nummer: TIB-71™) sowie die canine Nierenepithel-Zelllinie MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) verwendet. Letztere wurde im Labor von Prof. Dr. M. Goppelt-Strube am Universitätsklinikum Erlangen-Nürnberg etabliert.

### 2.2.6 Oligonukleotide

Sequenzen, Verwendungszweck und Quellen/Referenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle A.1 im Anhang zusammengefasst. Sie wurden von den Firmen Metabion GmbH (Martinsried) sowie biomers.net GmbH (Ulm) bezogen. Standard-PCR-Primer wurden entsalzt, Klonierungsprimer HPLC-gereinigt eingesetzt. Die Lagerung erfolgte in bei -20°C in einer Konzentration von 10 pmol / µl in *A. bidest*.

### 2.2.7 Plasmide und Vektoren

Eine Übersicht über die hergestellten und verwendeten Plasmide und Vektoren gibt Tabelle 2.8.

| Bezeichnung | Konstrukt           | Verwendung  | Resistenzmarker | Herkunft / Referenz       |
|-------------|---------------------|---|-----------------|---------------------------|
| pKD46       |                     | induzierbare $\lambda$ -red Rekombinase; red swap recombination             | Ap              | [138]                     |
| pKD3        |                     | Cm-Kassette, flankiert von FRT-sites; red swap recombination                | Cm              | [138]                     |
| pKD4        |                     | Km-Kassette, flankiert von FRT-sites; red swap recombination                | Km              | [138]                     |
| pCP20       |                     | FLP-Rekombinase zum Entfernen der Resistenzkassette; red swap recombination | Ap, Cm          | [138]                     |
| pBAD24      |                     | arabinose-induzierbare Expression   | Ap              | [139]                     |
| pMA         | ORF6-HA             | Klonierungsvektor für getaggte Leserahmen                                   | Ap              | GeneArt® Plasmid Services |
| pMA         | ORF7-HA             | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pMA         | ORF8-FLAG           | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pMA         | ORF10-HA            | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pMA         | ORF11-FLAG          | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pMK-RQ      | ORF12-HA            | dto.  | Km              | dto.                      |
| pMA         | ORF13-HA            | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pMA         | ORF15-HA            | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST01       | pBAD24 / ORF4-FLAG  | arabinose-induzierbare Expression des getaggtten Leserahmens                | Ap              | diese Arbeit              |
| pST02       | pBAD24 / ORF6-HA    | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST03       | pBAD24 / ORF7-HA    | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST04       | pBAD24 / ORF8-FLAG  | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST05       | pBAD24 / ORF10-HA   | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST06       | pBAD24 / ORF11-FLAG | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST07       | pBAD24 / ORF12-HA   | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST08       | pBAD24 / ORF13-HA   | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST09       | pBAD24 / ORF15-HA   | dto.  | Ap              | dto.                      |
| pST10       | pBAD24 / ORF3a-HA   | dto.  | Ap              | dto.                      |

|       |                                |   |    |      |
|-------|--------------------------------|---|----|------|
| pST11 | pBAD24 / ORF9a-FLAG            | dto.  | Ap | dto. |
| pST12 | pBAD24 / ORF10-3xFLAG          | dto.  | Ap | dto. |
| pST13 | pBAD24 / ORF10-3xFLAG AS16-246 | arabinose-induzierbare Expression des getaggtten und verkürzten Leserahmens | Ap | dto. |
| pST13 | pBAD24 / ORF10-3xFLAG AS26-246 | dto.  | Ap | dto. |

Tabelle 2.8: Plasmide und Vektoren

## 2.3 Phenotypische und genotypische Charakterisierung

### 2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung

Die Anzucht von *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* erfolgte aerob bei 37°C auf Agarplatten im Brutschrank oder in Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator (100-150 rpm), ggf. unter Zugabe von Antibiotika. Transformierte Stämme, die temperatur-sensitive Plasmide trugen, wurden bei 28°C kultiviert; sollte der betreffende Stamm von dem Plasmid gereinigt werden, erfolgte die Inkubation bei 42°C. Beimpfte Agarplatten wurden max. 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt und höchstens einmal überimpft, um die Selektion spontaner Mutanten zu minimieren. Zur Langzeitlagerung wurden 6h bebrütete Flüssigkulturen der Isolate in 20% (v/v) steriler Glycerol-Lösung bei -80°C eingefroren.

### 2.3.2 Serotypie

Alle eingesandten *Salmonella*-Isolate wurden zur Reinheitskontrolle auf geeigneten Selektiv-Nährboden (Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar) ausgebracht und die O- und H-Antigene durch Objektträger-Agglutination mit den entsprechenden Antiseren bestimmt. Zur Detektion der 2. Geißelphase wurde auf Sven Gard-Schwärmagar, dem Antiserum gegen die bereits nachgewiesene 1. Geißelphase zugesetzt wurde, ein Phasenwechsel induziert. Schwärmte ein Stamm auf diesem Agar nicht, wurde er in ein U-Röhrchen, das semi-solides Medium sowie ebenfalls Anti-H1-Serum enthielt, überimpft und bis zu 7 Tage bei 37°C bebrütet. Bei durchschwärmten U-Röhrchen und erfolgreichem Nachweis der 2. Geißelphase wurde die komplette Seroformel erstellt. War das Isolat nach sieben Tagen nicht durch das U-Röhrchen geschwärmt, wurde es als monophasisch eingestuft.

### 2.3.3 Lysotypie

Einige *Salmonella*-Serovare, darunter die beiden am häufigsten vorkommenden *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, lassen sich mittels Lysotypie weiter differenzieren. Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Empfindlichkeit von *Salmonella*-Isolaten gegenüber definierten Phagen und ist insbesondere bei Ausbruchsuntersuchungen und anderen epidemiologischen Fragestellungen ein wertvolles Hilfsmittel. Für *S. Typhimurium* erfolgte die Lysotyp-Bestimmung anhand des erweiterten Anderson-Phagensets nach den Richtlinien der IFEPT (International Federation for Enteric Phage Typing, Colindale, London). Alle Phagen eines Sets wurden dazu in die Kavitäten einer Matritze gefüllt und mittels eines mit Platinösen besetzten Stempels auf Oxoid-3-Agarplatten aufgetropft, die zuvor mit einer 2-Stunden-Bouillon-Kultur des zu testenden *Salmonella*-Stammes abgeschwemmt worden waren. Nach Über-Nacht-Inkubation bei 37°C wurden die Platten am Lichtmikroskop ausgelesen und anhand des Lysisbildes der Lysotyp bestimmt [140].

### 2.3.4 Resistenzbestimmung

Alle *Salmonella*-Isolate wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber folgenden antimikrobiellen Substanzen getestet: Ampicillin (A), Cefotaxim (Ct), Gentamicin (G), Kanamycin (K), Streptomycin (S), Chloramphenicol (C), Oxytetracycline (T), Sulphonamide (Su), Nalidixinsäure (Nx), Ciprofloxacin (Cp) und Trimethoprim (Tp). Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) wurden mittels Bouillon-Mikroverdünnung entsprechend dem deutschen DIN-Standard 58940 zur „Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika“ (Deutsches Institut für Normung, 2004) bestimmt. Die Zuordnung zu den drei Kategorien „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ erfolgte nach der weltweit gültigen ISO 20776-1.

### 2.3.5 Multilocus-Sequenztypisierung (MLST)

Das Verfahren der Multilocus-Sequenztypisierung [141] als Werkzeug der molekularen Langzeit-Epidemiologie wird für viele Bakterienspezies angewendet. Es beruht auf der Amplifizierung und nachfolgenden Sequenzierung von sieben bis neun über das Genom verteilten Haushaltsgenen. Diese Gene sind sehr konserviert, im Laufe der Zeit haben sich jedoch verschiedene Allel-Varianten herausgebildet, die sich in einem oder mehreren Nukleotiden unterscheiden. Aus der Kombination der Allel-Typen der Einzelgene ergibt sich

für jedes untersuchte Isolat ein definierter Sequenztyp (ST). Anhand der Allel-Profile kann man verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Vertretern einer Spezies ableiten. Isolate eines Sequenztyps sind aus einem einzigen Klon hervorgegangen. Auch Stämme, die sich in nur einem Allel unterscheiden, sind noch sehr nahe verwandt und stammen höchstwahrscheinlich von einem gemeinsamen Ursprungsisolat ab. Die phylogenetischen Beziehungen dieser klonalen Komplexe können in einem Dendrogramm dargestellt werden und geben so Aufschluss über die evolutionäre Entwicklung einer Spezies. Das *Salmonella enterica* MLST-Schema umfasst die folgenden sieben Gene:

*thrA* (Aspartokinase / Homoserin-Dehydrogenase)  
*purE* (Phosphoribosyl-Aminoimidazol-Carboxylase)  
*sucA* (Alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase)  
*hisD* (Histidinol-Dehydrogenase)  
*aroC* (Chorismat-Synthase)  
*hemD* (Uroporphyrinogen III-Cosynthase)  
*dnaN* (DNA-Polymerase III Beta-Untereinheit)

Die vollständigen MLST-Typisierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Mark Achtman am Environmental Research Institute des University College Cork (Irland) durchgeführt und die Sequenztypen in der ebenfalls an diesem Institut erstellten MLST-Datenbank für *Salmonella enterica* hinterlegt [142]. Zur Unterscheidung der Sequenz-Typen ST19 und ST34 wurde das *dnaN*-Allel für vier weitere Stämme selbst amplifiziert und anschließend sequenziert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Nukleinsäure-Extraktion, -Reinigung und -Amplifikation

#### 2.4.1.1 DNA-Präparation

Für konventionelle PCR-Ansätze wurde eine Bakterienkolonie in 150 µl steriles *A. bidest.* eingerieben und fünf Minuten bei 95°C erhitzt, was zur Zerstörung der Zellmembranen und damit zum Freiwerden genetischen Materials führt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm zur Sedimentation der Zelltrümmer wurden 3 µl des Überstandes als PCR-Template eingesetzt. Für die Amplifikation besonders langer DNA-Fragmente (> 10 kb) sowie für Untersuchungen, die besonders reine DNA erforderten (z. B. Sequenzanalysen), wurde die chromosomale DNA mit dem DNeasy® Blood and Tissue Kit von QIAGEN® nach den



Instruktionen des Herstellers isoliert. Plasmid-DNA wurde mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Fermentas gewonnen, die Präparation erfolgte ebenfalls nach Herstellerangabe.

#### **2.4.1.2 RNA-Präparation und Reinigung**

Je 0.5 ml einer Stationäre-Phase-Kultur ( $OD_{600}$  ca. 2.0) wurde mit 1.0 ml RNAProtect Bacteria Reagent (QIAGEN®) versehen, um die RNA zu stabilisieren. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben 5 min bei  $5.000 \times g$  pelletiert. Anschließend wurde ein Lysozym-Verdau durchgeführt, um die Zellwand zu zerstören (4 mg/ml Hühnereiweiß-Lysozym in TE-Puffer, pH 8.0). Schließlich wurde die RNA m. H. des pegGOLD RNAPure™ Reagenz von PEQLAB nach Herstellerangabe extrahiert. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Vorfeld der RT-PCR erfolgte ein DNase-Verdau mit TURBO™ DNase (Applied Biosystems) unter Zugabe von RNase OUT™, einem rekombinanten Ribonuklease-Inhibitor von Invitrogen. (1 µg RNA, je 1 µl 10x Puffer, TURBO DNase und RNase out; mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt). Nach einstündiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde das Enzym 10 min bei  $75^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Die DNase-behandelten Proben wurden nicht mehr eingefroren, sondern direkt für die RT-PCR-Ansätze verwendet.

#### **2.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte spektralphotometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm am BioPhotometer plus (Eppendorf) unter Verwendung von Mikromesszellen (Hellma® TrayCell) mit Berücksichtigung der virtuellen Verdünnung durch Verkürzung der Schichtdicke (Lid-Faktor). Die Nukleinsäurekonzentration sowie der Absorptionskoeffizient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  als Maß für die Reinheit der präparierten DNA / RNA wurden von der Gerätesoftware automatisch berechnet.

#### **2.4.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR-Amplifikationen wurden im 2720 Thermal Cycler von Applied Biosystems durchgeführt. Die 10 µl-Reaktionsansätze für eine konventionelle PCR enthielten 5 µl HotStarTaq Master Mix<sup>Plus</sup> von QIAGEN® (mit Ladepuffer), je 1 µl Sense- und Antisense-Primer (Konz. 10 pmol / µl) sowie 3 µl Template. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt. Die Annealing- und Elongationsbedingungen wurden den verwendeten Primern und der Größe des erwarteten Produktes angepasst.

PCR-Reaktionen für nachfolgende Sequenzanalysen wurden mit HotStarTaq Master Mix<sup>plus</sup> ohne Ladepuffer angesetzt. Das 50 µl Reaktionsvolumen enthielt 25 µl Enzym-Mix, je 2.5 µl Sense- und Antisense-Primer (Konz. 10 pmol / µl), 5µl Template und 15 µl *A. bidest.* Für die PCR-Kontrolle wurden 3 µl amplifizierter DNA entnommen und mit 2 µl *A. bidest.* sowie 1 µl 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) auf ein entsprechendes Agarosegel aufgetragen. Sollten die PCR-Produkte nachfolgend für Transformations-, Rekombinations- oder Klonierungsexperimente verwendet werden, erfolgte die Amplifikation mit dem High Fidelity PCR Master von Roche Diagnostics nach Anweisung des Herstellers. Die Long Template-PCR zum Nachweis des 18.4 kb Produktes nächst dem *thrW* tRNA-Locus wurde mit dem Expand 20 kb<sup>plus</sup> PCR System von Roche Diagnostics nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.4.1.5 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR-Reaktionen wurden ebenfalls im 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurde der QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit, der sowohl die Reverse Transkriptase zum Umschreiben der RNA in cDNA als auch die Polymerase zur Amplifizierung der cDNA sowie alle nötigen Zusätze (Puffer, dNTPs, etc.) enthält, nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Cycler-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: reverse Transkription für 30 min bei 50°C, anschließend ein initialer Denaturierungs-Schritt für 15 min bei 95°C, gefolgt von 30 Amplifikationszyklen (Denaturierung: 95°C für 40 sec, Annealing bei 50°C für 40 sec und Elongation bei 72°C für 1 min) und einer finalen Elongation von 5 min. Das Transkript der konstitutiv exprimierten DNA-Gyrase Untereinheit A (*gyrA*) diene als positive Kontrolle. Um Verunreinigungen mit chromosomaler DNA auszuschließen, wurde stets ein *gyrA*-Ansatz mitgeführt, bei dem keine reverse Transkription stattfand. Dazu wurde das Reaktionsgefäß erst nach Ablauf des 30 minütigen RT-Schrittes in den Cycler gestellt.

#### 2.4.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurde i. d. R. Typ II-Agarose verwendet, die im entsprechenden Volumen (100 ml für ein 12 x 14 cm Gel, 50 ml für ein 9 x 11 cm Gel) 0.7x TBE-Puffer mit 15 µl /L 1%igem Ethidiumbromid (EtBr) gelöst wurde. Die Agarose-Konzentration betrug 1 – 2%, abhängig von der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente, als Laufpuffer wurde ebenfalls 0.7x TBE-Puffer mit EtBr verwendet. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte bei 120 Volt für 90 min. Wurde der HotStarTaq Master Mix<sup>plus</sup>

verwendet, war keine Zugabe von Ladepuffer erforderlich, da dieser bereits im Vorfeld dem Enzym-Mix zugesetzt wurde. Für PCR-Produkte, deren Banden anschließend aus dem Gel extrahiert werden sollten, wurde TopVision-Agarose verwendet, Gele und Laufpuffer (1x TAE) enthielten hier kein Ethidiumbromid, sondern wurden im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung kurz im EtBr-Bad gefärbt. Als Standard wurden je nach Produktgröße 3 µl eines der folgenden Marker verwendet: O'Range Ruler™ 50bp DNA Ladder; O'GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (beide Fermentas). Die Agarosegele wurden abschließend am UV-Spektrometer (BioRad) analysiert.

#### 2.4.1.7 Reinigung von PCR-Produkten

Für die weitere Verwendung der amplifizierten DNA-Fragmente war es notwendig, diese von überschüssigen dNTPs, Salzen und Puffern zu reinigen. Dieser Schritt erfolgte entweder direkt aus dem Reaktionsansatz oder durch Gel-Extraktion jeweils mit dem NucleoSpin Extract II-Kit von Macherey & Nagel nach den entsprechenden Herstellerprotokollen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in 30 µl *A. bidest.* eluiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.2 DNA Sequenzierung

Die Shotgun-Sequenzierung und Assemblierung des 20 kb großen Amplikons, das nächst der *thrW* tRNA-Stelle im monophasischen *S. Typhimurium*-Stamm RKI-Nr. 06-01900 detektiert wurde, erfolgte mittels GS20-Technologie durch die Eurofins MWG GmbH, Ebersberg. Gereinigte PCR-Produkte wurden im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts am ABI Prism® 377 DNA Sequencer (Amersham) analysiert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach dem Prinzip des Didesoxynukleotid-Kettenabbruchverfahrens nach Sanger [143]. Die Sequenzieransätze mit einem Endvolumen von 10 µl setzten sich wie folgt zusammen: 10-20 ng gereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl Primer (10 pmol / µl), 1 µl BigDye 3.1-Premix, ad 10 µl *A. bidest.*

##### Cycler-Programm:

|   |             |
|---|-------------|
| 96 °C für 30 sec initiale Denaturierung |             |
| 96 °C für 10 sec Denaturierung          | } 25 Zyklen |
| 50 °C für 5 sec Primerannealing         |             |
| 60 °C für 4 min Elongation              |             |
| 60 °C für 5 min. finale Elongation      |             |

Bis zur Sequenzierung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen LaserGen 8.0 und DS Gene 1.5. Die Nukleotidsequenz des 18.4 kb Fragmentes nächst dem *thrW* tRNA-Locus in *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- (RKI 06-01900) wurde unter der Accession Number GQ478253 in der GenBank Datenbank hinterlegt.

### **2.4.3 Herstellen elektrokompenter Zellen und Elektroporation**

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes (*S. Typhimurium* oder *E. coli*) in 5 ml LB-Medium ohne Zusätze eingepflegt und ü.N. bei 37°C im Schüttelinkubator (150 rpm) bebrütet. Am nächsten Morgen wurde 500 µl dieser Vorkultur in 50 ml frisches Medium überführt und weitere 2 – 3h bei 37°C inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6 – 0.8 wurden die Subkulturen in Zentrifugenröhrchen überführt 15 min. quellen lassen, bevor sie 10 min. bei 4°C und 7.000 x g zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde dann im gleichen Volumen eiskalten *A. bidest.* resuspendiert und wiederum 15 min. quellen lassen, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min. bei 4°C und 7.000 x g. Dieser Vorgang wurde mit ½ Volumen (25 ml / Röhrchen) *A. bidest.* wiederholt. Abschließend wurde das Sediment in 1/100 des Ausgangsvolumens (0.5 ml) eiskaltem 10%igen Glycerin (in *A. bidest.*) aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden nun entweder direkt zur Elektroporation benutzt oder in Aliquots á 100 µl bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 50 – 500 ng des zu übertragenden Plasmids bzw. linearen DNA-Fragmentes auf Eis in eine 0.2 cm Elektroporationsküvette vorgelegt und 45 µl elektrokompente Bakterienzellen zugegeben. Die Elektroporation erfolgte mit dem Programm Ec2 (2.5 kV) am MicroPulser™ (BioRad). Die transformierten Zellen wurden sofort in 1 ml eiskaltes SOC-Medium überführt, für 1h bei 37°C (28°C bei temperatur-sensitiven Plasmiden) im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert und abschließend auf Selektivnährböden ausplattiert.

#### 2.4.4 Deletion der 18.4 kb Insel

Um Rückschlüsse auf Funktion der *thrW*-Insertion ziehen zu können, wurde das 18.4 kb Gesamtfragment nach der Methode von Datsenko und Wanner [138] deletiert. Dabei wird durch  $\lambda$  Red-vermittelte homologe Rekombination das zu deletierende Element gegen eine Resistenzkassette ausgetauscht. Für diese Methode konnte der Stamm RKI 06-01900 nicht verwendet werden, da er eine natürliche Ampicillin-Resistenz besitzt. Daher wurden die Versuche mit dem Isolat RKI 08-05217 durchgeführt. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen monophasischen *S. Typhimurium*-Stamm des Lysotyps DT193, der aber sensitiv gegenüber den getesteten Antibiotika ist. Dieser Stamm, zunächst elektrokompent gemacht, wurde mit dem  $\lambda$  Red-exprimierenden pKD46-Plasmid ( $Ap^R$ ) transformiert und Plasmid-tragende Klone auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g / ml Carbenicillin (Ampicillin-Analog) selektiert. Die Rekombinase steht dabei unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors. Da es sich bei pKD46 um ein temperatur-sensitives Plasmid handelt, wurden alle Schritte bis zur erfolgreichen Rekombination bei 28°C durchgeführt. Parallel dazu wurde die durch FRT (*FLP recognition target*)-Sequenzen flankierte Kanamycin-Resistenzkassette des Vektors pKD4 amplifiziert. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass das lineare Produkt an beiden Enden homologe Bereiche zu den an die zu deletierende Sequenz angrenzenden Genen trägt (H1 und H2), was die Rekombination ermöglicht. Nach Induktion der  $\lambda$  Red-Rekombinase mit 10 mM Arabinose und Transformation des gereinigten pKD4-Produktes in 08-05217 konnte der Austausch der Insel gegen die Kanamycin-Kassette erfolgen. Die Selektion rekombinanter Klone erfolgte auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g / ml Kanamycin ü. N. bei 37°C. Bei dieser Temperatur wurden die Mutanten zugleich vom pKD46-Plasmid gecured. Die Kolonien wurden mittels PCR auf die Abwesenheit der 18.4 kb Insel und das Vorhandensein der Kanamycin-Kassette getestet. Optional ist es möglich, nach erfolgter Selektion die Resistenzkassette m. H. des pCP20-Plasmids, das eine FLP-Rekombinase exprimiert, zu eliminieren. Zurück bleibt dann nur die 86 bp-Narbe einer FRT-Site. pCP20 ist ebenfalls ein temperatur-sensitives Plasmid, das durch Inkubation bei 42°C einfach eliminiert werden kann. Um die Mutanten auch in den Folgeexperimenten selektieren zu können, wurde zu diesem Zeitpunkt auf das Entfernen der Resistenzkassette verzichtet. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht das Prinzip der beschriebenen Deletionsmethode.

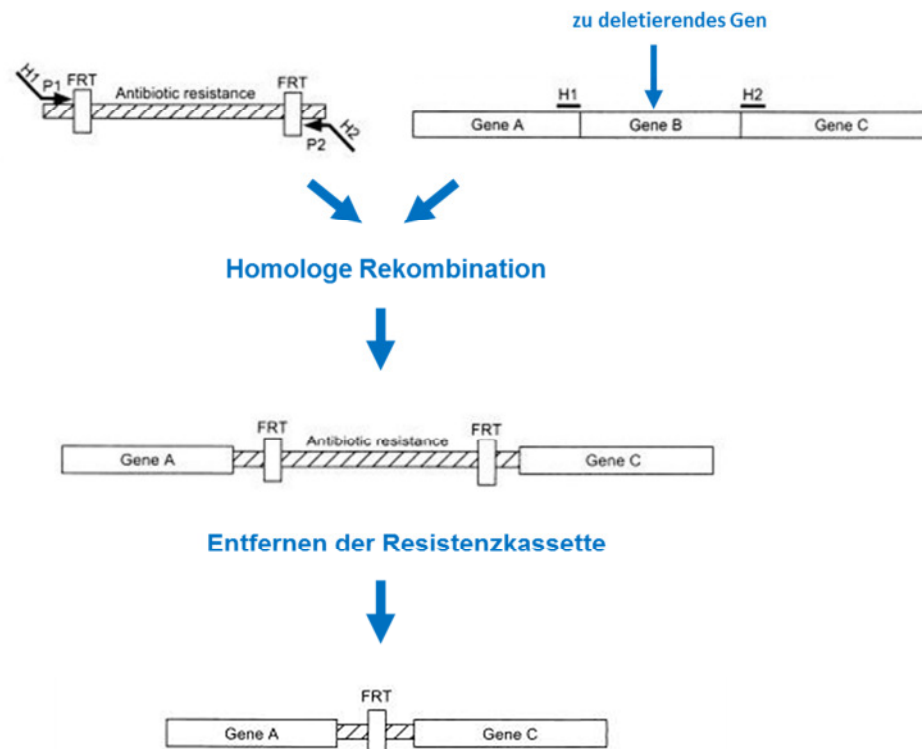


Abbildung 2.1: One-Step-Deletion nach Datsenko & Wanner [138]

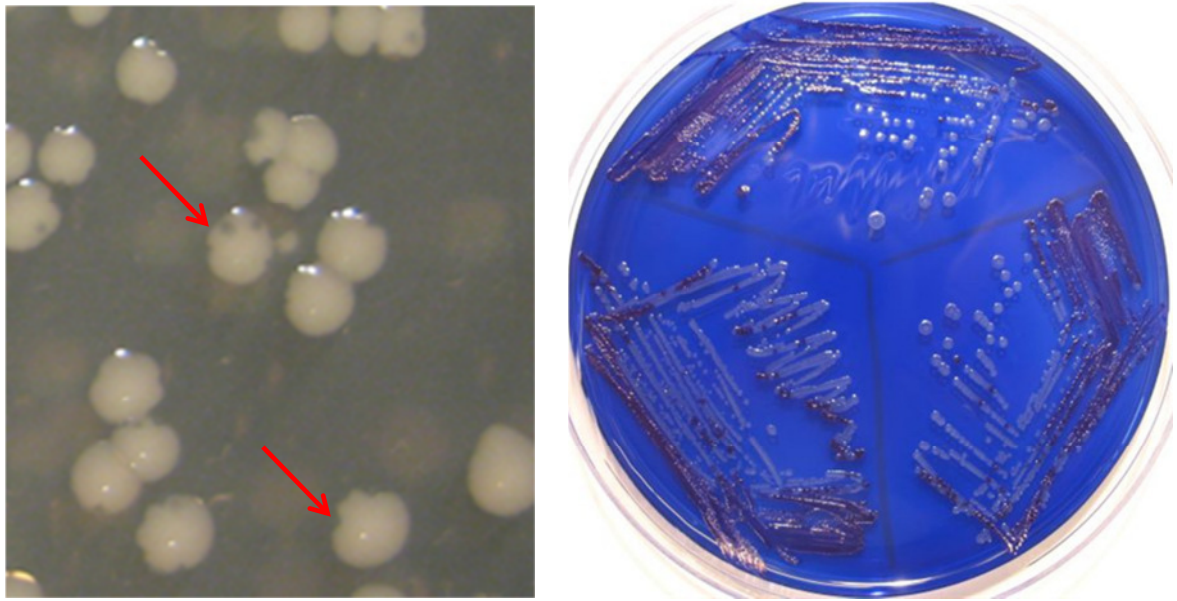
#### 2.4.5 Übertragung der Resistenz-Kassette durch Transduktion

Transduktion ist eine Form des horizontalen Gentransfers die es erlaubt, genomische DNA mittels Bakteriophagen von einem Bakterienstamm auf einen anderen zu übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode benutzt, um Mutationen, die mit Hilfe der Datsenko und Wanner-Methode generiert wurden, zwischen *S. Typhimurium*-Stämmen zu übertragen. Transduzierender Phage war dabei P22, ein temperenter Phage, der *Salmonella* durch Bindung an das O-Antigen infiziert und im lysogenen Zyklus als Prophage in das Wirtsgenom integrieren kann. Während des lytischen Zyklus dagegen wird die Phagen-DNA nach dem rolling-circle-Prinzip repliziert und beginnend an der sog. *pac*-site von einer Phagen-Nuklease in 48 kb große Fragmente geschnitten. Diese werden dann im Capsid verpackt und nach dem Phagen-Assembly und der Lyse der Wirtszelle auf das nächste Bakterium übertragen. Auf dem *Salmonella*-Chromosom gibt es Sequenzen, die denen der P22 *pac*-site entsprechen, der Stelle im Phagengenom, die das Verpacken der viralen DNA in das Capsid initiiert. Wenn P22 eine *Salmonella* infiziert hat, kommt es gelegentlich vor, dass die P22-Nuklease anstelle der Phagen-DNA das Bakteriengenom an einer solchen Stelle schneidet, was dazu führt, dass statt des Virusgenoms ca. 48 kb chromosomale DNA des

Wirtsbakteriums im Phagenkopf verpackt werden. Diese transduzierenden Partikel können nun die aufgenommene DNA in eine neue Wirtszelle injizieren, wo sie über homologe Rekombination in das Genom integriert werden kann. P22 ist in der Lage, DNA aller chromosomalen Bereiche zu übertragen, weshalb dieser Vorgang als generalisierte Transduktion bezeichnet [144,145] wird. Die hier verwendete P22 HT105/1-Mutante weist zudem zwei Besonderheiten auf, die sie besonders geeignet für Transduktionsexperimente machen. Zum einen trägt sie eine Mutation im Integrase-Gen (*int-201*), was die Bildung stabiler Lysogene verhindert, andererseits besitzt die Phagen-Nuklease nur eine geringe Spezifität für die *pac*-Sequenz, was dazu führt, dass ca. 50% aller Phagenköpfe zufällig geschnittene chromosomale *Salmonella*-DNA enthalten [146].

Für den Austausch der 18.4 kb Insertion gegen die  $Km^R$ -Kassette durch Transduktion mußte zunächst der Donorstamm WR 2039 (08-05217( $\Delta$ thrW::*aph*)) mit P22 HT105/1 lysiert werden, was zum zufälligen Verpacken von Wirts-DNA-Fragmenten in P22 HT-Capside führen sollte. Dazu wurde 1 ml ü. N.-Kultur des Donorstammes mit 4 ml P22-Bouillon (Phagenbouillon + 30 µl / ml P22 HT-Konzentrat) wiederum ü. N. bei 37°C geschüttelt. Das Lysat wurde anschließend durch einen 0.2 µm Millipore-Filter in sterile Eppendorf-Caps filtriert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Rezipientenstämme wurden ebenfalls ü. N. in 1 ml Bouillon angezogen, am nächsten Morgen in sterile Eppendorf-Caps überführt und mit 100 µl Phagenlysate versetzt. Die Inkubation erfolgte für 15 min. bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf). Das Gemisch wurde anschließend 5 min. bei 11.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 30 µl LB-Medium aufgenommen und auf Selektivplatten ausplattiert, die ü. N. bei 37°C bebrütet wurden.

Wurde das gewünschte DNA-Fragment erfolgreich in das Rezipientengenom integriert, muss der betreffende Stamm von freien Phagen gereinigt werden, da der Kontakt mit lytischen Phagen eine starke Selektion auf *int*-Revertanten bewirkt, was zur Herausbildung stabiler Lysogene führen würde. Diese wären für weitere Transduktionsexperimente unbrauchbar, weil sie nicht mehr mit P22 reinfiziert werden könnten. Zudem würde der genetische Hintergrund des Rezipienten durch einen integrierten Prophagen verändert. Zur Reinigung der Transduktanten von lytischen Phagen werden einzelne Kolonien von der Selektivplatte auf Blaumedium-Agar ausgestrichen und ü. N. bei 37°C bebrütet. Sind die gewachsenen Kolonien phagenfrei, stellen sich weiß dar, sind sie dagegen blau, handelt es sich um Lysogene.



**Abbildung 2.2: Transduktanten mit lytischen (links) bzw. lysogenen (rechts) Phagen**

Die Transduktanten können mit Hilfe des Phagen P22 H5 auf Lysogene überprüft werden. P22 H5 ist repressor-negativ, d. h. die Gene zum Eintritt in den lytischen Zyklus können nicht mehr unterdrückt werden, was dazu führt, dass keine Lysogene gebildet werden können. Dieser Phage ist in der Lage, phagenfreie (sensitive) Kolonien zu lysieren, während solche mit integriertem Prophagen resistent sind und nicht durch P22 H5 superinfiziert werden können [146]. Für den Sensitivitätstest wurden 20 µl P22 H5-Lysat oben mittig auf eine Blauplatte pipettiert; der Tropfen lief durch Schrägstellen der Platte als Streifen senkrecht nach unten. Nachdem der Phage getrocknet war, wurden die zu testenden Kolonien mit einem Stäbchen in einer Linie quer durch den P22 H5-Streifen gezogen. Sensible Kolonien wuchsen nur bis zum Phagenstreifen, resistente wuchsen auch dahinter weiter. Abschließend wurden die sensitiven Kolonien mittels PCR auf erfolgreiche Transduktion (Insel-negativ; Km<sup>R</sup>) und Phagenfreiheit (*pac*-negativ) getestet.

#### **2.4.6 Epitopmarkierung einzelner Leserahmen der 18.4 kb Insel**

Um die Expression der Genprodukte ausgewählter Leserahmen im Westernblot mit kommerziellen Antikörpern nachweisen zu können, wurden die ORF-Sequenzen carboxy-terminal Epitop-Tags versehen. Die Markierung erfolgte mittels PCR, anschließend wurde die getaggte ORF-Sequenz in einen Expressions-Vektor kloniert. Bei dieser Tagging-Methode



wurde der gesamte ORF amplifiziert, wobei die Primer zusätzlich die Tag-Sequenz sowie die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung enthielten. Diese Methode wurde auf die Leserahmen 3a (Hämagglutinin-Tag), 9a (1xFLAG) und 10 (Hämagglutinin bzw. 3xFLAG) angewendet. Abbildung 2.3 zeigt die Sequenz des ORF 10::3xFLAG PCR-Produktes mit angefügten Restriktionsschnittstellen. Die Primersequenzen wurden unterstrichen. Das gereinigte PCR-Produkt konnte im Anschluss mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den ausgewählten Vektor pBAD24 kloniert werden (s. 2.4.8)

#### EcoRI-ORF10-3xFLAG-XbaI:

```
5' GAATTCTAATGAACAATAACTATTGCATACCGCAGGGAATGACCAGAACGGAGCGCGAAGAATTAAGTTTCGC
TACACAGTGCGGGAATGCTGGCGACATCCAAAGTCTGGAACGCACTTTAATTATGATTGCGCACTGGATGCGTCAGGG
GCAAAGGGTTTCATTTACTGAATATGCCAGCCAGTGGACAGAGGCACAGCGCAACGGAGCGACGGTAATCACTCAA
CACCCGAAATGGCGAAGCAATGGCCTTTCAGTGGTAAACGCTGTATCAGTCCCGTGGTTCAGATTATTACCCTGCTG
GTGTGGGAGATGAGCCATGTTGTGACGAGACTGAAATCCGCCACGCAGTGACAGTAATTACCGCTGAATACCCACAA
TTTAACCTTGACGGACTGGCGCTCCACAACCGGAATGCGGACTGGGAAAACCGCTTGATAACCCGTCAATTTATCGTAT
CGGCGAAAAGCTGCCTGAGATGGATCAGAGACAACGGGATGAGTAATGCCAGATTGAGAGCTTCCCGCAGGATAA
CCCCACATCTGACACGTTGAAGCATGAAGTGGAGCGATATAACCAGATAAACCACCAGCACAGTGATCACCCGCACTA
TATCCCAACGGAGCATTTATTGCGGCGATGGTGGCAAGCGGCTACAAGGTTAAGCCAGCGGGAAGAATGAACGCAT
TTTTCAATATTTCAAAAAAAGGATTATGTGCTGCTATGGGTAAAAAT GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAG
ATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGTAATAA TCTAGA 3'
```

**Abbildung 2.3: Sequenz des 3xFLAG-getaggten ORF 10 zur Klonierung**

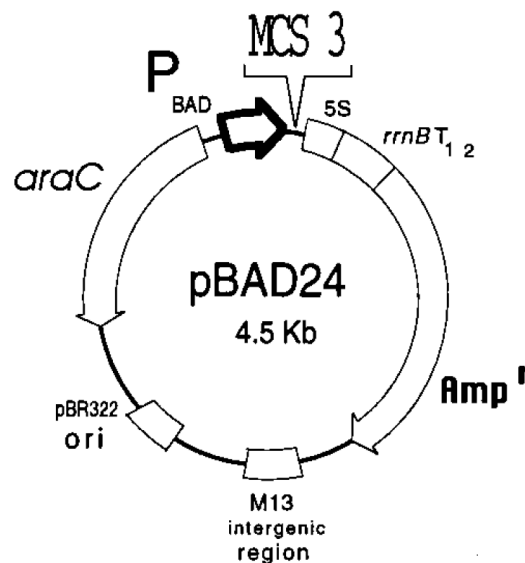
#### 2.4.7 N-terminale Verkürzung von ORF10

Für nachfolgende Untersuchungen zur Sekretion des ORF 10-Produktes sollte dieses N-terminal um 15 bzw. 25 Aminosäuren verkürzt werden. Dabei wurde prinzipiell wie im letzten Abschnitt beschrieben vorgegangen, allerdings wurden die Vorwärts-Primer so gewählt, dass die auf das Startcodon folgenden 15 bzw. 25 Basentriplets deletiert wurden. Die verkürzten Leserahmen wurden 3xFLAG-markiert (Abbildung A.4).

#### 2.4.8 Klonierung der markierten und gekürzten Leserahmen in pBAD24

Für die Expression der selbst markierten und ggf. verkürzten ORF-Produkte wurde der Vektor pBAD24 (GenBank: X81837.1) gewählt. Dieser vermittelt eine Ampicillin-Resistenz und erlaubt

die gezielte Proteinexpression unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren  $P_{BAD}$ -Promotors. In Abbildung 2.4 ist das Vektorkonstrukt (ohne Insert) dargestellt [139].



**Abbildung 2.4: Vektorkarte des Expressionsvektors pBAD24**

Wie bereits beschrieben, wurden die zu klonierenden PCR-Produkte mit flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen, so dass diese – ebenso wie der Vektor – mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten werden konnten. Dies erfolgte ü. N. bei 37°C im Doppelverdau mit *EcoRI* und *XbaI* in Tango-Puffer nach dem Fermentas *Double Digest* Protokoll:

- 3-5 µg Plasmid-DNA bzw. 0.5-0.7 µg PCR-Produkt
- 1 µl *EcoRI* (10 u / µl)
- 2 µl *XbaI* (10 u / µl)
- 6 µl 10x Tango-Puffer
- ad 30 µl *A. bidest.*

Anschließend wurden die Reaktionen durch 20-minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt und die verdauten Fragmente mit dem NucleoSpin Extract II-Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangabe gereinigt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Die Ligation der geschnittenen und gereinigten Fragmente wurde ü. N. bei 16°C in folgender Zusammensetzung durchgeführt:

- 50 ng Vektor-DNA
- 70-150 ng ORF-Produkt (je nach Ausbeute)
- 1.0 µl Ligase-Puffer
- 1.0 µl T4-Ligase
- ad 10 µl *A. bidest.*

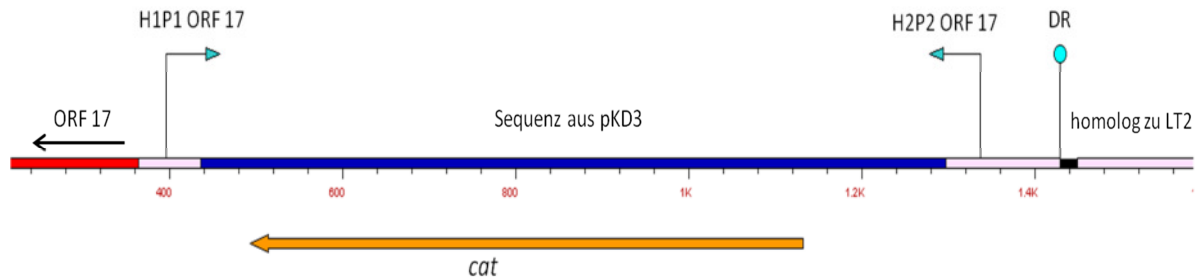
Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Insert mitgeführt. Um die Transformationsrate zu erhöhen wurde das Enzym im Anschluss an die Ligation für 10 min. bei 65°C inhibiert. Die so aufbereiteten Vektoren wurden entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

Neben den selbst getaggtten Leserahmen wurde eine Reihe von ORF-Sequenzen durch die Firma GeneArt mit C-terminalen Epitop-Tags markiert und mit flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen, in die Vektoren pMA (Ap<sup>R</sup>) oder pMK-RQ (Km<sup>R</sup>) kloniert und in *E. coli* K12 exprimiert (Tabelle 2.8). Die gereinigte Plasmid-DNA stand zur weiteren Verwendung zur Verfügung und wurde zunächst in den Expressionsvektor pBAD24 umkloniert. Restriktionsverdau und Ligation erfolgten w. o. beschrieben. Der Vektor wurde in *E. coli* DH5α sowie in den inseltragenden monophasischen STM-Stamm RKI 08-05217 transformiert.

#### **2.4.9 Anfügen eines Selektionsmarkers an die 18.4 kb Insel**

Für Untersuchungen zur Mobilität der *thrW*-Insertion war es nötig, diese mit einem Selektionsmarker zu versehen. Zu diesem Zweck wurde m. H. der Datsenko und Wanner-Methode eine Chloramphenicol-Resistenzkassette wahlweise *upstream* oder *downstream* an die 18.4 kb Sequenz angefügt. Das Experiment wurde in gleicher Weise in RKI 08-05217 durchgeführt wie die Deletion der Insel (s. 2.4.4) bzw. die Epitopmarkierung von ORF10 (s. 2.4.6). Allerdings wurde anstelle der Km-Kassette aus pKD4 die Cm-Kassette aus dem pKD3-Plasmid amplifiziert, was aber keinen Einfluss auf die plasmidalen Primeranteile hatte, da diese für pKD3 und pKD4 gleich sind. Als Homologiesequenzen wurden nicht kodierende Bereiche *upstream* von ORF 1 oder *downstream* von ORF 17 gewählt, je nachdem, an welcher Position die Resistenzkassette eingefügt werden sollte. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ausschließlich die Variante benutzt, die die Markierung *downstream* von ORF 17 trägt. Die Cm-Markierung der *thrW*-Insertion ermöglichte die Herstellung einer Revertante

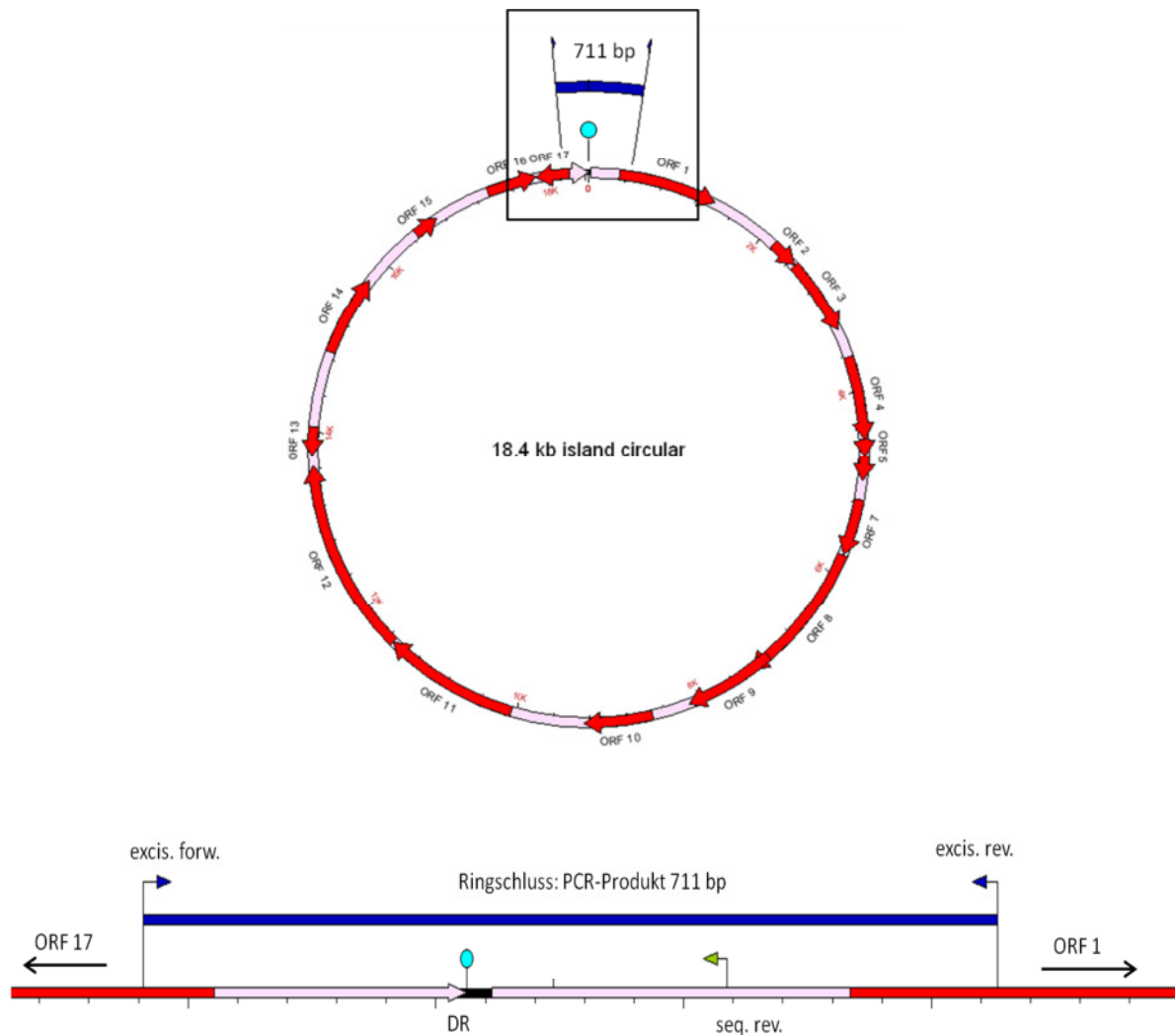
zur Deletionsmutante sowie die Übertragung des 18.4 kb Elementes mittels P22 HT105/1-Transduktion (s. 2.4.11.1) in beliebige *S. Typhimurium*-Rezipienten. Abbildung 2.5 zeigt das 3'-Ende der 18.4 kb Insel mit eingefügter Cm-Resistenzkassette (*cat*) benachbart dem ORF 17.



**Abbildung 2.5: Eingefügte *cat*-Kassette am 3'-Ende der 18.4 kb Insel**

#### **2.4.10 Detektion eines zirkulären Intermediates der 18.4 kb Insertion**

Sofern es sich bei der Insertion am *thrW* tRNA-Locus um ein mobiles Element handelt, das sich nach Excision aus dem Chromosom horizontal verbreiten kann, sollte während dieses Prozesses ein extrachromosomales ringförmiges Zwischenprodukt nachweisbar sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Primer generiert, die spezifisch den Ringschluss nachweisen sollten. Abbildung 2.6 zeigt die Zirkularisierung der unmarkierten Insel. Als Template diente gereinigte DNA aus RKI 06-01900 sowie aus WR 2107 (Revertante mit Cm-Insel). Für die Präparation wurde ein Plasmid-Miniprep-Kit (Fermentas) verwendet, um spezifisch extrachromosomale DNA zu gewinnen. Da die Excision und Zirkularisierung genomischer Inseln u. U. ein sehr seltenes Ereignis ist, wurde in der Literatur empfohlen, das Produkt der ersten PCR-Reaktion unter Verwendung der gleichen Primer ein zweites Mal zu amplifizieren [42]. Für die 18.4 kb Insertion konnte bereits nach dem ersten PCR-Durchgang das erwartete Produkt detektiert werden, unabhängig davon, ob es sich um die Wildtyp-Form oder die Cm-markierte Insel handelte. Das Amplikon wurde anschließend im Sequenzierlabor des RKI sequenziert.



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des ringförmigen Zwischenproduktes**

(excis. forw. / excis. rev.: Primer zum Nachweis der Ringbildung; seq.rev.: zusätzl. Sequenzierprimer; DR: *direct repeat*)

### 2.4.11 Horizontale Übertragung des 18.4 kb Elements

#### 2.4.11.1 Übertragung durch Transduktion

Die Transduktion der Cm-markierten Insel zurück in die Deletionsmutante (s. 2.4.4) ermöglichte die Selektion einer Revertante, die neben dem Wildtyp und der Mutante z. B. in Infektionsversuchen zum Einsatz kam. Außerdem war es nun möglich, die Insel in jeden beliebigen (Cm-sensitiven) *S. Typhimurium*-Stamm zu übertragen und die Transduktanten über ihre Cm-Resistenz zu selektieren. Die Durchführung der Transduktionsexperimente erfolgte wie in 2.4.5 beschrieben.

#### 2.4.11.2 Übertragung durch Konjugation

Der Nachweis des zirkulären Intermediates der 18.4 kb Insel indiziert, dass es sich um ein mobiles Element handelt. Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob das Fragment durch Konjugation von einer Donor- auf eine Rezipientenzelle übergehen kann und ob es dabei selbstübertragbar ist oder ggf. ein Helferplasmid benötigt. Als Donoren dienten WR 2076 (08-5217(*thrW*-Insel<sub>ORF17</sub>::*cat*) und WR 2077 (LT2::*thrW*-Insel<sub>ORF17</sub>::*cat*). Die biphasische STM LT2-Variante wurde gewählt, um später Donor und Transkonjuganten anhand der unterschiedlichen *fljB*-Gene unterscheiden zu können (s. u.). Als Rezipient kam der Stamm LB5010 zum Einsatz, ebenfalls ein Abkömmling von LT2, der aber aufgrund einer *galE*-Mutation serologisch rau ist, als zweite Geißelphase e,n,x anstelle des Typhimurium-typischen 1,2 exprimiert und eine Tetracyclin-Resistenzkassette trägt. Durch Mutation aller drei chromosomalen Restriktions-Modifikationssysteme ist dieser Stamm besonders als Rezipient für Konjugationsexperimente geeignet [137].

Die *filter mating*-Experimente wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Je eine Kolonie von Donor und Rezipient wurden in je 3 ml LB-Flüssigmedium ohne Zusätze ü. N. bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurden 300 µl abgenommen und in 2.7 ml frischem LB-Medium ohne Zusätze für weitere 2h unter gleichen Bedingungen bebrütet. Anschließend wurden je 0.8 ml Donor- und Rezipientenkultur (sowohl die Vor- als auch die Subkulturen wurden „verpaart“) gemischt, 5 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und das Sediment einmal mit 1.5 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 0.2 ml NaCl resuspendiert. Anschließend wurde pro Mating-Ansatz ein runder Papierfilter (5 cm Durchmesser; 0.45 µm Porengröße) auf eine T+He-Agarplatten (ohne Antibiotika) gelegt, das Bakteriengemisch aufgebracht und mit einem sterilen Glasstäbchen vorsichtig verstrichen. Die Platten wurden 4h bei 37°C bebrütet, bevor der Bakterienrasen mit einem sterilen Wattetupfer vom Filter abgenommen und in 1 ml NaCl eingerieben wurde. Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in 0.5 ml NaCl aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$ ) hergestellt und je 100 µl der Verdünnungen auf Endoagar mit Chloramphenicol und Tetracyclin ausgespatelt. Zur Bestimmung der Konjugationsrate wurde mit Donor und Rezipient ebenso verfahren, diese wurden jedoch  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  verdünnt und auf Selektivplatten mit Cm oder Tc ausplattiert. Die Platten wurden ü. N. bei 37°C inkubiert und potenzielle Transkonjuganten mittels PCR auf das Vorhandensein der Insel überprüft. Zusätzlich wurde das *fljB*-Gen für die 2. Geißelphase amplifiziert.

Obwohl bislang davon ausgegangen wird, dass *Salmonella* keine natürliche Kompetenz besitzt [147], sollte eine Übertragung der Insel durch Transformation ausgeschlossen werden. Hierzu wurden je 500 µl Vor- und Subkultur des Rezipientenstammes LB5010 mit 150 ng gereinigter Miniprep-DNA aus dem Donor WR 2077 inkubiert (5h; statisch). Die Kultur wurde anschließend abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl NaCl aufgenommen. Von dieser Suspension wurden je 50 µl auf Nähragar- bzw. Cm-Selektionsplatten ausgestrichen.

## 2.5 Zellinfektionsversuche

Die Zellinfektionsversuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die 18.4 kb Insertion am *thrW* tRNA-Locus monophasischer *S. Typhimurium*-Stämme einen Einfluss auf das Invasions- bzw. intrazelluläre Replikationsvermögen dieser Isolate hat. Dazu wurde der Wildtyp-Stamm 06-01900 mit seiner insel-deletierten Mutante WR 2106 sowie der Insel-Revertante WR 2107 verglichen. Ebenso wurde das Stammpaar *S. Typhimurium* LT2 und WR 2077 untersucht. Als Kontrollen dienten die nicht invasionsfähige SPI1 ( $\Delta invC::FRT$ ) - sowie die replikations-defiziente SPI2 (*ssaV::mTn5*)-Mutante von *S. Typhimurium*. Als Wirtszelllinien wurden die polarisierte Epithelzelllinie MDCK für Invasionsuntersuchungen oder die RAW 264.7-Mausmakrophagen-Zelllinie für Untersuchungen zur intrazellulären Replikation verwendet. Die Infektionsversuche wurden in 24-Well-Platten (Greiner) als Dreifach-Ansätze durchgeführt.

### 2.5.1 Zellkultur

#### 2.5.1.1 Kultur von RAW 264.7-Mausmakrophagen

Die Kultur der RAW-Zellen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit Filterkappe (Nunc) unter Verwendung von DMEM mit 10% FCS (hitze-inaktiviert) und 1% Glutamax bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden umgesetzt, wenn sie am Flaschenboden einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Die Zellen wurden dabei einmal vorsichtig mit PBS gewaschen, anschließend wurden 5ml DMEM zugegeben, die Zellen mit einem *cell scraper* abgeschabt und mit einer serologischen Pipette homogenisiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl mit 45 µl Trypanblau verdünnt und die lebenden (ungefärbten) Zellen in einer Neubauerzählkammer am Mikroskop ausgezählt. Anschließend wurden 3-5x10<sup>5</sup> Makrophagenzellen in eine neue 75 cm<sup>2</sup>-Flasche überführt und ca. 15 ml frisches Medium zugegeben.

### 2.5.1.2 Kultur von MDCK polaren Epithelzellen

Die MDCK-Zellen wurden in MEM mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin sowie nicht essenziellen Aminosäuren kultiviert. Vor dem Splitten wurden die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 2 ml Accutase (PAA) für 10 min im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst. Das weitere Vorgehen entsprach dem für RAW-Makrophagen.

### 2.5.1.3 Kryokonservierung von RAW-264.7 und MDCK-Zellen

Zur langfristigen Konservierung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden zunächst Kryoröhrchen beschriftet und in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -20°C vorgekühlt. Das Isopropanol soll dabei den Gefriervorgang verlangsamen. Anschließend wurde das Einfriermedium aus 90% hitze-inaktiviertem FCS und 10% DMSO (zur Verhinderung von Eiskristallbildung) hergestellt und bis zur kurzfristigen Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Sollte das Medium erst später zum Einsatz kommen, wurde es bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden wie beim Umsetzen vom Flaschenboden gelöst, resuspendiert und gezählt. Die Zellzahl wurde in DMEM auf  $2 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt und die Suspension für 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet im gleichen Volumen Einfriermedium aufgenommen und zu je 1 ml in die Kryoröhrchen überführt. Die Einfrierbox wurde ü. N. bei -80°C gelagert, am nächsten Tag wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt. Zum Auftauen wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig in ein 37°C Wasserbad überführt. Sobald die Zellen nahezu aufgetaut waren, wurden sie in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt und 5 min. bei 2000 rpm zentrifugiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 5 ml Medium in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Am Folgetag konnten die Zellen meist in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen umgesetzt werden.

### 2.5.2 Infektion von RAW 264.7-Mausmakrophage

Pro Well wurden  $2 \times 10^5$  RAW-Makrophagen in 0.5 ml DMEM ausgesät und ü. N. bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Die Zellzahl am Folgetag betrug dann etwa  $4 - 5 \times 10^5$  Zellen / Well. Die Anzucht der *Salmonella*-Stämme erfolgte ü. N. im *Roller Drum* bis zur stationären Phase, da die Bakterien dann kaum noch Flagellen exprimieren und daher weniger invasiv sind. Sie werden viel mehr passiv als Partikel von der Wirtszelle aufgenommen (Phagozytose). Viele Virulenzfaktoren werden in diesem Stadium induziert. Die *Salmonella*-Kultur wurde mit PBS auf eine OD<sub>600</sub> von 0.2 eingestellt, was ca.  $4 \times 10^8$  Zellen / ml entsprechen sollte. Für die



gewählten MOIs von 2 bzw. 5 wurde diese Suspension mit DMEM entsprechend eingestellt, das Medium von den RAW-Makrophagen abgesaugt und durch 0.5 ml Bakteriensuspension ersetzt. Die Platten wurden nun 25 min. bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> bebrütet, anschließend wurden nicht von den Makrophagen aufgenommene Bakterien mit 100 µg/ml Gentamicin abgetötet (Inkubation für 1h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Bis zur Analyse wurden die Zellen dann in DMEM + 10 µg/ml Gentamicin im Inkubator aufbewahrt. Zur Berechnung der Replikationsfähigkeit wurden die Makrophagen für den ersten Wert nach 2h, für den zweiten Wert nach 16h mit 0.1% TritonX100 vom Wellboden abgelöst und lysiert. Von den internalisierten Salmonellen wurde eine Verdünnungsreihe in PBS + 0.05% Tween80 hergestellt und 50 µl jeder Verdünnungsstufe am Spiralplattierer auf LB-Platten ausgebracht. Die Inkubation der Platten erfolgte ü. N. bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Kolonien am ACOlyte Koloniezählgerät ausgezählt. Als Maß für die intrazelluläre Replikationsfähigkeit wurde der Quotient aus dem 16h-Wert und dem 2h-Wert angenommen.

### **2.5.3 Infektion von MDCK polarisierten Epithelzellen**

Aufgrund der unterschiedlichen Zell- und Wachstumseigenschaften wurden hier  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well in 0.5 ml MEM + P/S ausgesät und für zwei Tage bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Am Vorabend der Infektion wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch, 0.5 ml MEM ohne P/S pro Well ersetzt. Zum Zeitpunkt der Infektion sollten sich dann ca.  $5 \times 10^5$  Zellen in jedem Well befinden. Die Anzucht der *Salmonella*-Stämme erfolgte ü. N. als Vorkultur im *Roller Drum*, die am nächsten Morgen in frischem LB-Medium 1:30 verdünnt wurde. Nach dreistündiger Inkubation (späte log-Phase) wurde die Bakteriensuspension auf eine OD<sub>600</sub> von 0.2 eingestellt. Zur Infektionen wurden die Bakterien mit MOIs von 2 und 5 eingesetzt. Das Protokoll für die MDCK-Zellen entsprach im bis zur Abnahme des 2h-Wertes dem der Makrophagen-Infektion. Zur Berechnung des Invasionsvermögens wurden das Inokulum und der 2h-Wert in mehreren Verdünnungsstufen auf LB-Platten ausplattiert. Die Internalisierungsrate wurde als prozentualer Anteil vom eingesetzten Inokulum dargestellt.

### **2.5.4 Maus-Infektion (Colitis-Modell)**

Parallel zu den *in vitro* Infektionsversuchen wurden Wildtyp, Deletionsmutante und Revertante im Labor von Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt an der ETH Zürich im Streptomycin-Mausmodell [148] getestet. Die Tierexperimente waren durch die zuständigen Schweizer

Behörden genehmigt und wurden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt. Pro *Salmonella*-Stamm wurden drei spezifisch pathogenfreie C57Bl/6-Mäuse infiziert, denen 24h vor Infektion 20 mg Streptomycin p. o. verabreicht wurden, um die natürliche Darmflora zu eliminieren. Zwei Tage nach der oralen *Salmonella*-Infektion wurden die Tiere getötet und die koloniebildenden Einheiten (*cfu*) des entsprechenden *Salmonella*-Stammes in Leber, Milz, mesenterialen Lymphknoten und Cecum bestimmt.

## 2.6 Proteinpräparation und Westernblot

### 2.6.1 Präparation der 3x FLAG-getaggten ORF-Proteine

Für jeden der *Salmonella*-Stämme, in denen der 3xFLAG-getaggte ORF 10 in pBAD24 kloniert vorlag, wurde für die Präparation von Gesamtzell- und Überstandsproteinen eine Kolonie des transformierten Stammes in 5 ml LB-Medium + 0.3 M NaCl + 100 µg / ml Carbenicillin resuspendiert und für ü. N. bei 37°C mit einer Frequenz von 100 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 200 µl dieser Vorkultur in einen 100 ml Enghalskolben mit 20 ml LB-Medium + 0.3 M NaCl + 100 µg / ml Carbenicillin überführt und für eine Stunde bebrütet. Danach erfolgte die Induktion des AraC-Promotors mit 10 mM Arabinose für 2h bzw. 5h Stunden bei 37°C und 100 rpm schwenkend. Die 20 ml Hauptkulturen beider Ansatzvarianten wurden abschließend 30 min. im Eisbad gekühlt und nach den folgenden Protokollen weiter aufbereitet.

#### 2.6.1.1 Gesamtzellprotein

Von der Hauptkultur wurde 1 ml abgenommen und die OD<sub>600</sub> am BioPhotometer plus (Eppendorf) in PMAA-Halbmikro-Küvetten (Brand) gemessen. Für die nachfolgenden Westernblot-Analysen sollte die Menge an Gesamtzellprotein der einzelnen Isolate standardisiert werden. Hierzu wurde je nach gemessener optischer Dichte ein bestimmtes Probenvolumen in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min. bei 4°C und 11.000 U/min zentrifugiert:

$$OD_{600} < 0.5 = 1 \text{ ml}$$

$$OD_{600} < 2.0 = 0.5 \text{ ml}$$

$$OD_{600} > 2.0 = 0.25 \text{ ml}$$

Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in reduzierendem Roti®Load1 Probenauftragspuffer (Carl Roth) resuspendiert. Das Volumen des Auftragspuffers richtete sich nach der gemessenen OD<sub>600</sub> und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Puffervolumen [ml]} = 0.5 * [\text{Probenvolumen in ml}] * \text{OD}_{600}$$

Zehn Mikroliter der so verdünnten Proben sollten einer OD<sub>600</sub> von 0.01 entsprechen. Die Proteinproben wurden zur Denaturierung für 5 min. bei 95°C erhitzt und bis zur Verwendung für nachfolgende Analysen bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.6.1.2 Sekretierte Proteine

Die verbliebenen 19 ml der Subkulturkulturen wurden in Polycarbonat-Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 1h bei 4°C, 20.000 U/min. zentrifugiert (Avanti™ J-25, BeckmanCoulter). Der Überstand wurde m. H. einer 25 ml-Spritze durch einen 0.45 µm Millipore-Filter in ein neues PE-Röhrchen filtriert. Erfolgte die Proteinpräparation nicht unmittelbar im Anschluss, wurden die Überstände bei -20°C gelagert. Zur Präzipitation der Überstands-Proteine wurden pro 20 ml 2 g Trichloressigsäure (TCA) zugegeben. Die Fällung erfolgte für 1h auf Eis. Anschließend wurden die Proben für 1h bei 4°C, 20.000 U/min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment 2 ml eiskaltem Aceton (-20°C) für mindestens eine Stunde bei -20°C gefällt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 min. bei 4°C und 20.000 U/min. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Sediment nochmals mit 2.5 ml eiskaltem Aceton aufgerührt und für 20 min. bei -20°C inkubiert. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt und vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde das restliche Aceton über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug verdampft. Das Proteinpellet wurde in 100 µl Roti®Load1 Probenauftragspuffer resuspendiert und für 5 min. bei 95°C denaturiert. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte bei -20°C.

#### 2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE nach Lämmli [149] werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Dafür müssen sie vollständig denaturiert vorliegen, was durch Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) zum Probenpuffer erreicht wird. Letztere sind in der Lage Disulfidbrücken zu zerstören und lösen damit Quartär- und Tertiärstrukturen auf. SDS dagegen ist ein anionisches Detergenz, das nicht-kovalente Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört und diesem durch seine Anlagerung eine

gleichmäßige negative Ladung verleiht, die der Größe des Proteins annähernd proportional ist. Denaturierende Sammel- und Trenngele wurden nach folgendem Schema angesetzt:

|                           | Sammelgel <sup>1</sup> | Trenngel <sup>2</sup> |      |      |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|------|------|
|                           | 4%                     | 10%                   | 12%  | 15%  |
| <i>Aqua bidest.</i> (ml)  | 3                      | 4.15                  | 3.35 | 2.4  |
| Tris pH 8.8 (ml)          |                        | 2.5                   | 2.5  | 2.5  |
| Tris pH 6.8 ( ml)         | 1.25                   |                       |      |      |
| 30% Acryl / Bisacryl (ml) | 0.6                    | 3.3                   | 4    | 4.95 |
| 10% APS ( µl)             | 50                     | 50                    | 50   | 50   |
| 10% SDS ( µl)             | 50                     | 100                   | 100  | 100  |
| TEMED ( µl)               | 5                      | 10                    | 10   | 10   |

**Tabelle 2.9: Zusammensetzung von SDS-Gelen**

<sup>1</sup> Menge reicht für 4 Gele; <sup>2</sup> Menge reicht für 2 Gele bei 0.75 mm Spacer

Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden i. d. R. 12% oder 15% Trenngele verwendet. Dazu wurden zunächst alle Bestandteile, bis auf SDS und TEMED, in einen Rundkolben gegeben und entgast. Nach Zugabe von SDS und TEMED wurden die Gele zwischen die abgedichteten Glasplatten in der Gießapparatur pipettiert und mit Butanol überschichtet. Waren die Trenngele polymerisiert, konnten die Sammelgele in gleicher Weise hergestellt und nach Aufnehmen des Butanols mit Filterpapier auf die Trenngele pipettiert werden. Nachdem auch die Sammelgele polymerisiert waren, wurden je 10 µl denaturierte Proteinprobe pro Tasche mit einer Mikroliterspritze aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte in einer Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad) bei 200 Volt für 1h bei RT in 1x Tris-Glycin-SDS Running Buffer, pH 8.3 (Nippon Genetics). Die Gele wurden anschließend entweder mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder für Westernblot-Analysen verwendet. Um die sehr kleinen ORF 3a und 9a-Produkte zu detektieren, kamen zusätzlich kommerziell erworbene Gradientengele (10 – 20%; Nippon Genetics) zum Einsatz.

### 2.6.3 Coomassie-Färbung

Als Erfolgskontrolle für Proteinpräparation und SDS-PAGE wurden die Polyacrylamid-Gele nach der Elektrophorese ü. N. mit Coomassie®-R250 gefärbt. Der Farbstoff lagert sich in saurer Umgebung an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an und färbt damit Proteine

unspezifisch an. Anschließend wurden die Gele für 1h entfärbt, um nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach kurzem Spülen mit A. dest. wurden die Gele zwischen zwei Lagen Klarsichtfolie für 2h bei 63°C im Gel Dryer 583 (BioRad) getrocknet.

#### **2.6.4 Westernblot**

Das Westernblot-Verfahren dient dazu, das in der Gelelektrophorese aufgetrennte Proteingemisch auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran zu übertragen und anschließend die Zielproteine mittels geeigneter Antikörper spezifisch nachzuweisen. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte im Semi-Dry-Verfahren unter Verwendung der Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad). Für den Blot-Vorgang wurden pro Membran drei Whatman-Filterpapiere in Anodenpuffer I, zwei in Anodenpuffer II und wiederum drei in Kathodenpuffer getränkt. Zunächst wurden die in den Anodenpuffern getränkten Filterpapiere übereinander auf die Anode gelegt, dann folgte die PVDF-Membran (0.2 µm Porengröße) auf welcher das Gel platziert wurde. Aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität wurde die Membran vorab in einem organischen Lösungsmittel (Methanol) equilibriert. Schließlich wurde das Blot-Sandwich mit den im Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren abgedeckt und die Kathode aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei 22 V, 150 mA für 20 min. Nachfolgend wurde die Membran für 2h in einem Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBS) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das zu detektierende Protein bei 4°C ü. N. Am nächsten Tag wurde die Membran 5x5 min. mit TBS-Tween20 gewaschen und anschließend mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 1h bei RT inkubiert und abschließend 6x5 min. mit TBS-Tween20 gewaschen. Zur Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe wurde ein Enhanced Chemielumineszenz (ECL)-Substrat zugegeben, dessen Bestandteil Luminol durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers über energiereiche Zwischenprodukte in seine oxidierte Form überführt wird. Die beim Zerfall dieser Produkte ausgesendeten Lichtquanten können am Chemilumineszenz-Imager (VILBER LOURMAT) detektiert werden.

Anodenpuffer I:

300 mM Tris, 20% Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris, 20% Methanol, 40 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 0.01% SDS

TBS:

6.0 g Tris, 8.5 g NaCl, ad 1 L A. *bidest.* (pH 7.4)

TBS-Tween20:

TBS, 0.5% Tween20

5% Blocking-Puffer (pro Membran):

20 ml TBS, 1 g Magermilchpulver

Antikörper:

| Antikörper                   | Endkonzentration   |
|------------------------------|--|
| Ratte anti-HA Klon 3F10      | 100 ng / ml (1:1000) in TBS-Tween20 + 1% BSA                 |
| Maus anti-FLAG Klon M2       | 1 $\mu$ g / ml (1:1000) in TBS-Tween20 + 3% Magermilchpulver |
| Maus anti-DnaK Klon 8E2/2    | 200 ng / ml (1:5000) in TBS-Tween20 + 1% BSA                 |
| Maus anti-Flagellin Klon 4h2 | 20 ng / ml (1:5000) in TBS-Tween20 + 1% BSA                  |
| Ziege anti-Maus-HRP          | 1:40.000 in TBS-Tween20                                      |
| Ziege anti-Ratte-HRP         | 1:40.000 in TBS-Tween20                                      |

**Tabelle 2.10: Primär- und Sekundärantikörper**

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von 4,[5],12:i:- Isolaten unter epidemiologischen Gesichtspunkten

Wie in Kapitel 1 erwähnt, haben sich *Salmonella*-Stämme mit der Seroformel 4,[5],12:i:- in den letzten Jahren deutschland- und europaweit stark verbreitet. Entsprechend dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema könnte es sich dabei um monophasische Varianten von *S. Typhimurium* (4,[5],12:i:1,2) oder *S. Lagos* (4,[5],12:i:1,5) handeln. Davon ausgehend, dass O5 nicht zwingend exprimiert werden muss, kämen sogar noch weitere Serovar-Varianten in Betracht, die O(4,12)- und H1(i)-Antigene tragen (*S. Agama*, *S. Farsta* etc.). Aus diesem Grund wurden die aufkommenden Isolate zunächst häufig nur als Subspezies I oder Salmonellen der B-Gruppe erfasst, was eine retrospektive Analyse über den Zeitpunkt des Aufkommens und die Anzahl der in früheren Jahren isolierten Stämme erschwert. Am NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger wurde schon früh vermutet, dass es sich um eine monophasische Varietät von *S. Typhimurium* (4,[5],12:i:1,2) handelt, da dieses neben *S. Enteritidis* das am häufigsten aus humanen Proben isolierte Serovar ist, während alle anderen hier genannten Serotypen nur selten bis sehr selten vorkommen. Außerdem wiesen die monophasischen Isolate im Ergebnis weiterer Subtypisierungen (Lysotypie, PFGE, Prophagengehalt etc.) typische Charakteristika von *S. Typhimurium* auf.

Wie Abbildung 3.1 verdeutlicht, wurde die monophasische Variante von *S. Typhimurium* bis 2004 nur vereinzelt aus Patienten isoliert und an das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen am RKI gesandt. Im Folgejahr war ein leichter Anstieg zu verzeichnen und 2006 setzte eine rapide Zunahme an Isolaten ein, während die Einsendungen biphasischer *Typhimurium*-Stämme kontinuierlich zurückgingen. Am Nationalen Referenzlabor für Salmonellen, das dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) angegliedert ist, wurden ganz ähnliche Beobachtungen mit Veterinär- und Lebensmittelisolaten gemacht [150].

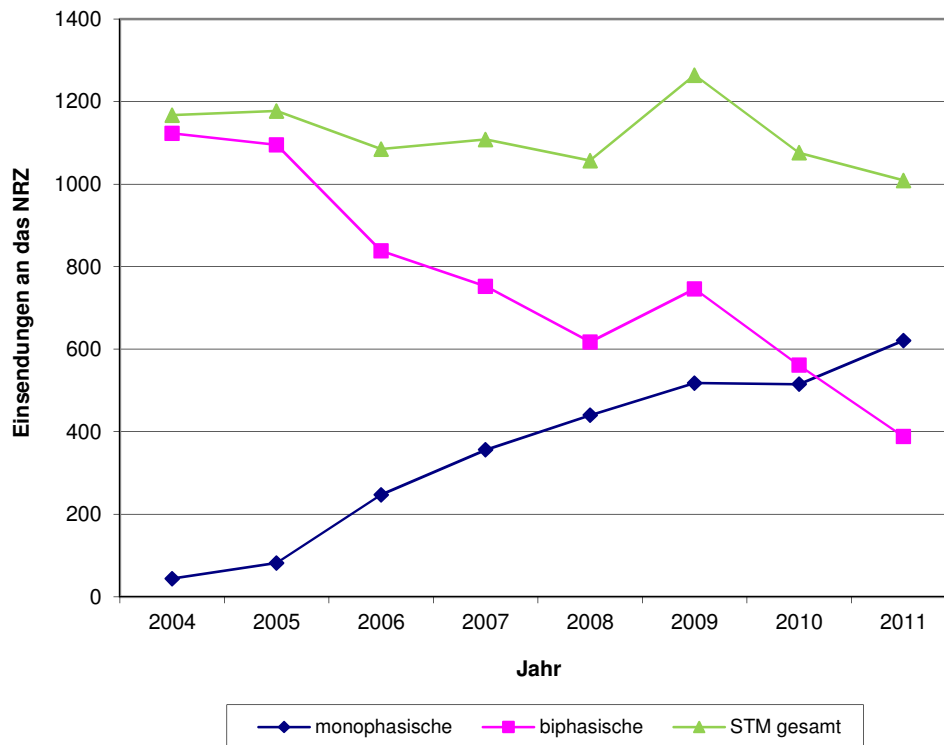


Abbildung 3.1: Humane *S. Typhimurium*-Isolate seit 2004 (NRZ)

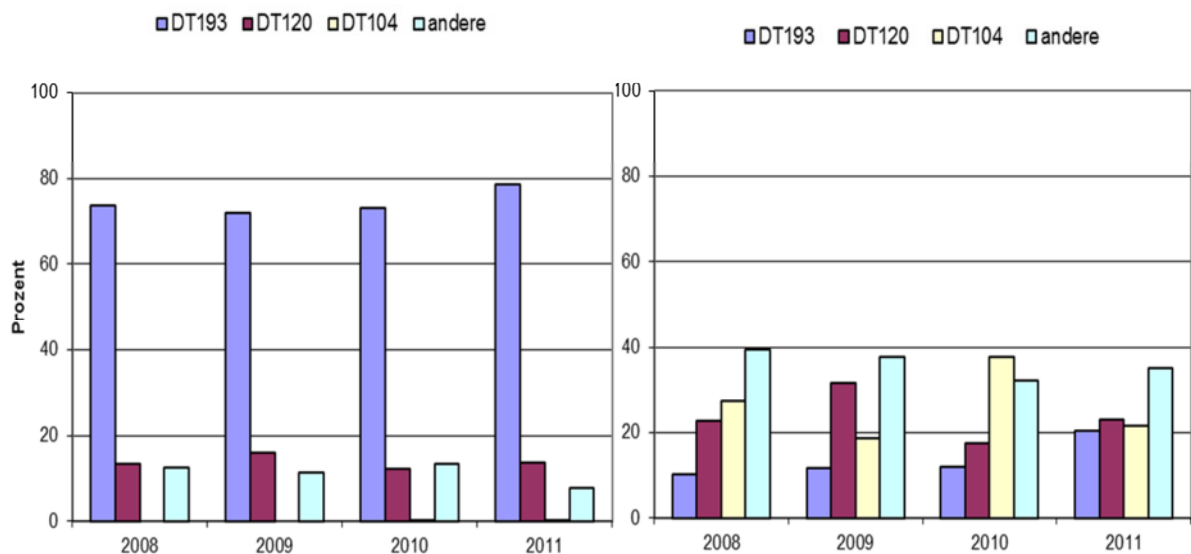
Quelle: RKI SalmoDB

### 3.1.1 Lysotypie

Für einige *Salmonella*-Serotypen (u. a. für *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*) wurden in den vergangenen Jahrzehnten Lysotypiesysteme entwickelt, die es ermöglichen, einzelne Isolate des gleichen Serovars aufgrund ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Phagen voneinander abzugrenzen. Diese Methode der Subtypisierung wird am NRZ v. a. zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge genutzt. Angewendet auf die monophasischen Isolate bedeutet das: erhält man einen eindeutigen, serovar-spezifischen Lysotyp, kann das getestete Isolat diesem Serovar zugeordnet werden. Nachdem beobachtet wurde, dass sich Stämme mit der Seroformel 4,[5],12:i:- überregional stark ausbreiten, wurden diese am NRZ mit einem *S. Typhimurium*-spezifischen Phagenset nach Anderson lysotypiert. Es konnte festgestellt werden, dass diese Stämme charakteristische Lysotypen für STM aufweisen (Abbildung 3.2), wobei DT193 die große Mehrheit ausmacht (ca. 75%), gefolgt von DT120 (ca. 15%). Der in den letzten Jahren bei *S. Typhimurium* sehr stark vertretene



Lysotyp DT104 kommt bei der monophasischen Variante praktisch nicht vor (drei Isolate im dargestellten Zeitraum).



**Abbildung 3.2: Lysotypverteilung in *S. Typhimurium*-Isolaten vom Menschen**

links: monophasische und rechts: biphase Isolate (Quelle: RKI SalmoDB)

### 3.1.2 Prophagengehalt

Ins Genom integrierte Prophagen tragen in hohem Maße zur genetischen Diversität innerhalb eines *Salmonella* Serovars bei [91]. Ein Besatz der monophasischen Isolate mit *S. Typhimurium*-spezifischen Prophagen würde die Hypothese, dass es sich um eine monophasische Variante dieses Serovars handelt, untermauern. Mit Hilfe einer von Bossi entwickelten 3-Primer-PCR, die abhängig vom Okkupationszustand der Integrationsstelle zwei unterschiedlich große Produkte ergibt, können die acht in *S. Typhimurium* bekannten Anheftungsstellen auf Phagenintegration überprüft werden. Diese Methode wurde auf eine Auswahl von Serovar 4,[5],12:i:- Isolaten aus verschiedenen europäischen Staaten angewandt, um ihre nahe Verwandtschaft zu *S. Typhimurium* zu bestätigen. Als Vergleichsstamm diente der gut charakterisierte und sequenzierte biphase *S. Typhimurium* LT2. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass alle sieben getesteten monophasischen Stämme des Lysotyps DT193 (häufigster Lysotyp) unabhängig vom Herkunftsland das gleiche Prophagenmuster aufwiesen, wobei die STM-Prophagen Gifsy-1, Gifsy-2 und ST64B detektiert werden konnten, was die enge Beziehung dieser Isolate zueinander sowie zu *S. Typhimurium* unterstreicht (Tabelle 3.1). Auffällig war, dass in diesen sieben Proben für die gemeinsame

Integrationsstelle der Prophagen P22 / ST64T benachbart dem *thrW* tRNA-Locus kein Amplikon nachgewiesen werden konnte, was darauf schließen ließ, dass in diesen Isolaten entweder eine (allen gemeinsame) Veränderung einer Primerbindungsstelle vorlag oder ein anderes Element diese Stelle okkupiert hatte. Diese Beobachtung führte schließlich zur Entdeckung einer bislang nicht beschriebenen 18.4 kb großen Insertionssequenz nächst dem *thrW* tRNA-Locus in Stämmen mit der Seroformel 4,[5],12:i:- (s. 3.2).

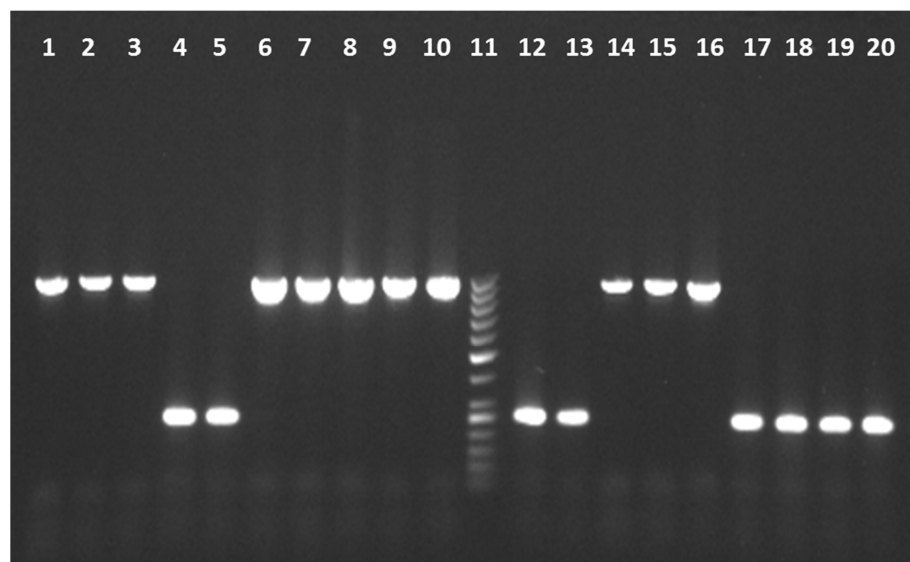
| Herkunftsland<br>und RKI-Nr. | Lysotyp | Prophage        |        |         |         |         |      |       |                 |
|------------------------------|---------|-----------------|--------|---------|---------|---------|------|-------|-----------------|
|                              |         | P22 /<br>ST64T  | Fels-1 | Gifsy-1 | Gifsy-2 | Gifsy-3 | W104 | ST64B | Fels2 /<br>SopE |
| STM LT2 (bi)<br>01-10141     | DT4     | -               | +      | +       | +       | -       | -    | -     | +               |
| Deutschland<br>06-01900      | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| Luxemburg<br>06-05075        | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| Österreich<br>08-06221       | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| Frankreich<br>09-01849       | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| Irland<br>09-04830           | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| Niederlande<br>09-05210      | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| Italien<br>09-05690          | DT193   | kein<br>Produkt | -      | +       | +       | -       | -    | +     | -               |
| USA<br>08-01217              | DT193   | -               | -      | +       | +       | -       | -    | +     | kein<br>Produkt |
| USA<br>08-00265              | U291    | -               | -      | +       | +       | -       | -    | +     | kein<br>Produkt |
| Spanien<br>08-075581         | U302    | +               | -      | +       | +       | -       | +    | +     | -               |

**Tabelle 3.1: Prophagen in monophasischen STM verschiedener Länder**

**Der biphasische STM Laborstamm LT2 diente als Vergleich; Prophage vorhanden (+) / Prophage nicht vorhanden (-)**

### 3.1.3 Nachweis eines *S. Typhimurium*-spezifischen Insertionselementes

Die eindeutige Zuordnung zum Serovar Typhimurium wurde möglich, da Burnens und Kollegen bereits 1997 entdeckt hatten, dass die Lokalisation eines IS200-Elements im Flagellin-Gencluster zwischen *fliB* und *fliA* spezifisch ist für *S. Typhimurium* [151]. Die Amplifikation der intergenischen Region zwischen beiden Loci in 28 *S. Typhimurium* und 21 Serovar 4,[5],12:i:- Stämmen aus dem NRZ nach dem Protokoll von Echeita *et al.* [152] ergab in allen Fällen das erwartete 1 kb Fragment für *S. Typhimurium* während für 19 Proben anderer Serotypen (einschließlich eines *S. Lagos*-Isolates) ein 250 bp-Produkt detektiert werden konnte, wie es für alle anderen Serovare beschrieben wurde. In Abbildung 3.3 ist das Ergebnis für 19 der 68 getesteten Stämme dargestellt.



**Abbildung 3.3: Nachweis der STM-spezifischen Insertion eines IS200-Elements zwischen *fliB* und *fliA* (ca. 1000 bp), das in allen anderen Serovaren fehlt (ca. 250 bp).**

- |                                       |                                       |                                      |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1) <i>S. Typhimurium</i> monophasisch | 8) <i>S. Typhimurium</i> monophasisch | 15) <i>S. Typhimurium</i> biphasisch |
| 2) <i>S. Typhimurium</i> monophasisch | 9) <i>S. Typhimurium</i> biphasisch   | 16) <i>S. Typhimurium</i> biphasisch |
| 3) <i>S. Typhimurium</i> biphasisch   | 10) <i>S. Typhimurium</i> biphasisch  | 17) <i>S. Ealing</i>                 |
| 4) <i>S. Bovismorbificans</i>         | 11) 50 bp O'GeneRuler (Fermentas)     | 18) <i>S. Barreilly</i>              |
| 5) <i>S. Corvallis</i>                | 12) <i>S. Choleraesuis</i>            | 19) Spp.I; rauh                      |
| 6) <i>S. Typhimurium</i> monophasisch | 13) <i>S. Brandenburg</i>             | 20) <i>S. Goldcoast</i>              |
| 7) <i>S. Typhimurium</i> monophasisch | 14) <i>S. Typhimurium</i> biphasisch  |                                      |

### 3.1.4 Genetische Determination des vorherrschenden Resistenzphenotyps ASSuT

Innerhalb der Population monophasischer STM ist das Resistenzmuster ASSuT, das die Unempfindlichkeit der Isolate gegen Ampicillin, Streptomycin, Sulfamerazin und Tetracyclin bedingt, klar vorherrschend. Der hauptsächliche Resistenzphenotyp in biphasischen STM des über Jahre vorherrschenden Lysotyps DT104 war ACSSuT. Auf den ersten Blick unterscheiden sich beide Muster nur in der Chloramphenicol-Resistenz, die in den allermeisten monophasischen Isolaten nicht ausgeprägt ist. Es ist bekannt, dass die Fünffach-Resistenz ACSSuT in biphasischen Isolaten des Lysotyps DT104 durch die Gene *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1*, *tetR*, *tet(G)* vermittelt wird, die im Resistenz-Cluster der *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) kodiert sind [153]. Weiterhin wurde beschrieben, dass das *floR*-Gen durch Insertion eines IS6100-Elementes inaktiviert werden kann [154], was dazu führt, dass die betroffenen Isolate sensitiv gegenüber Chloramphenicol (Cm) sind, was dann wiederum dem ASSuT-Phenotyp der monophasischen Isolate entspräche. Um festzustellen, ob die monophasischen Isolate ebenfalls die SGI1-vermittelte Resistenz aufweisen, wurden vierzehn monophasische Stämme der Lysotypen DT193 und 120 sowie vier biphasische DT104-Isolate mittels PCR untersucht. In der Gruppe der monophasischen befanden sich auch drei ausgewählte Proben mit Cm-Resistenz. Das Ergebnis zeigte, dass die SGI1 in den untersuchten monophasischen STM nicht vorkommt (auch nicht in den Cm-resistenten Isolaten; Tabelle 3.2). Vielmehr ist das ASSuT-Resistenzmuster der monophasischen *S. Typhimurium*-Isolate durch die Gene *bla*<sub>TEM</sub>, *strA-strB*, *sul2* und *tetA(B)* determiniert, die nicht auf SGI1 liegen, sondern nach Lucarelli *et al.* [123] geclustert auf einem ca. 40 kb großen chromosomalen Fragment zwischen den Loci STM2753 und STM2759. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit denen der italienischen Arbeitsgruppe überein und weisen darauf hin, dass es neben der SGI1 eine weitere genomische Insel gibt, die Multiresistenz in *S. Typhimurium* vermittelt.

| RKI-Nr.  | Lysotyp (DT) / Begeißelung | Resistenz-phenotyp | Ampicillin <i>bla</i> <sub>TEM</sub> | Streptomycin <i>strA-B</i> | Sulfamerazin <i>sul2</i> | Tetracyclin <i>tet(B)</i> | SGI1 Integron |
|----------|----------------------------|--------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| 11-08322 | 104 / bi                   | ACSSuT             | nein                                 | nein                       | nein                     | nein                      | ja            |
| 11-07998 | 104 / bi                   | ACSSuT             | nein                                 | nein                       | nein                     | nein                      | ja            |
| 11-07905 | 104 / bi                   | ACSSuT             | nein                                 | nein                       | nein                     | nein                      | ja            |
| 11-08213 | 104 / bi                   | SSu                | nein                                 | nein                       | nein                     | nein                      | ja            |
| 11-07995 | 120 / mono                 | ASSu               | ja                                   | ja                         | ja                       | nein                      | nein          |
| 11-08300 | 120 / mono                 | ASSuT              | ja                                   | ja                         | ja                       | ja                        | nein          |
| 11-08145 | 120 / mono                 | ASSuT              | ja                                   | ja                         | ja                       | ja                        | nein          |

|          |            |             |      |      |      |      |      |
|----------|------------|-------------|------|------|------|------|------|
| 11-08064 | 120 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-07951 | 193 / mono | ACGNxSSuTtp | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08159 | 193 / mono | ACSSuT      | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08060 | 193 / mono | ACSSuT      | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08287 | 193 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08259 | 193 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08244 | 193 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08226 | 193 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 11-08207 | 193 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 06-01900 | 193 / mono | ASSuT       | ja   | ja   | ja   | ja   | nein |
| 08-05217 | 193 / mono | sensitiv    | nein | nein | nein | nein | nein |

Tabelle 3.2: Nachweis der ASSuT-vermittelnden Resistenzgene

### 3.1.5 Ausmaß der Deletionen im *fljB*-umgebenden Gencluster

Garaizar und Kollegen führten bereits 2002 einen Microarray-basierten Genom-Vergleich von STM LT2 und vier Serovar 4,[5],12:i:- Isolaten aus Spanien durch. Das Ergebnis zeigte u. a., dass den monophasischen Stämmen die Gene STM2694 bis STM2740 (47 Loci) sowie STM2758 bis STM2773 (16 Loci) fehlen. Das zweite Cluster schließt das komplette *fljAB*-Operon sowie das daran angrenzende *iroB*-Gen (STM2773) ein [155]. Im sequenzierten 4,[5],12:i:- Stamm CVM23701 aus den USA sind zusätzlich die Gene zwischen den beiden Clustern deletiert; hier fehlen insgesamt 76 Loci (STM2694 bis STM2771); STM2772 (*hin*) und STM2773 (*iroB*) sind dagegen vorhanden. Von Soyer *et al.* wurde bestätigt, dass das Ausmaß der Deletion um das *fljAB*-Operon in spanischen und amerikanischen Isolaten verschieden ist. Die Autoren schlussfolgerten, dass es sich um verschiedene klonale Linien handelt, die aus unabhängigen Ereignissen hervorgegangen sind [156]. Sie beschrieben zudem ein einzelnes Isolat eines dritten (intermediären) Typs, in dem das *hin*-Gen fehlt, *iroB* aber vorhanden ist und das ansonsten dem „spanischen Typ“ gleicht. Im Zuge dieser Arbeit wurden siebzehn 4,[5],12:i:- Isolate aus zwölf Ländern mittels PCR auf Deletionen um das *fljAB*-Operon untersucht. Hierbei konnten alle drei beschriebenen Typen festgestellt werden, wobei die drei USA-Stämme dem „amerikanischen Typ“ sowie das Isolat aus Spanien dem „spanischen Typ“ entsprachen. Alle anderen europäischen Isolate waren dem intermediären Typ zuzuordnen war (Tabelle 3.3). Die Loci *upstream* von *fljA* blieben in dieser Untersuchung unberücksichtigt.

| Herkunft / Anzahl | <i>fljA</i> | <i>fljB</i> | <i>hin</i> | <i>iroB</i> |
|-------------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| USA / 3           | -           | -           | +          | +           |
| Deutschland / 2   | -           | -           | -          | +           |
| BeNeLux / 3       | -           | -           | -          | +           |
| Österreich / 1    | -           | -           | -          | +           |
| Spanien / 1       | -           | -           | -          | -           |
| Frankreich / 1    | -           | -           | -          | +           |
| Italien / 1       | -           | -           | -          | +           |
| Irland / 1        | -           | -           | -          | +           |
| Dänemark / 2      | -           | -           | -          | +           |
| Finnland / 2      | -           | -           | -          | +           |
| STM LT2-Kontrolle | +           | +           | +          | +           |

**Tabelle 3.3:** Deletionen im *fljAB*-Operon in 4,[5],12:i:- Isolaten verschiedener Staaten

### 3.1.6 Sequenztypen mono- und biphasischer STM-Isolate

Das Verfahren der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) hat sich in den vergangenen Jahren als bedeutende Methode der molekularen Epidemiologie etabliert. Durch die Kombination verschiedener Allelvarianten der sieben sequenzierten Housekeeping-Gene (s. 2.2.5) können jedem Stamm ein Sequenztyp (ST) zugeordnet und Rückschlüsse auf die genetische Verwandtschaft verschiedener Isolate gezogen werden. Die MLST-Daten für diese Arbeit wurden vornehmlich in der Arbeitsgruppe von Mark Achtman am Environmental Research Institute des University College Cork (Irland) generiert, wo auch die online-MLST-Datenbank für *Salmonella enterica* geführt wird, die sowohl den Eintrag eigener Daten als auch den Zugriff auf Typisierungsergebnisse anderer Labore weltweit erlaubt. Generell konnte festgestellt werden, dass die in der Datenbank hinterlegten biphasischen *S. Typhimurium*-Isolate i. d. R. ST19 zuzuordnen sind, während monophasische Stämme des gleichen Serovars mehrheitlich ST34 angehören. Diese Verteilung wurde auch von Achtman *et al.* beschrieben [157]. Beide Sequenztypen unterscheiden sich durch einen Single-Nucleotid Polymorphismus (SNP) im *dnaN*-Allel. Die MLST-Analyse von 47 monophasischen *S. Typhimurium* aus der NRZ-Stammsammlung ergab für 44 Stämme ST34 und für drei Stämme ST19. Unter den ST19-Stämmen war je ein Isolat aus Deutschland, Spanien und den USA. Die Resultate stützen die

Hypothese, dass es sich bei den weltweit zirkulierenden monophasischen STM-Varianten ursprünglich um mindestens zwei Klone verschiedenen Ursprungs handelte [156]. Hinsichtlich Lysotyp, Resistenzprofil oder Besatz des *thrW* tRNA-Locus ist die im Rahmen dieser Arbeit getestete ST34-Population teilweise heterogen, was durch horizontale Transfer-Ereignisse nach Entstehung der beiden klonalen Linien erklärt werden könnte.

## 3.2 Detektion eines neuartigen 20 kb Fragmentes

### 3.2.1 Amplifikation der tRNA-Genloci

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass tRNA-Loci bevorzugte Insertionsstellen für horizontal transferierte Elemente sind [38]. Parallel zu den Experimenten zu möglicherweise integrierten STM-Prophagen und ausgehend davon, dass es sich um eine monophasische Typhimurium-Variante handelt, wurden in einem monophasischen Teststamm des Lysotyps DT193 (RKI-Nr. 06-01900) alle 85 aus STM LT2 bekannten tRNA-Loci mittels PCR auf potenziell horizontal erworbene Insertionen untersucht. Da es sich bei tRNA-Genen um sehr kurze Loci handelt, die zudem häufig repetitive Sequenzen aufweisen, wurde der Umstand ausgenutzt, dass tRNA-Gene oft in Clustern organisiert sind. Die 85 einzelnen tRNA-Gene wurden zur besseren Amplifikation in 45 Regionen zusammengefasst (Abbildung 3.4). Die Produktgrößen von 40 dieser 45 Regionen waren im monophasischen Teststamm und im LT2-Referenzstamm identisch, vier Produkte wiesen marginale Größenunterschiede auf und für Region D (*thrW*) konnte im monophasischen Isolat kein Produkt detektiert werden. Der *thrW*-tRNA-Locus ist eine bekannte Insertionsstelle für die *S. Typhimurium*-Prophagen P22, ST64T und ST104, von denen aber keiner im monophasischen Teststamm nachgewiesen werden konnte. Aus diesen Ergebnissen wurde vermutet, dass entweder eine Mutation in einer der Primer-Bindungsstellen vorliegt, die eine Amplifikation verhindert, oder dass sich an dieser Stelle des Genoms ein anderes Element befindet, welches für die Detektion mittels konventioneller PCR zu groß ist.

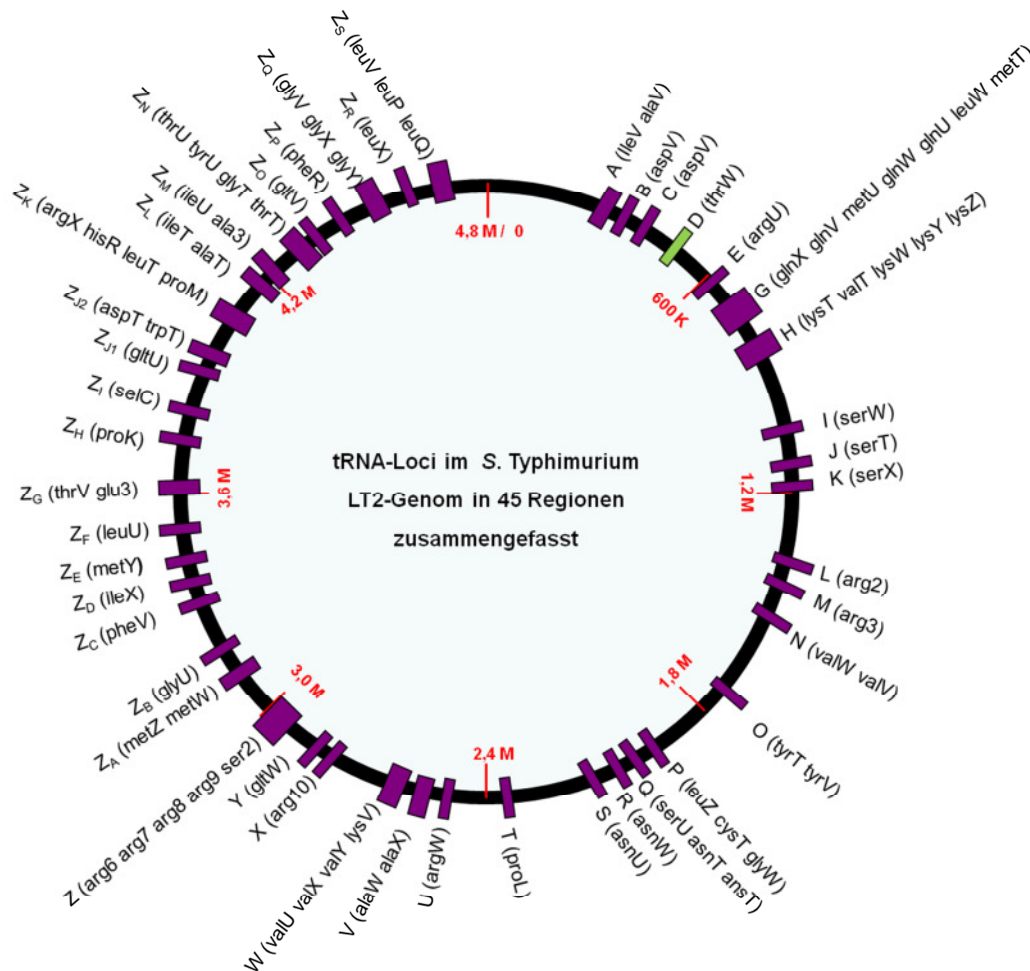


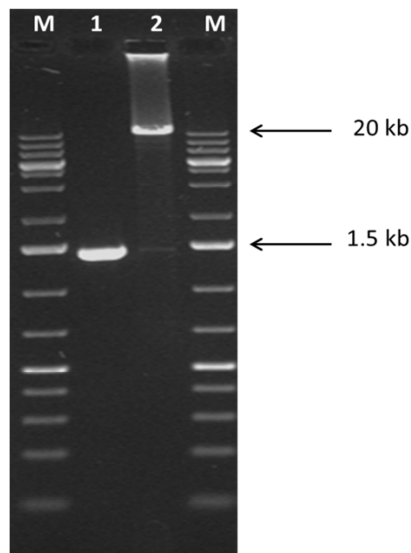
Abbildung 3.4: tRNA-Regionen auf dem *S. Typhimurium* LT2-Chromosom

Die Abbildung wurde übernommen von J. Laverde Gomez (nicht publiziert) und zeigt die Positionen der amplifizierten tRNA-Regionen. Für Region D (grünes Kästchen) konnte kein Amplikon detektiert werden.

### 3.2.2 Long Template PCR

Mit Hilfe des Expand 20 kb<sup>plus</sup> PCR Systems von Roche Diagnostics und Primern, deren Sequenzen in den *thrW*-Locus flankierenden Genen liegen (Long Template Primer; Tabelle A.1), konnte im monophasischen Teststamm RKI 06-01900 ein ca. 20 kb großes Produkt detektiert werden (Abbildung 3.5, Spur 2), während im Referenzstamm STM LT2 das erwartete 1406 bp Produkt für den freien *thrW*-Locus nachgewiesen wurde (Abbildung 3.5, Spur 1). Die nachfolgende Sequenzierung (s. 3.3.1) ergab eine Größe von 18.4 kb für das integrierte Element.





| Spur | Produktgröße | Eigenschaften       |
|------|--------------|---------------------|
| M    |              | 1 kb Plus Marker    |
| 1    | ca. 1.4 kb   | thrW-Locus frei     |
| 2    | ca. 20 kb    | unbekanntes Element |
| M    |              | 1 kb Plus Marker    |

**Abbildung 3.5: Nachweis eines ca. 20 kb Produktes im monophasischen Teststamm**

### 3.2.3 Screening von *Salmonella Typhimurium* auf das 18.4 kb Element

Nachdem in einem exemplarischen monophasischen Teststamm die Insertion am *thrW* tRNA-Locus nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob diese ein Charakteristikum der sich stark verbreitenden monophasischen Isolate ist. Wie unter 3.1.2 erwähnt, stellt der *thrW*-Locus die Integrationsstelle der *S. Typhimurium*-Prophagen ST64T und P22 dar. Die dort beschriebene PCR zum Prophagen-Nachweis wurde um zwei weitere Primer ergänzt, die am Beginn (Antisense-Primer) bzw. am Ende (Sense-Primer) der Insertionssequenz binden. Mit Hilfe dieser 5-Primer Multiplex PCR kann der Okkupationszustand der *thrW*-Stelle (frei; mit integriertem Prophagen oder mit 20 kb Insertion) festgestellt werden (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7).

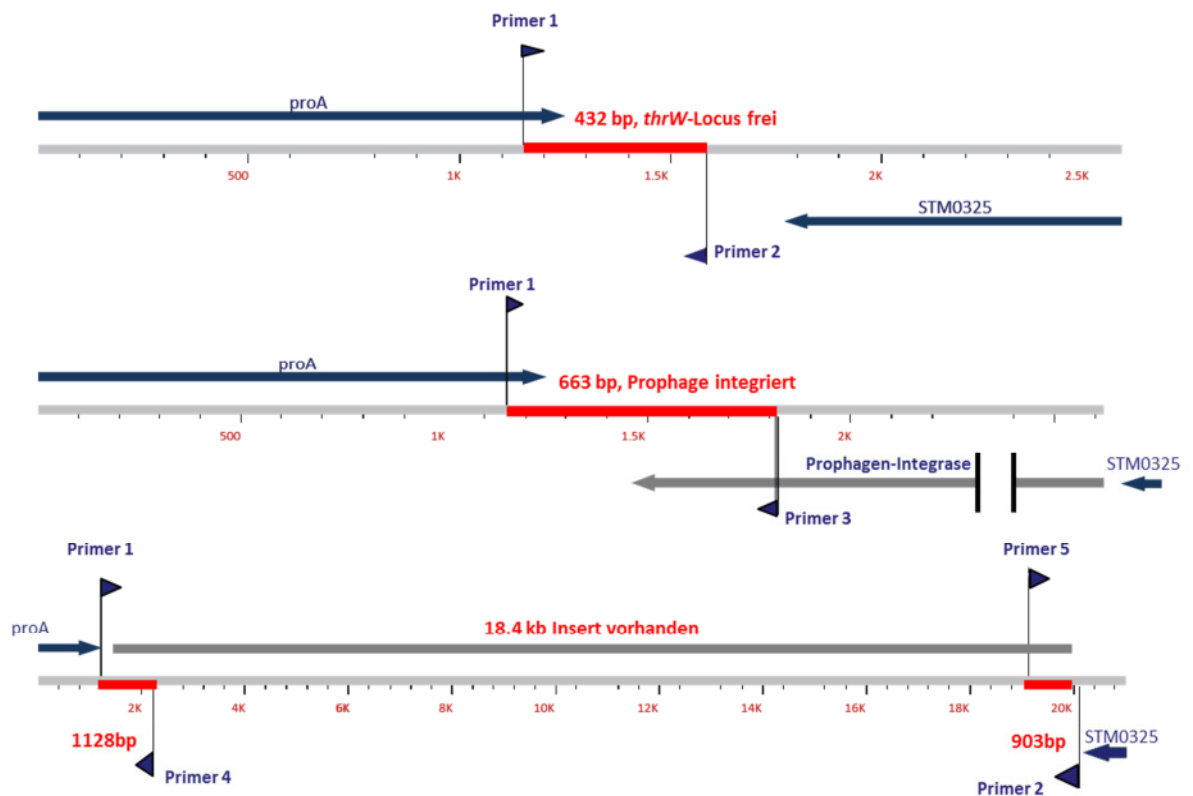


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der 5-Primer Multiplex PCR und ihrer möglichen Produkte zur Bestimmung des *thrW*-Okkupationsstatus (nach J. Laverde Gomez [158])

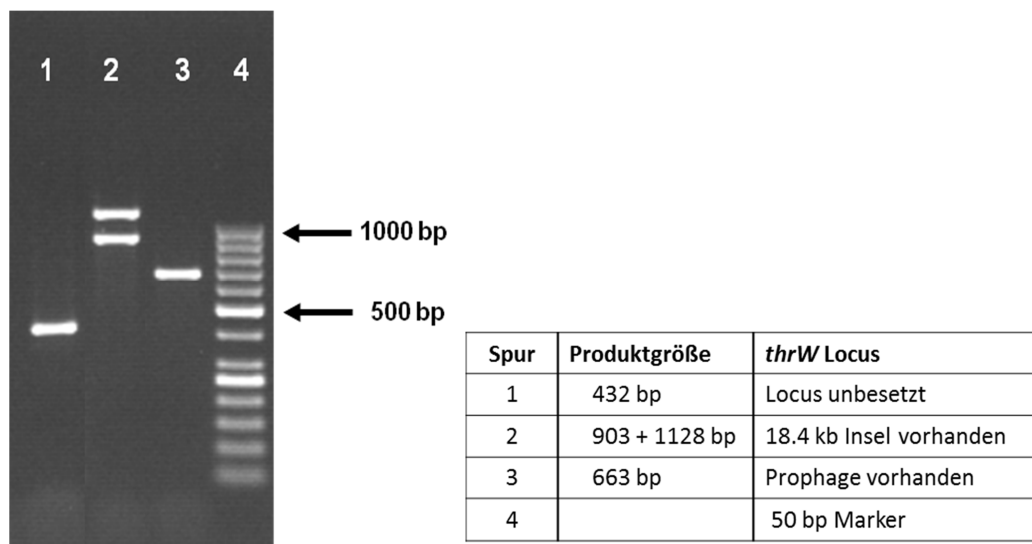


Abbildung 3.7: Agarose-Gel zur Verdeutlichung der drei möglichen *thrW*-Zustände

### 3.2.3.1 Monophasische STM-Isolate

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehr als zweitausend monophasische *S. Typhimurium*-Isolate auf das Vorhandensein des 18.4 kb Elementes untersucht. Hauptsächlich wurden Isolate getestet, die zur Typisierung an das NRZ gesandt worden waren, es wurden aber auch asservierte Proben aus der NRZ-Stammsammlung sowie Stämme aus anderen europäischen Staaten (215 Isolate) und den USA (3 Isolate) einbezogen. Die PCR-Ergebnisse zeigten, dass die Insertion durchaus als Charakteristikum der monophasischen STM-Variante aufgefasst werden kann. Das gilt insbesondere für den in Deutschland und anderen europäischen Staaten am häufigsten vorkommenden Lysotyp DT193; hier waren 90% der Isolate Träger der Insertion (Tabelle 3.4). Vom zweithäufigsten Typ DT120 trug knapp die Hälfte der getesteten Isolate das 18.4 kb Fragment. Lediglich 4% der Stämme, in denen das Insertionselement gefunden wurde, waren anderen Lysotypen zuzuordnen, allerdings stellen diese auch nur einen geringen Teil der Gesamtpopulation monophasischer STM. Die drei amerikanischen Stämme trugen die Insel nicht.

|                             | monophasische STM<br>alle Lysotypen | monophasische STM<br>DT193 | monophasische STM<br>DT120 |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Anzahl getesteter Stämme    | 2169                                | 1466                       | 325                        |
| 18.4 kb Insertion vorhanden | 1538 (71%)                          | 1326 (90.5%)               | 144 (44.3%)                |

**Tabelle 3.4: Vorkommen der Insel in monophasischen STM verschiedener Lysotypen**

Um der Frage nachzugehen, ob die *thrW*-Insertion bereits in Stämmen vorhanden war, die vor dem Jahr 2005 isoliert, aber nicht dem Serovar *Typhimurium* zugeordnet wurden, wurden alle als Serovar 4,[5],12:i:- erfassten Isolate der Jahre 2001 bis 2004 aus der NRZ-Stammsammlung in die Untersuchungen einbezogen. In 15 der insgesamt 79 Proben konnte die *thrW*-Insertion detektiert werden, das erste positive Isolat stammt von 2001 (Lysotyp DT7). Die Insertion des 18.4 kb Elementes scheint also nicht unmittelbar mit der endemischen Ausbreitung der monophasischen *S. Typhimurium*-Variante ab 2006 in Zusammenhang zu stehen. Dafür spricht ebenfalls, dass die Insertion auch in biphasischen Isolaten detektiert werden konnte (s. u.).

### 3.2.3.2 Biphasische STM-Isolate

Wie bereits erwähnt, wurde die 18.4 kb Insel zwar zuerst in monophasischen *S. Typhimurium* entdeckt, als die Ursache für die rasche Ausbreitung dieser „neuen“ Stämme gesucht wurde, und das Fragment kann auch als charakteristisch für die monophasische Variante bezeichnet werden – es ist jedoch nicht ausschließlich auf diese beschränkt. Auch in klassischen *S. Typhimurium*, die die 2. Geißelphase exprimieren, kommt die Insertion im *thrW* tRNA-Locus vor. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 203 serologisch biphasische STM-Isolate auf das Vorhandensein der Insel getestet, davon 122 des Lysotyps DT193. Aus Tabelle 3.5 wird ersichtlich, dass die *thrW*-Insertion in biphasischen Stämmen deutlich seltener vorkommt als in monophasischen, andererseits aber gleichmäßiger zwischen den verschiedenen Lysotypen verteilt ist. In Stämmen des Lysotyps DT104, dem jahrelang dominierenden innerhalb der biphasischen STM-Population (Abbildung 3.2 b), wurde die Insel bislang nicht gefunden. Interessanterweise kommt bei diesem Typ die monophasische Variante auch nur äußerst selten vor (drei Isolate zwischen 2008 und 2011).

|                             | biphasische STM<br>alle Lysotypen | biphasische STM DT193 | biphasische STM DT120 |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Anzahl getesteter Stämme    | 203                               | 122                   | 45                    |
| 18.4 kb Insertion vorhanden | 28 (13.8%)                        | 16 (13.0%)            | 8 (17.8%)             |

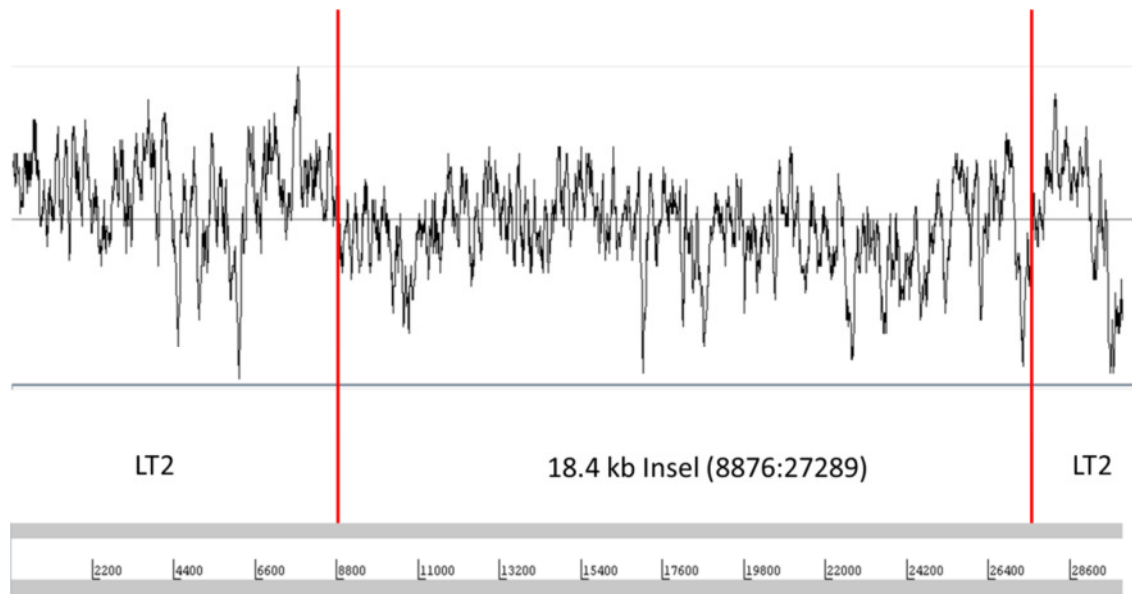
Tabelle 3.5: Vorkommen der Insel in biphasischen STM verschiedener Lysotypen

## 3.3 Charakterisierung des 18.4 kb Fragmentes

### 3.3.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung des ca. 20 kb großen Amplikons, das nächst der *thrW* tRNA-Stelle im monophasischen *S. Typhimurium*-Stamm 06-01900 detektiert wurde, erfolgte mittels GS20-Technologie durch die Eurofins MWG GmbH. Die Consensus-Sequenz ergab eine exakte Größe von 18434 bp und zeigte, dass das analysierte Fragment zwischen dem *thrW* tRNA-Locus (STM0323) und STM0325 lokalisiert ist und von *direct repeats* flankiert wird. Die repetitive Einheit *upstream* der Insertion ist Teil des *thrW* tRNA-Gens. STM0325 weist Ähnlichkeiten zu einem IS3-Transposase-kodierenden Gen aus *E. coli* auf, beherbergt aber ein vorzeitiges Stopcodon [159]. Das Alignment der *thrW* tRNA-Region von STM 06-01900 und STM LT2 ist in Abbildung A.3 im Anhang dargestellt. Verglichen mit dem STM LT2-

Gesamtchromosom weist das Insertionsfragment einen deutlich geringeren G+C-Gehalt auf (47.4% vs. 52.2%) [160]. Die Nucleotidsequenz des 18.4 kb Fragments im monophasischen STM-Stamm 06-01900 wurde unter der Zugriffsnummer GQ478253 in der GenBank Datenbank hinterlegt. Die Integration an einer tRNA-Stelle sowie der abweichende G+C-Gehalt weisen darauf hin, dass es sich um ein horizontal erworbenes Fragment handeln könnte.



**Abbildung 3.8: G+C-Gehalt der 18.4 kb Insel und ihrer flankierenden Regionen**

Die Insel weist einen niedrigeren G+C-Gehalt auf als ihre flankierenden Regionen, die zu STM LT2 homolog sind (Grafik erstellt mit Artemis 14.0).

### 3.3.2 Definition offener Leserahmen und BLAST-Analysen

#### 3.3.2.1 Leserahmen-Bestimmung

Mit Hilfe des NCBI ORF Finder-Programmes [161] wurden zunächst 17 offene Leserahmen definiert. Die Suche wurde im Verlauf dieser Arbeit noch einmal verfeinert und die Sequenz um weitere zehn, teils sehr kleine, putative ORFs ergänzt. Um die bis dahin verwendete Nomenklatur nicht zu verändern, erhielten die neu definierten Leserahmen den Zusatz a, b, c usw.

### 3.3.2.2 Nukleotid-Sequenzvergleich

Vergleicht man die gesamte Nukleotidsequenz des 18.4 kb Elementes, so fallen große Bereiche mit umfassender Homologie (> 90% Ähnlichkeit) zu verschiedenen *Escherichia coli*-Genomen auf. In keiner der annotierten *E. coli*-Sequenzen ist jedoch das gesamte Fragment zu finden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Element in mehreren Schritten in das Genom des monophasischen *S. Typhimurium*-Stammes integriert wurde. Die weitreichendste Übereinstimmung wurde mit *E. coli* ETEC H10407 gefunden, dessen Basensequenz-Homologien insgesamt 73.9% der 18.4 kb Insertion abdecken. Die schematische Darstellung der Sequenzhomologien findet sich in Abbildung A.1 im Anhang.

### 3.3.2.3 Protein-Sequenzvergleich

Auf Proteinebene zeigten die BLAST-Analysen vorwiegend Ähnlichkeiten zu nicht näher charakterisierten Phagen- sowie hypothetischen Proteinen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Hervorgehoben werden soll hier ORF 1, der für eine putative Phagenintegrase kodiert und so für eine eventuelle Mobilisierung der Insel von Bedeutung wäre. Für ORF 6a wurde zudem folgender in Abbildung 3.9 dargestellter Treffer angezeigt, der aufgrund der geringen Deckungsrate (ORF 6a = 73 AS; VirB4-Family Protein > 800 AS) nicht in Tabelle 3.6 aufgenommen wurde:

|  |     |   |     |
|--|-----|---|-----|
| <a href="#">gb EHC71374.1 </a>                                       |     | Type IV secretion complex and secretion of T-DNA complex VirB4;<br>Type IV secretion/conjugal transfer ATPase, VirB4 family |     |
| [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Montevideo str. S5-403] |     | Length=871  |     |
| Score = 32.7 bits (73),  |     | Expect = 8.7, Method: Composition-based stats.  |     |
| Identities = 13/38 (34%),  |     | Positives = 26/38 (68%), Gaps = 0/38 (0%)   |     |
| Query  | 24  | LEGASPSNRDKLMIGAVMSLLNGVPEAIQEADELLGKY  | 61  |
|  |     | + G++ RD++ ++S+L+G P+ + A+EL+GKY  |     |
| Sbjct  | 817 | INGSNTPERDEIEKNNIISILSGEPQNAELAEELIGKY  | 854 |

**Abbildung 3.9: Ähnlichkeit des ORF 6a-Produktes mit Teilen einer Typ IV-ATPase**

| ORF Nr. | ORF Länge (AS) | Abdek- kung (%) | Identität / Positive (%)      | Beste Treffer (BlastP)   | GenBank- Accession-Nr.                 |
|---------|----------------|-----------------|-------------------------------|--|--|
| 1       | 354            | 99              | 99 / 99                       | putative prophage integrase, Escherichia coli ETEC H10407  | YP_006113905.1                         |
| 1a      | 71             | 100             | 100 / 100                     | hypothetical protein HMPREF0358_1331, Escherichia coli 83972   | ZP_04002544.1                          |
| 1b      | 46             | 97              | 100 / 100                     | possible phage transcriptional regulator, Escherichia coli 83972   | ZP_04002543.1                          |
| 2       | 101            | 100             | 100 / 100                     | putative prophage protein <i>E. coli</i> O42   | YP_006098237.1                         |
| 3       | 277            | 100             | 99 / 99                       | antA/AntB antirepressor family protein, Escherichia coli LT-68   | EFZ56748.1                             |
| 3a      | 83             | 72              | 100 / 100                     | hypothetical protein ECNC101_15157, Escherichia coli NC101; putative prophage protein, Escherichia coli ETEC H10407  | ZP_07447455.1<br>YP_006113909.1        |
| 4       | 295            | 99<br>100<br>98 | 89 / 93<br>86 / 89<br>77 / 83 | hypothetical protein ECDEC7E_4399, Escherichia coli DEC7E; Ash family protein, Escherichia coli 1.2741; phage immunity repressor protein, Escherichia coli LT-68 | EHV97058.1<br>EIG80702.1<br>EFZ56749.1 |
| 5       | 64             | 100             | 98 / 98                       | putative prophage protein, Escherichia coli DEC7A  | EHV74630.1                             |
| 6       | 87             | 100<br>100      | 99 / 99<br>91 / 92            | 2 <sup>nd</sup> $\beta$ -subunit nicotinic acetylcholine-receptor <i>Shigella dysenteriae</i> ; putative prophage protein <i>E. coli</i> O42                     | ZP_03064885.1<br>YP_006098242.1        |
| 6a      | 73             | 100             | 100 / 100                     | hypothetical protein SbBS512_E4082; <i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94   | YP_001882350.1                         |
| 7       | 200            | 100             | 98 / 99                       | putative prophage protein [Escherichia coli ETEC H10407  | YP_006113913.1                         |
| 8       | 526            | 96              | 99 / 99                       | zinc-binding domain of primase-helicase family protein, Escherichia coli DEC8A   | EHW05901.1                             |
| 9       | 327            | 83              | 99 / 100                      | zinc-binding domain of primase-helicase, Escherichia coli 1.2741   | EIG80226.1                             |
| 9a      | 76             | 100             | 100 / 100                     | predicted protein <i>Escherichia sp.</i> 3_2_53FAA   | ZP_04533909.1                          |
| 10      | 245            | 100             | 99 / 100                      | hypothetical protein ECDEC8A_4443, Escherichia coli DEC8A  | EHW05903.1                             |
| 10a     | 70             | 70              | 94 / 98                       | hypothetical protein HMPREF9530_04078, Escherichia coli MS21-1   | ZP_07153938.1                          |
| 10b     | 46             | 60              | 100 / 100                     | prophage protein, Escherichia coli ETEC H10407   | YP_006113918.1                         |
| 11      | 488            | 100             | 99 / 99                       | (DNA) transfer protein gp20, Escherichia coli TX1999   | EGX20343.1                             |
| 12      | 704            | 99              | 99 / 99                       | injection protein, Escherichia coli 83972; putative phage DNA transfer protein, Escherichia coli ABU 83972   | ZP_04002524.1<br>YP_006104497.1        |
| 13      | 105            | 85<br>78        | 94 / 96<br>77 / 80            | conserved hypothetical protein, Escherichia coli 83972; putative membrane protein, Escherichia coli 2362-75  | ZP_04002523.1<br>ZP_07782205.1         |
| 13a     | 123            | 100<br>63       | 85 / 98<br>85 / 87            | hypothetical protein ECO111_0327, Escherichia coli O111:H- str. 11128; putative prophage protein, Escherichia coli O42   | YP_003232865.1<br>YP_006098255.1       |
| 14      | 291            | 97              | 100 / 100                     | Abi-like protein (abortive infection), Escherichia coli MS 182-1   | ZP_07139491.1                          |
| 14a     | 88             |                 |                               | no matches   |  |
| 15      | 93             | 100             | 99 / 100                      | PerC transcriptional activator, Escherichia coli NC101   | ZP_07447438.1                          |
| 15a     | 61             | 100             | 100 / 100                     | hypothetical protein ECO111_0323, Escherichia coli O111:H- str. 11128  | YP_003232861.1                         |
| 16      | 180            | 99              | 100 / 100                     | hypothetical protein ECO111_0322, Escherichia coli O111:H- str. 11128  | YP_003232860.1                         |
| 17      | 120            | 99              | 100 / 100                     | hypothetical protein ECO111_0321 [Escherichia coli O111:H- str. 11128  | YP_003232859.1                         |

Tabelle 3.6: Protein-BLAST-Ergebnisse für die einzelnen Leserahmen der 18.4 kb Insel

### 3.3.3 Weiterführende *in silico*-Analysen

Da der Sequenzvergleich mit bereits annotierten Genomen kaum Aufschluss über die Funktion der einzelnen Leserahmen gab, wurden weitere computer-basierte Untersuchungen mit diversen Freeware-Tools durchgeführt.

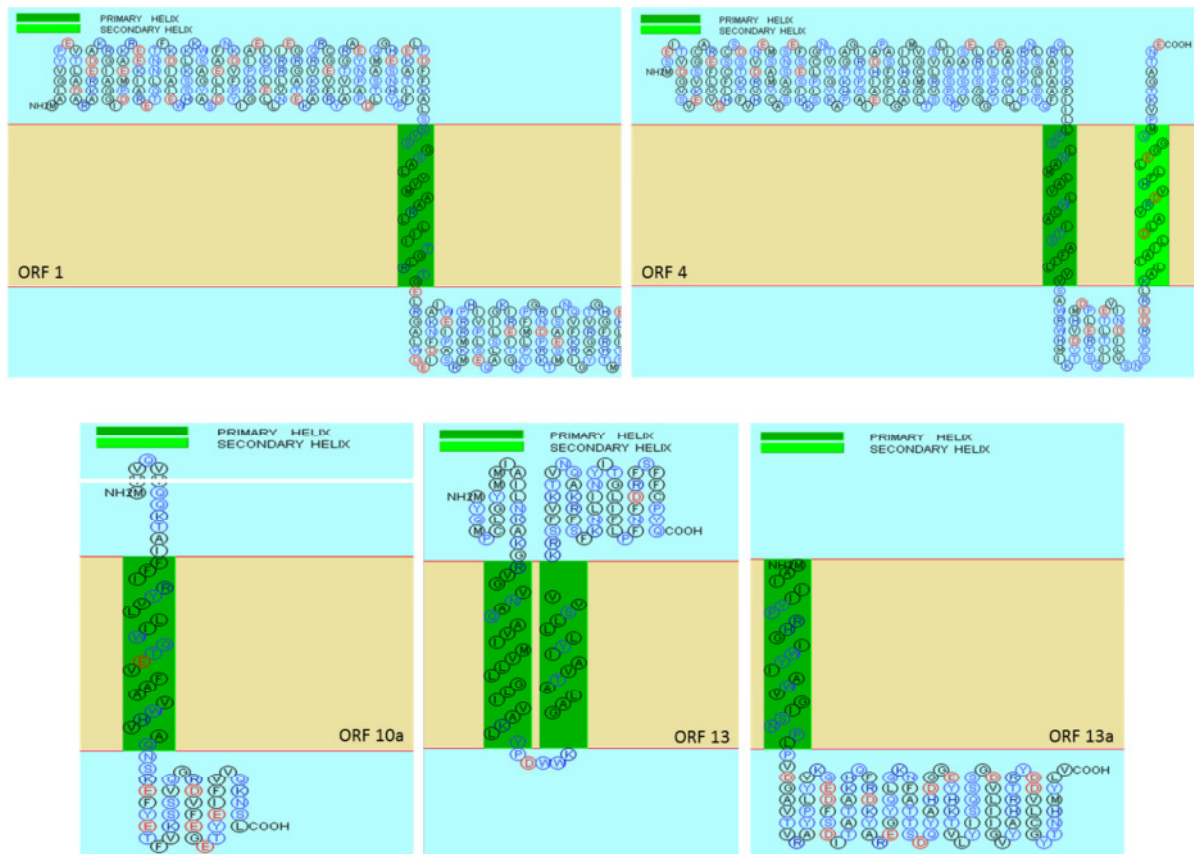
#### 3.3.3.1 Bestimmung putativer Operonstrukturen und möglicher Promotoren

Wie bereits erwähnt, haben Teile des Insertionselementes auf Nukleotid-Ebene unterschiedlich große Homologe in verschiedenen *E. coli*, es kommt aber in keiner der annotierten Sequenzen die gesamte 18.4 kb Basenfolge vor. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Element in mehreren Schritten akquiriert wurde und die erworbenen Teilstücke möglicherweise in Operons organisiert sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die gesamte 18.4 kb Nukleotidsequenz mit Hilfe des Programmes SoftBerry FgenesB: Bacterial Operon and Gene Prediction [132] analysiert. Für die Sequenz wurden 23 Gene in 12 Transkriptionseinheiten vorhergesagt, die sich auf fünf Operons mit insgesamt 16 Genen sowie sieben einzelne Gene verteilen. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen des NCBI ORF Finder, so finden sich für zwölf der sechzehn Operon-Gene und vier der sieben einzelnen Gene Entsprechungen, für vier weitere Gene unterscheiden sich die Leserahmen in der Größe und nur für das Einzelgen 2 sowie die beiden Gene des Operon 5 finden sich keine Homologe mit dem NCBI-Programm. Andererseits wurden die ORFs 1a, 3a, 8, 10a, 13, 14a, 15 und 15a von FgenesB nicht gefunden. Unter Verwendung eines weiteren SoftBerry-Tools (BPROM) zur Vorhersage bakterieller Promotoren [131] wurden mögliche Promotoren für die fünf putativen Operons identifiziert Abbildung A.2. Die experimentelle Überprüfung der Operon-Hypothese erfolgte mittels RT-PCR (s. 3.3.5.2).

#### 3.3.3.2 Transmembrane $\alpha$ -Helices

Alpha-helicale Transmembrandomänen finden sich vorrangig in Proteinen der zytoplasmatischen Bakterienmembran, während transmembrane  $\beta$ -Faltblätter ausschließlich in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterienspezies zu finden sind [162]. Die Vorhersage dieser Strukturen könnte daher Hinweise auf die Funktion des Proteins liefern. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Leserahmen wurden mit dem SOSUI-Programm auf transmembrane  $\alpha$ -Helices untersucht [133]. Für die ORFs 1, 4, 10a, 13 und 13a war das Vorhersage-Ergebnis positiv (Abbildung 3.10).





**Abbildung 3.10:** Darstellung putativer transmembraner  $\alpha$ -Helices für die Leserahmen 1, 4, 10a, 13 und 13a

### 3.3.3.3 $\beta$ -Faltblattstrukturen

Mit Hilfe eines Programmes, das für die Vorhersage transmembraner  $\beta$ -Faltblätter in OMPs (*outer membrane proteins*) Gram-negativer Bakterienspezies entwickelt wurde [129], sollte festgestellt werden, ob einzelne Leserahmen evtl. für Proteine der äußeren Zellmembran kodieren. Das Programm sagt für die ORFs 11, 12 und 13 derartige Strukturen voraus (Abbildung 3.11), was die Ergebnisse der BLAST-Analyse, wonach es sich bei den ORFs 11 und 12 um putative DNA-Transferproteine und bei ORF 13 wahrscheinlich um ein Membranprotein handelt, unterstützt.

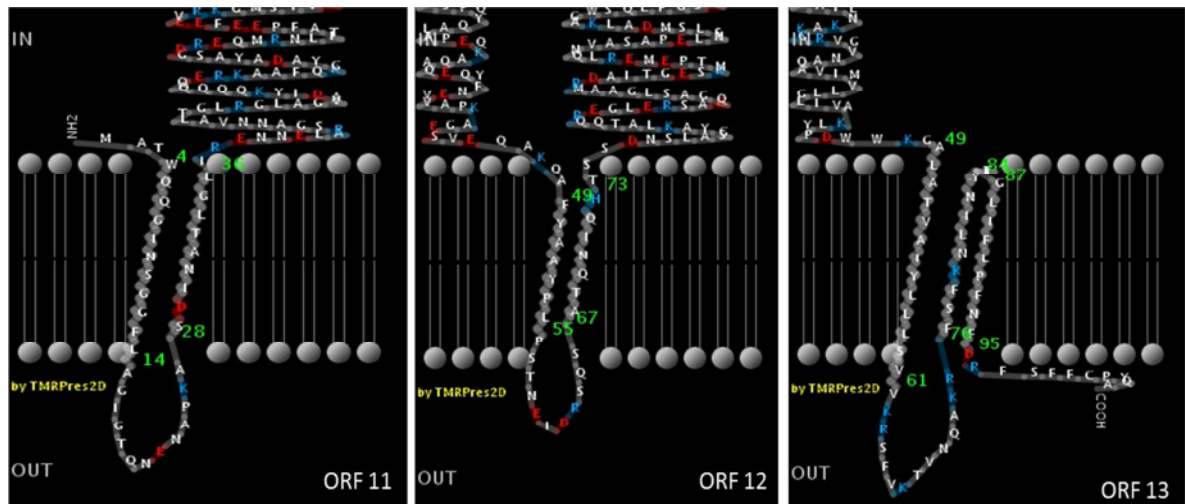


Abbildung 3.11: Vorhergesagte  $\beta$ -Faltblattstrukturen für die Leserahmen 11, 12 und 13

### 3.3.3.4 Subzelluläre Lokalisation

Das Programm SOSUI-GramN geht noch einen Schritt weiter und ermöglicht es nach Aussage der Autoren, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen vorherzusagen [134]. Angewendet auf die Leserahmen des Insertionselementes ergaben die Berechnungen, dass die Mehrzahl für zytosolische Proteine kodiert. Beim ORF 11-Produkt handelt es sich nach diesem Programm um ein extrazelluläres Protein, bei den Leserahmen 4, 10a und 13 um Proteine der inneren Membran. In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse für die einzelnen ORFs zusammengefasst.

| Bezeichnung | Segment-Länge (AS) | Subzelluläre Lokalisation |
|-------------|--------------------|---------------------------|
| ORF1        | 354                | Zytoplasma                |
| ORF 1a      | 71                 | Zytoplasma                |
| ORF 1b      | 47                 | keine Angabe              |
| ORF 2       | 101                | Zytoplasma                |
| ORF 3       | 277                | Zytoplasma                |
| ORF 3a      | 83                 | Zytoplasma                |
| ORF 4       | 295                | innere Membran            |
| ORF 5       | 64                 | keine Angabe              |
| ORF 6       | 87                 | Zytoplasma                |
| ORF 6a      | 73                 | Zytoplasma                |

|         |     |                |
|---------|-----|----------------|
| ORF 7   | 200 | Zytoplasma     |
| ORF 8   | 526 | Zytoplasma     |
| ORF 9   | 526 | Zytoplasma     |
| ORF 9a  | 76  | Zytoplasma     |
| ORF 10  | 245 | Zytoplasma     |
| ORF 10a | 70  | innere Membran |
| ORF 10b | 46  | keine Angabe   |
| ORF 11  | 488 | Extrazellulär  |
| ORF 12  | 704 | Zytoplasma     |
| ORF 13  | 105 | innere Membran |
| ORF 13a | 123 | Zytoplasma     |
| ORF 14  | 291 | Zytoplasma     |
| ORF 14a | 87  | Zytoplasma     |
| ORF 15  | 93  | Zytoplasma     |
| ORF 15a | 61  | Zytoplasma     |
| ORF 16  | 180 | Zytoplasma     |
| ORF 17  | 120 | Zytoplasma     |

**Tabelle 3.7: Vorhersage der subzellulären Lokalisation der einzelnen ORF-Produkte**

### 3.3.3.5 Putative Effektorproteine

Obwohl in Typ III-sekretierten Proteinen auf Sequenzebene kein konserviertes Sekretionsmotiv gefunden wurde, geht man davon aus, dass das für die Translokation benötigte Signal in den ersten 15 - 20 N-terminalen Aminosäuren (oder mRNA-Codons) determiniert ist [163]. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden mehrere Freeware-Tools zur Identifizierung von Typ III-Effektoren entwickelt. In dieser Arbeit wurden folgende Programme benutzt: EffectiveT3 der Uni Wien [126] und gecco!® der Uni Frankfurt [127]. Ersteres stufte drei Genprodukte des 18.4 kb Fragmentes als wahrscheinlich Typ III-sekretiert ein, letzteres vier. Übereinstimmung gab es allerdings nur für ORF 10. Dass beide Anwendungen keine exakte Vorhersage liefern, wird deutlich, wenn man die Aminosäuresequenzen von nicht Typ III-sekretierten Proteinen analysieren läßt. So stufte das EffectiveT3-Programm VgrG, ein Typ VI-sekretiertes Protein von *V. cholerae*, als Typ III-Effektor ein; gecco!® sagte sogar DnaK, ein bakterielles Hsp70-

Homolog und zytosolisches Protein als Typ III-sekretiert voraus. Ebenso wurden bekannte Typ III-sekretierte Proteine von beiden Programmen nicht als solche erkannt.

#### 3.3.3.6 Chaperon-Bindedomäne

Für die meisten Typ III-Effektoren ist die Bindung an ein spezifisches Chaperon Bedingung für eine effektive Translokation, so dass neben dem N-terminalen Signalmotiv auf Aminosäure- oder mRNA-Ebene eine weitere Sequenz von Bedeutung ist: die sog. Chaperon-Bindedomäne (CBD), die sich *downstream* der Sekretionssequenz innerhalb der ersten ca. 140 N-terminalen Aminosäuren befindet [164]. Neuere Studien weisen darauf hin, dass es gemeinsame Strukturen gibt, die die Bindung eines Effektors an sein Chaperon bewirken. So zeigen Kristallstrukturen von Typ III-Chaperonen, dass diese eine hydrophobe Tasche gemeinsam haben, die mit dem sog.  $\beta$ -Strang-Motiv des Effektors interagiert [165]. Sequenz-Vergleiche verschiedener Typ III-Effektoren von *Salmonella* und *Shigella* ergeben ein konserviertes  $\beta$ -Strang-Motiv, das drei hydrophobe Aminosäure-Reste an den Positionen 1, 5 und 8 enthält, die von variablen Resten separiert werden: [(LMIF)<sub>1</sub>XXX(IV)<sub>5</sub>XX(IV)<sub>8</sub>X(N)<sub>10</sub>] [166]. Asparagin an Position 10 kommt nicht in allen Effektoren vor. Der *Salmonella*-Effektor SipA unterscheidet sich zudem an Position 8, wo er Leucin anstelle von Valin oder Isoleucin trägt. Untersucht man die N-terminale Aminosäuresequenz des ORF 10-Produktes so findet man ein SipA-ähnliches Motiv (Abbildung 3.12). Da das EffectiveT3-Programm und gecco!® das ORF 10-Produkt übereinstimmend als Typ III-Effektor charakterisierten und zudem ein  $\beta$ -Strang-Motiv ähnlich dem anderer Typ III-Effektoren gefunden wurde, das möglicherweise die Bindung an ein Chaperon ermöglicht, wurde die Sekretion ORF 10-Produktes experimentell überprüft (s. 3.6.3).

|       |  |
|-------|--|
| IpaA  | MHNVNNTQAPTFLYKATSPSPSTEYSELKSKISDIHSSQTSCLKTPASV      |
| OspB  | MNLDGVRPYCRIVNKKNESISDIAFAHIKRVKNSSCTHPKAALV           |
| OspC1 | MNISETLNSANTQCNIDSMNRLHTLFPKVTSVRNAAQQTMPDEKN          |
| OspC2 | MKIPEAVNHINVQNNIDLVDGKINPNKDTKALQKNISCVTNSSSSGISEKHL   |
| OspC3 | MKIPEAVNHINVQNNIDLVDGKTNPKNKATKALQKNVLRVTNSSSSGISEKHL  |
| OspD1 | MSINNYGLHPANNKNMHLIIGSNTANENKGMKNNIINVTNTAISHAINEEK    |
| OspD2 | MPLNKTFSSTIFSTKNSLSTDMSVNRDNRTITSSIMRVSNSSSELIQFKNKT   |
| IpgB1 | MQILNKILPQVEFAIPRPSFDSLNRNKLVKKILSVFNLKQRFQKNFG        |
| IpgB2 | MLGTSFNNFGISLSHKRYFSGKVDEIIRCTMGKRIVKISSTKINTSILSSV    |
| SipA  | MVTSVRTQPPVIMPGMQTEIKTQATNLAANLSAVRESATATLSGEIK        |
| SopE1 | VTKITLSPQNFRIQKQETTLKEKSTKNSLAKSILAVKNHFIELRSKLSE      |
| SopE2 | VTNITLSTQHYRIHRSDVEPVKEKTTEKDIFAKSITAVRNSFISLSTSLSD    |
| SopA  | MKISSGAINFSTIPNQVKKLITSIREHTKNGLTSTKITSVKNTHTSLEKFKT   |
| ORF10 | MNNNYCIPQGMTRTEREELKSFATQCGNAGDIQSLERTLIMIAHWMRQGQRVSF |

Abbildung 3.12: Gemeinsames  $\beta$ -Strang-Motiv putativer Chaperon-Bindedomänen

Der Aminosäuresequenz-Vergleich von Costa *et al.* [166] wurde um die Sequenz des ORF10-Produktes der 18.4 kb Insel ergänzt.

### 3.3.4 Single-ORF-PCR

Die unter 3.2.3 beschriebene 5-Primer PCR erlaubt es lediglich, das 5'- und das 3'-Ende der 18.4 kb Insel nachzuweisen; das gesamte Element ist für eine konventionelle PCR-Reaktion zu groß. Um festzustellen, ob die gesamte Insel vorhanden ist, wurden daher Primer für die einzelnen ORFs generiert, die in 4 Multiplex-Ansätzen die Detektion der 17 primär festgelegten Leserahmen erlauben. Während des Screenings auf das Vorhandensein der 18.4 kb Insertion fiel auf, dass vereinzelt Stämme vorkommen, die in der Multiplex-PCR nur eins der beiden erwarteten Insel-Produkte zeigen. Diese Isolate wurden nachfolgend der Single-ORF-PCR unterzogen, außerdem wurden die flankierenden Regionen zu beiden Seiten der Insel untersucht. Hieraus wurde ersichtlich, dass fünf verschiedene „Inselmuster“ beobachtet werden konnten (s. auch Tabelle 3.8):

1. Nur 3' Inselende nachweisbar, aber alle ORFs vorhanden (3 x DT193)
2. Nur 3' Inselende nachweisbar; ORFs 8-11 sowie 13-14 fehlen (1 x DT193)
3. Nur 5' Inselende nachweisbar; ORFs 13, 14 und 16 nicht vorhanden (2 x DT7)
4. Nur 5' Inselende nachweisbar; ORFs 12, 13, 14, 16 und 17 nicht vorhanden (6 x DT7)
5. Kein Produkt für die Insel-Enden; keiner der 17 ORFs nachweisbar (1 x DT193, 1 x DT7, 1 x rau)

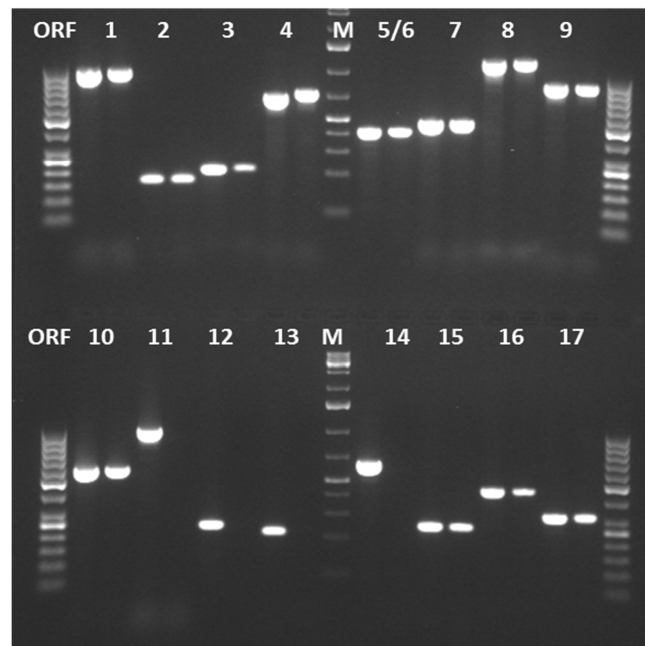
| RKI-Nr.  | Lyso<br>typ<br>DT | Insel-PCR<br>Produkt | 5'<br>flank.<br>Reg. | Leserahmen    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    | 3'<br>flank.<br>Reg. |
|----------|-------------------|----------------------|----------------------|---------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----------------------|
|          |                   |                      |                      | 1<br>bis<br>7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |                      |
| 09-05670 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +                    |
| 09-05637 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +                    |
| 09-05539 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +                    |
| 09-07173 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +                    |
| 08-06815 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +                    |
| 08-05598 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +                    |
| 09-05170 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | +  | -  | -  | +  | -  | +  | +                    |
| 06-03518 | 7                 | 5'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | +  | -  | -  | +  | -  | +  | +                    |
| 11-01010 | 193               | 3'-Ende              | -                    | +             | - | - | -  | -  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +                    |
| 09-05700 | 7                 | kein Prod.           | -                    | -             | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +                    |
| 01-06288 | rau               | kein Prod.           | -                    | -             | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +                    |
| 09-02224 | 193               | kein Prod.           | -                    | -             | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +                    |
| 09-07740 | 193               | 3'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +                    |
| 09-07744 | 193               | 3'-Ende              | +                    | +             | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +                    |
| 09-05691 | 193               | 3'-Ende              | -                    | +             | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +                    |

**Tabelle 3.8: Isolate mit unvollständiger 18.4 kb Insel nach Single-ORF-PCR**

Für die drei Proben, die mit Hilfe der 5-Primer-PCR gar kein Produkt ergaben, konnte gezeigt werden, dass sie für keinen der siebzehn primären Leserahmen kodieren. Zudem war bei ihnen die Region *upstream* der 18.4 kb Insertion verändert, so dass der entsprechende Primer scheinbar nicht binden konnte. Damit war auch keine Aussage möglich, ob in diesen Stämmen der *thrW* tRNA-Locus frei oder von einem Phagen besetzt ist (vergl. 3.2.3). Alle acht Isolate, bei denen nur das 5'-Ende der Insel (1128 bp) nachgewiesen werden konnte, gehörten dem Lyso typ DT7 an; ihnen fehlten die ORFs (12), 13, 14, 16, (17). Da eine Primerbindungsstelle für das 3'-Ende im ORF 16 liegt, fehlt das Produkt auch in den beiden Isolaten, die ORF 17-positiv

sind. Weiterhin wurden vier DT193-Isolate gefunden, in denen die Multiplex-PCR nur das Produkt für das 3'-Ende ergab. In dreien davon waren alle ORFs nachweisbar, dem vierten fehlten große Teile aus der Mitte der Insel. Bei diesem und einem mit vollständiger Insel waren die flankierenden Regionen *upstream* der Insel ebenfalls verändert und ließen wahrscheinlich keine adäquate Primerbindung zu. Bei den beiden übrigen DT193-Stämmen mit vollständiger Insel ergaben auch die flankierenden Regionen die erwarteten Produkte. Warum hier wiederholt nur das 3'-Produkt detektiert werden konnte, bleibt nach dieser Untersuchung unklar; hier könnte nur die Sequenzierung der flankierenden Region *upstream* der Insel Aufschluss geben. Zehn mitgeführte Vergleichsstämme mit dem typischen Ergebnis in der Multiplex-PCR zeigten die erwarteten Produkte für alle 17 ORFs.

Weiterhin können m. H. der Single-ORF-PCR auch Isolate anderer Serovare / Spezies untersucht werden. Hier stieß die 5-Primer-Multiplex PCR an ihre Grenzen, da sie nur unter der Voraussetzung funktioniert, dass die 18.4 kb Insertion stets an der gleichen Stelle im Genom integriert ist und die benachbarten Sequenzen immer identisch sind, da zwei der fünf Primer in den insel-flankierenden Regionen binden. Im Zuge dieser Arbeit wurden 20 *Salmonella enterica*-Isolate getestet, die nicht dem Serovar Typhimurium bzw. seiner monophasischen Variante zuzuordnen waren (achtzehn weitere Serovare der Ssp.I sowie je ein Isolat der Ssp. IIIb und IV). Die Ergebnisse der 5-Primer-PCR ergaben dabei mehrfach eine sehr schwache Bande von ca. 1000 bp, also von ähnlicher Größe wie das 5'-Ende der Insertion (1128 bp). Eine anschließende ORF-PCR für die Leserahmen 1, 10 und 16 zeigte dagegen in keinem der Stämme ein positives Resultat, was zu dem Schluss führte, dass das 18.4 kb Fragment in keinem der 20 getesteten Isolate vorhanden ist. Dagegen gelang es, einzelne Leserahmen in mehreren *Shigella dysenteriae* bzw. *boydii*-Stämmen nachzuweisen, was nicht verwunderte, da Nukleotid-BLAST-Analysen mehrere Abschnitte mit > 95% Homologie zwischen dem 18.4 kb Element und diversen *Shigella*-Genomen aufgezeigt hatten. Die größten homologen Bereiche wurden allerdings in *E. coli* ETEC H10407 gefunden. Ein Isolat dieses Typs befindet sich in der NRZ-Stammsammlung (RKI 05-04575) und wurde der Single-ORF-PCR unterzogen. Die Leserahmen 1 – 10 sowie 15 – 17 konnten amplifiziert werden, die ORFs 11 – 14 dagegen nicht (Abbildung 3.13). Diese Resultate korrespondieren mit den BLAST-Ergebnissen (vergl. Abbildung A.1).



**Abbildung 3.13: Single-ORF-PCR**

**Vergleich von RKI 06-01900 (STM monophasisch) und RKI 05-04575 (ETEC H10407)**

Mit Hilfe der Single-ORF-PCR konnten die BLAST-Ergebnisse bestätigt werden, wonach Teile der 18.4 kb Insel in *Salmonella*-verwandten Gattungen innerhalb der Enterobakterien-Familie vorkommen. Annotierte Sequenzen, die das Vorhandensein der Insel in anderen *Salmonella*-Serovaren oder Subspezies belegen, waren bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht verfügbar; ein diesbezüglicher experimenteller Nachweis konnte ebenfalls nicht erbracht werden. Hierzu sollte angemerkt werden, dass nur 20 Nicht-Typhimurium-Isolate untersucht wurden und in den Sequenzdatenbanken nur begrenzt komplette Genomsequenzen seltenerer *Salmonella* Ssp. bzw. Serovare zur Verfügung stehen.

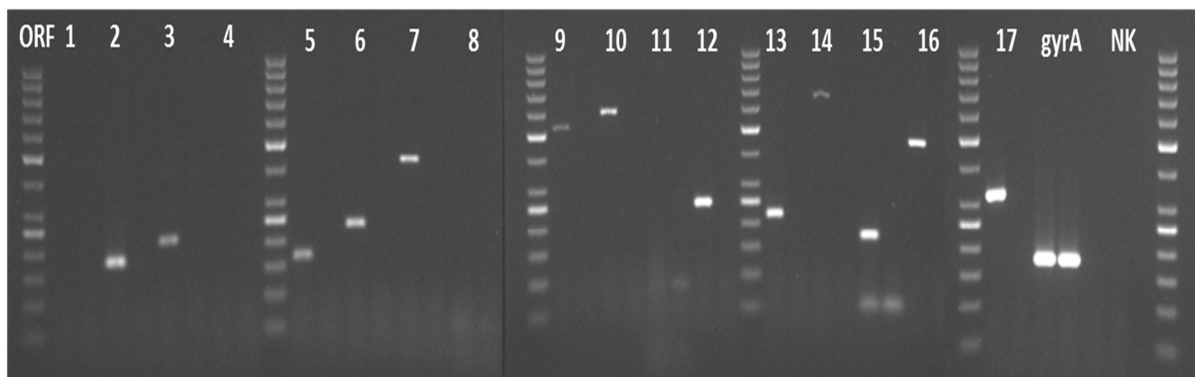
### **3.3.5 Nachweis der Transkription**

#### **3.3.5.1 RT-PCR für die einzelnen Leserahmen der 18.4 kb Insel**

Mit Hilfe der einzelnen ORF-Primer sollte aber nicht nur die Vollständigkeit der 18.4 kb Insel überprüft werden, sondern es sollte v. a. gezeigt werden, dass die einzelnen Leserahmen auch transkribiert werden, da dies eine unabdingbare Voraussetzung für die Funktionalität des integrierten Elementes darstellt. Nach RNA-Isolation und DNase-Verdau wurden unter Verwendung des unter 2.4.1.5 genannten One-Step-RT-PCR-Kits einzelne PCR-Reaktionen für alle 27 Leserahmen angesetzt, denen ein reverser Transkriptionsschritt vorangestellt ist. Als



Positivkontrolle diente die konstitutiv exprimierte *gyrA*-Untereinheit der *Salmonella* DNA-Gyrase A. Um eine Verunreinigung mit DNA auszuschließen, wurde jeweils eine *gyrA*-Kontrolle ohne RT-Schritt mitgeführt (NK). Die Ergebnisse eines RT-PCR-Ansatzes für die siebzehn primär definierten ORFs sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Transkription der Leserahmen 1, 4, 8 und 11 konnte in Wiederholungsexperimenten mit z. T. neuen Primern ebenso bewiesen werden wie die der nachträglich festgelegten Leserahmen mit Ausnahme von ORF 1a. Insgesamt konnte damit die Transkription für 26 von 27 Leserahmen gezeigt werden. Diese Ergebnisse demonstrieren die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Insel-Gene.



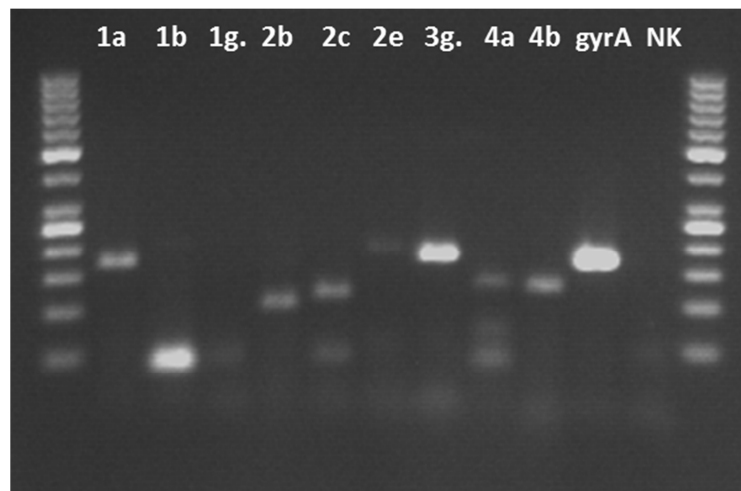
**Abbildung 3.14: Reverse Transkriptase-PCR**

Agarosegele für die Produkte der ORFs 1 – 17 nach RT-PCR

### 3.3.5.2 RT-PCR für die putativen Operons der 18.4 kb Insel

Zur Verifizierung der fünf vorhergesagten Operon-Strukturen (Abbildung A.2) wurden Primer generiert, deren PCR-Produkte die intergenischen Bereiche zwischen zwei Leserahmen einschließen. Sind die angrenzenden ORFs in einem Operon organisiert, sollte eine durchgehende mRNA gebildet werden, während bei Einzelgenen das Transkript am Stopcodon des ersten Leserahmens endet. Die Sequenzen zwischen je zwei benachbarten ORFs konnten für alle putativen Operons amplifiziert werden, einzige Ausnahme war die intergenische Region zwischen den ORFs 2 und 3 (Operon 1), wofür kein Transkript nachgewiesen werden konnte. Die Produkte zeigten jedoch teilweise nur sehr schwache Banden im Agarosegel, obwohl die Bedingungen im Vergleich zur Single-ORF-RT-PCR nicht verändert wurden. Zudem gelang es nicht, ein mehr als zwei Gene umfassendes Produkt zu detektieren. Dennoch konnte mit Hilfe der genübergreifenden Reverse-Transkriptase-PCR die

Operon-Vorhersage grundsätzlich bestätigt werden. Die Resultate eines exemplarischen Operon-RT-PCR-Ansatzes sind in Abbildung 3.15 dargestellt.



**Abbildung 3.15: RT-PCR zum Nachweis genübergreifender Transkripte**

Produkte der intergenischen Bereiche zwischen folgenden Operon-Genen:

- |                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 1a) Gen 1 - 2 Operon 1 (positiv)  | 3g) Gen 1 - 2 Operon 3 (positiv)      |
| 1b) Gen 2 - 3 Operon 1 (positiv)  | 4a) Gen 1 - 2 Operon 4 (positiv)      |
| 1g) Gen 1 - 3 Operon 1 (negativ)  | 4b) Gen 2 - 3 Operon 4 (positiv)      |
| 2b) Gen 2 - 3 Operon 2 (positiv)  | Positivkontrolle gyrA (positiv)       |
| 2c) Gen 3 - 4 Operon 2 (positiv)  | Negativkontrolle gyrA ohne RT-Schritt |
| 2e) Gen 5 - 6 Operon 2 (fraglich) |                                       |

| Operon-Nr. | Anzahl Gene | ORF-Entsprechungen | Genübergreifende Transkripte | Nachweis des gesamten Operons |
|------------|-------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1          | 3           | 1b, 2, 3           | z. T.                        | nein                          |
| 2          | 6           | 4*, 5, 6, 6a, 7    | ja                           | nein                          |
| 3          | 2           | 9a, 10             | ja                           | ja                            |
| 4          | 3           | 10b, 11, 12        | ja                           | nein                          |
| 5          | 2           | keine              | ja                           | ja                            |

**Tabelle 3.9: Bestätigung der vorhergesagten Operons der Insel mittels RT-PCR**

\* die ersten beiden putativen Gene des Operons 2 entsprechen nur z. T. dem ORF4 der NCBI-Vorhersage

### 3.4 Deletion und Re-Insertion des 18.4 kb Fragmentes

Zur funktionellen Charakterisierung der Insel wurde diese m. H. der One-Step-Methode nach Datsenko und Wanner [138] im monophasischen STM-Stamm RKI 08-5217 gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Nachfolgend wurde die Kassette durch P22-HT-Transduktion in den Stamm RKI 06-1900 übertragen, was in diesem Stamm ebenfalls zum Verlust des 18.4 kb Elementes führte. Eine Komplementierung mittels Plasmid war aufgrund der Größe des Fragmentes nicht möglich, so dass als Alternative die Insel wiederum durch Transduktion in die Deletionsmutante zurück übertragen wurde. Um diese Revertanten vom Wildtyp unterscheiden zu können, wurde die Insel vorab mit einer Chloramphenicol-Resistenzkassette versehen (s. 2.4.9). Diese Markierung erlaubt es zudem, die Insel in beliebige (chloramphenicol-sensitive) *S. Typhimurium*-Rezipienten zu transduzieren und positive Klone zu selektieren. So wurde das 18.4 kb Element beispielsweise in die biphasischen STM-Laborstämme A36, SL1344, ATCC14028 und LT2 übertragen und die Stammpaare teilweise in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

#### 3.4.1 Vergleichende Lysotypie

Unterzog man die Wildtypstämme und die entsprechenden Deletions- bzw. Insertionsmutanten der Lysotypie nach Anderson fiel auf, dass sich das Lysisbild verändert hatte. Im Falle des monophasischen Stammpaares war der 18. Phage des Anderson-Sets in der Lage, die Deletionsmutante (2) zu lysieren, den Wildtyp mit Insel (1) dagegen nicht (rot eingerahmte Bereiche). In der Revertante (3) war das ursprüngliche WT-Muster wieder hergestellt (Abbildung 3.16).

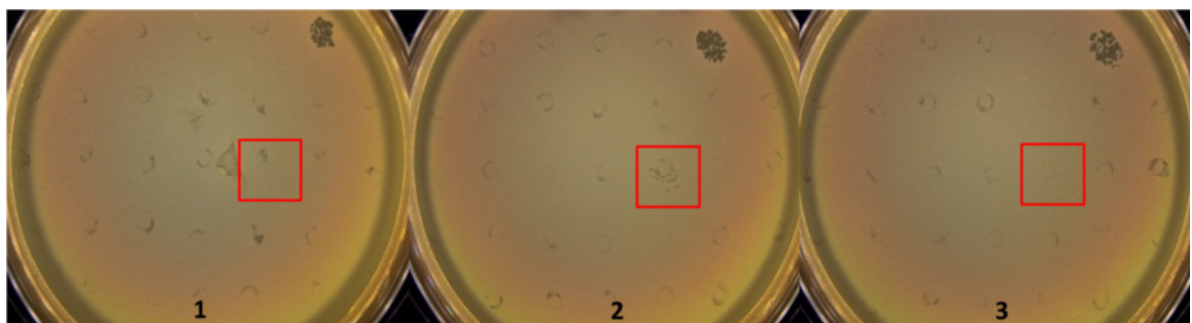
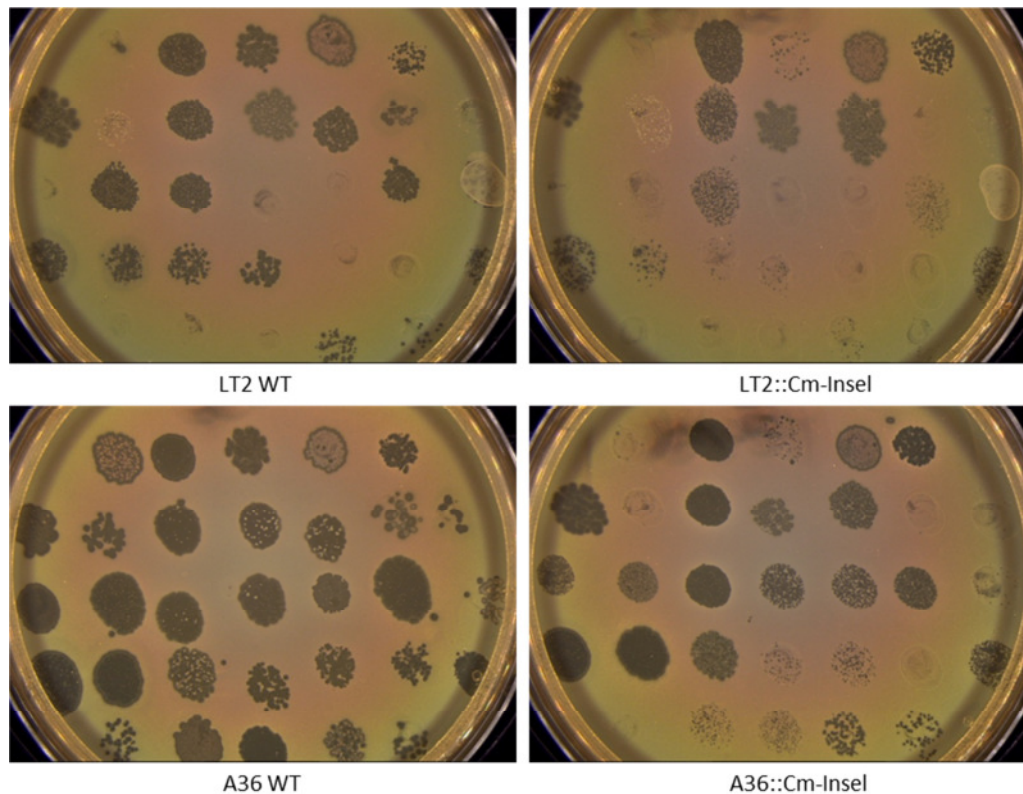


Abbildung 3.16: Vergleichende Lysotypie 1

Verglichen wurden RKI 06-1900 WT (1), Deletionsmutante (2) und Revertante (3)

Ein noch deutlicheres Bild zeigte sich für die Stämme, in welche die 18.4 kb Insel durch Transduktion übertragen wurde; diese wurden weniger stark lysiert als ihr korrespondierender Wildtyp (Abbildung 3.17). Übereinstimmend wurde festgestellt, dass die Insel-tragenden Stämme, unabhängig davon, ob sie diese ursprünglich besaßen oder sie durch Transduktion eingefügt wurde, weniger empfindlich gegenüber der Typisierphagen-Lyse waren, als Stämme ohne Insel.



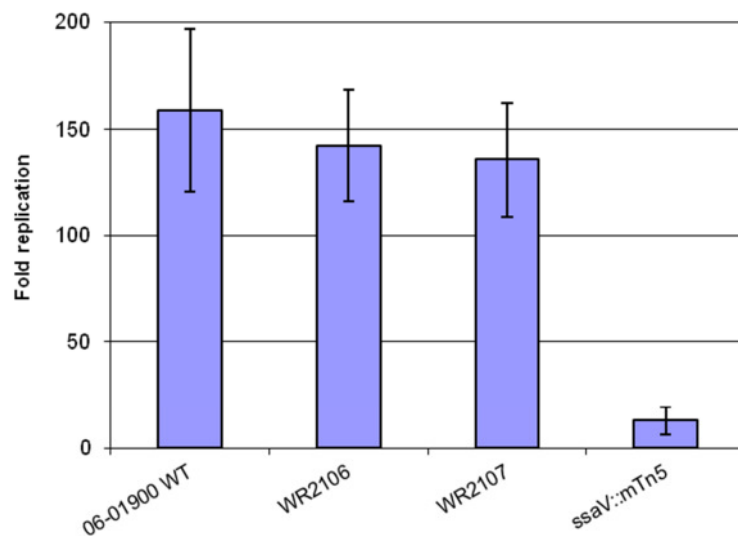
**Abbildung 3.17: Vergleichende Lysotypie 2**

Verglichen wurden die biphasischen STM-Laborstämme LT2 und A36 sowie ihre korrespondierenden Insel-Insertionsmutanten

### **3.4.2 Zellinfektionsversuche**

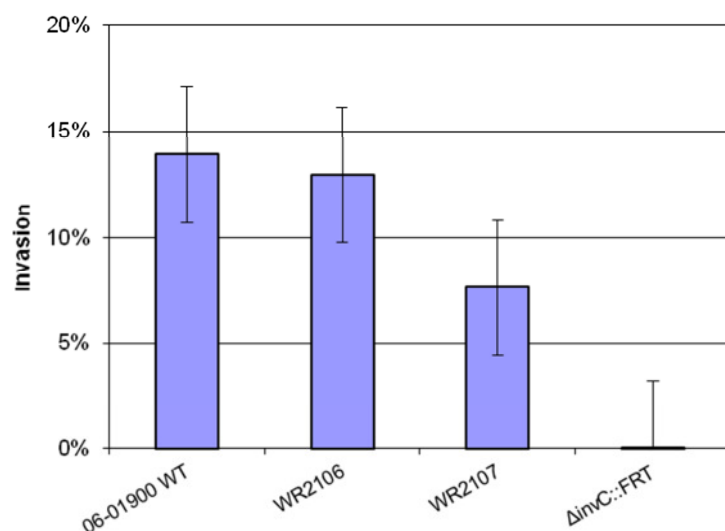
Die *in vitro* Infektion von geeigneten Zelllinien mit Wildtyp, Insel-Deletionsmutante (WR 2106) und Revertante (WR 2107) sollte Aufschluss darüber geben, ob die hier beschriebene genomische Insel die Invasion und / oder Replikation der monophasischen STM-Variante in der eukaryontischen Zielzelle beeinflusst. Für die Infektionsversuche wurden die Maus-Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zur Darstellung der intrazellulären Replikationsfähigkeit sowie die polarisierte Epithelzelllinie MDCK zur Bestimmung der Invasionsraten verwendet.

Obwohl die Ergebnisse der einzelnen Experimente hinsichtlich der erreichten Invasions- bzw. Replikationsraten sehr inkonsistent waren, konnten für beide Infektionsmodelle verwertbare Resultate erzielt werden. Unterschiede in der Invasions- bzw. Replikationsfähigkeit zwischen Wildtyp und Deletionsmutante wurden aber nicht beobachtet. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse für ausgewählte Experimente der RAW 264.7 (Abbildung 3.18) und der MDCK-Infektion (Abbildung 3.19) dargestellt.



**Abbildung 3.18: RAW264.7 Makrophagen-Infektion (MOI 2)**

Die Replikationsrate ist als Quotient aus den 16h-Werten und den 2h-Werten dargestellt.



**Abbildung 3.19: MDCK Epithelzell-Infektion (MOI 2)**

Die Invasionsrate ist als Quotient aus den 2h-Werten und den Inokuli dargestellt.

### 3.4.3 Wildtyp, Deletionsmutante und Revertante im Maus-Colitismodell

Die im Labor von Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt in Zürich durchgeführten *in vivo*-Versuche am Maus-Colitis-Modell zeigten in Übereinstimmung mit den *in vitro* Zellinfektionsversuchen keine Unterschiede zwischen Wildtyp, Deletionsmutante und Revertante hinsichtlich der Besiedelung der untersuchten Organe. Pro *Salmonella*-Stamm waren drei C57Bl/6-Mäuse oral infiziert worden. Zwei Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und die koloniebildenden Einheiten (cfu) des entsprechenden *Salmonella*-Stammes in Leber, Milz, mesenterialen Lymphknoten und Cecum bestimmt (Abbildung 3.20). Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Infektionsexperimenten geschlossen werden, dass die 18.4 kb Insel das Invasions- und Replikationsvermögen der monophasischen STM-Variante wahrscheinlich nicht beeinflusst.

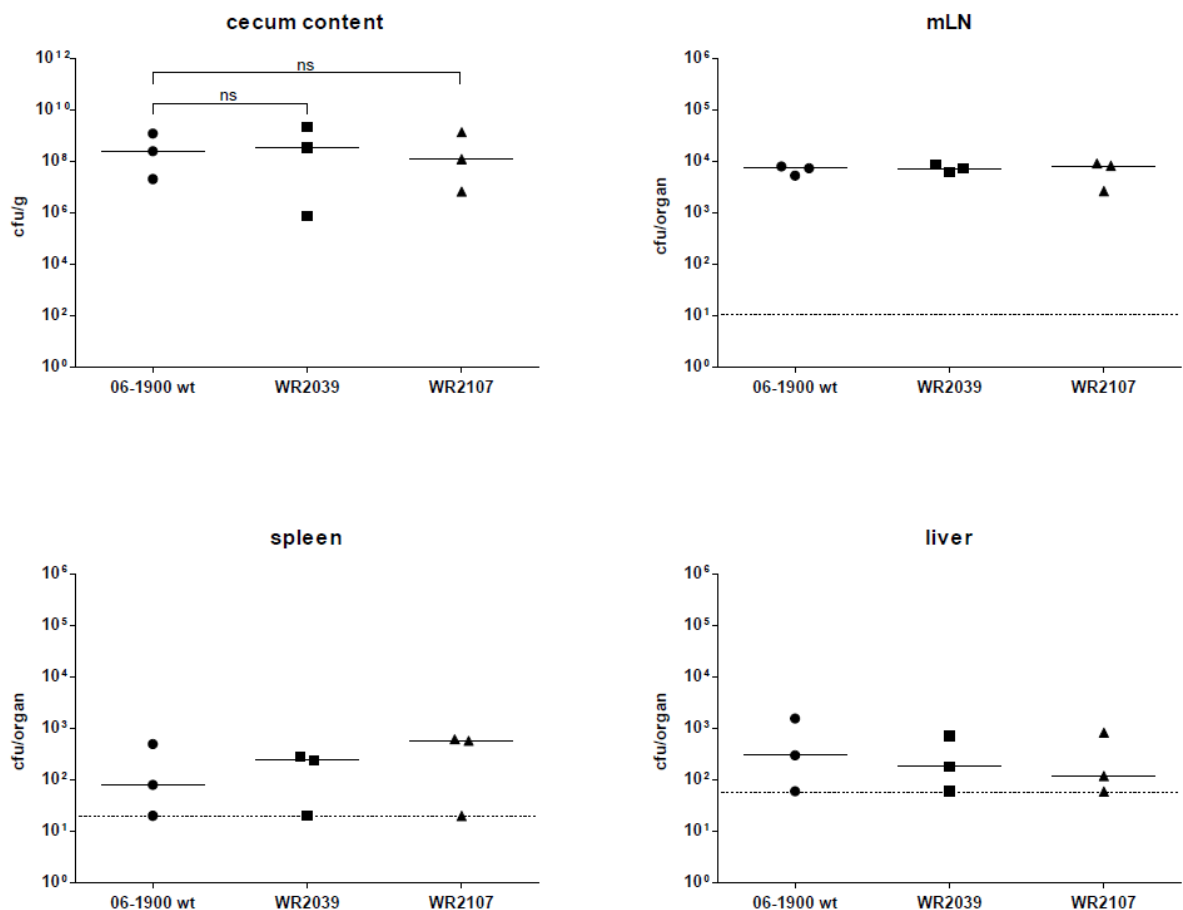


Abbildung 3.20: Maus-Infektionsversuch

Die Ergebnisse aus dem Maus-Colitis-Modell zeigten keine Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Revertante hinsichtlich der Besiedelung der untersuchten Organe.

### 3.5 Untersuchungen zur Mobilisierbarkeit der 18.4 kb Insel

#### 3.5.1 Nachweis eines zirkulären Zwischenproduktes

Davon ausgehend, dass das 18.4 kb Element nächst dem *thrW* tRNA-Locus wahrscheinlich über horizontalen Gentransfer erworben wurde und wesentliche Eigenschaften einer genomischen Insel aufweist (s. 4.4), sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Insel stabil in das Genom von (vorwiegend) monophasischen *S. Typhimurium*-Stämmen integriert ist oder ob sie nach wie vor in der Lage ist, sich von Zelle zu Zelle zu verbreiten. Ein spontaner Verlust des Elementes konnte während eines Langzeitversuchs über fast achtzehn Monate bei einer vierwöchigen Passage des Teststammes nicht festgestellt werden. Dabei wurde allerdings nur eine begrenzte Zahl an Kolonien getestet, so dass ein solches Deletions-Ereignis nicht ganz ausgeschlossen werden konnte. Da die horizontale Übertragung genomischer Inseln mit der Excision aus dem Wirtsgenom und der Bildung eines ringförmigen Zwischenproduktes einhergeht [110], wurde eine PCR entwickelt, die spezifisch die Sequenz des geschlossenen Rings nachweist (Abbildung 2.6). Für die *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) wurde beschrieben, dass hierfür zwei aufeinanderfolgende Amplifikationsschritte nötig sind, weil die Ringbildung so selten stattfindet, dass nach der ersten PCR-Runde noch kein Produkt detektierbar ist [42]. Im vorliegenden Fall wurden sowohl das gewünschte ca. 700 bp-Produkt für die nicht markierte Insel als auch das erwartete 2100 bp-Produkt für die Cm-markierte Insel bereits nach einem PCR-Durchlauf unter Verwendung von 100 ng Miniprep-DNA aus 3 ml ÜN-Kultur unter nicht selektiven Bedingungen nachgewiesen (Abbildung 3.21).

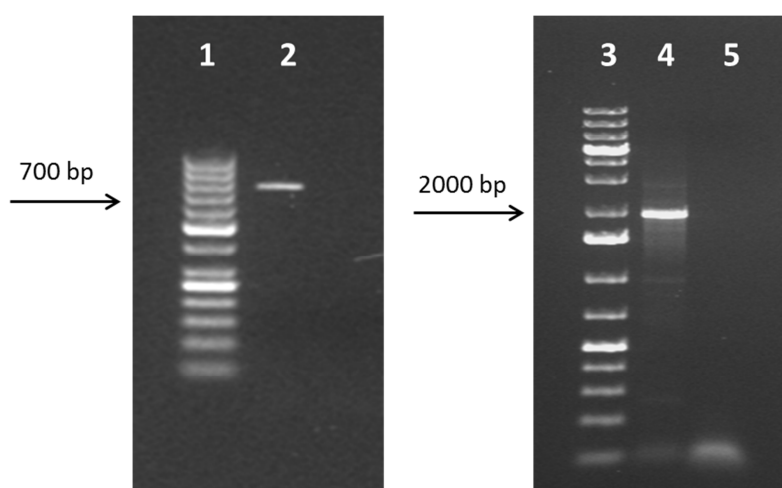


Abbildung 3.21: Agarosegele zum Nachweis zirkulären Zwischenproduktes der Insel

1) 50 bp Ladder; 2) unmarkierte Insel; 3) 1 kb plus Ladder; 4) Cm-markierte Insel; 5) NK

Durch die Sequenzierung der gereinigten Amplicons konnte zweifelsfrei belegt werden, dass es sich tatsächlich um die Ringschluss-Bereiche der zirkulären Intermediate handelt.

### 3.5.2 Übertragung der Insel durch Konjugation

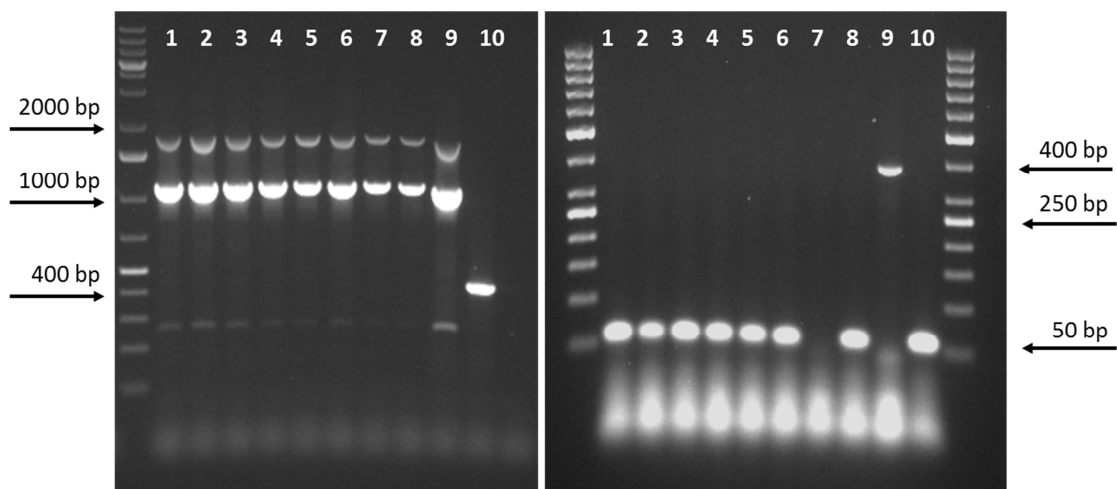
Die Bildung des ringförmigen Zwischenproduktes deutet auf die horizontale Übertragung genetischer Elemente durch Konjugation hin. Im folgenden Schritt sollte überprüft werden, ob es möglich ist, die Insel mittels dieser Übertragungsform in einen geeigneten Empfängerstamm zu transferieren. Zu diesem Zweck wurde der *Salmonella* Laborstamm LB5010 als Rezipient gewählt, ein Abkömmling von *S. Typhimurium* LT2, der aber aufgrund einer *galE*-Mutation serologisch rau ist, als zweite Geißelphase e,n,x anstelle des Typhimurium-typischen 1,2 exprimiert und eine Tetracyclin-Resistenzkassette trägt. Durch Mutation aller drei chromosomalen Restriktions-Modifikationssysteme ist dieser Stamm besonders als Rezipient für Konjugationsexperimente geeignet [135]. Als Donoren kamen WR 2076 sowie WR 2077 zum Einsatz. Bei WR 2076 handelt es sich um das monophasische STM-Patientenisolat RKI 08-05217, welchem eine Cm-Kassette *downstream* von ORF17 an die 18.4 kb Insel angefügt wurde (s. 2.4.9); WR 2077 ist ein Derivat von STM LT2, in das die Cm-markierte 18.4 kb Insel durch Transduktion übertragen wurde. Beide Rezipienten sind Tc-sensitiv. Transkonjuganten wurden auf Endo-Agar, der Chloramphenicol und Tetracyclin enthielt, selektiert und mittels der unter 3.2.3 beschriebenen PCR auf das Vorhandensein der Insel überprüft. Zusätzlich wurde das *fljB*-Gen für die 2. Geißelphase amplifiziert. Mit dem Stammpaar WR 2077 x LB5010 konnten zwei *filter-mating* Experimente erfolgreich durchgeführt werden; die Konjugationsrate (Transkonjuganten pro Rezipient) lag bei  $6.0 \times 10^{-3}$  und  $2.1 \times 10^{-3}$  für die verpaarten ü.N.-Kulturen bzw. bei  $4.4 \times 10^{-4}$  und  $1.2 \times 10^{-3}$  für die 2 Std.-Subkulturen. Mit WR 2076 als Donor wurden ebenfalls potenzielle Transkonjuganten erhalten, die Kolonien hatten aber einen glatten Phenotyp und in der *fljB*-PCR konnte nicht das e,n,x-Produkt des Rezipienten detektiert werden, so dass es sich hier höchstwahrscheinlich um Donor-Kolonien handelte, die trotz ihrer bestätigten Tetracyclin-Sensitivität auf den Selektivplatten gewachsen waren. Diese Experimente sollten ggf. mit höheren Antibiotika-Konzentrationen im Selektivmedium wiederholt werden. Wesentliche Unterscheidungsmerkmale von Donoren, Rezipient und Transkonjuganten sind in Tabelle 3.10 zusammengefaßt.



|                           | Donor WR 2076              | Donor WR 2077              | Rezipient LB5010 | Transkonjuganten           |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| <b>Phenotyp</b>           | glatt                      | glatt                      | rau              | rau                        |
| <b>2. Geißel-Phase</b>    | keine                      | 1,2                        | e,n,x            | e,n,x                      |
| <b>Resistenzmarker</b>    | Cm                         | Cm                         | Tc               | Cm + Tc                    |
| <b><i>thrW</i>-Stelle</b> | 18.4 kb Insel:: <i>cat</i> | 18.4 kb Insel:: <i>cat</i> | frei             | 18.4 kb Insel:: <i>cat</i> |

**Tabelle 3.10: Unterscheidungsmerkmale von Donoren, Rezipient und Transkonjuganten.**

Die Abbildung 3.22 zeigt die PCR-Ergebnisse eines erfolgreichen Transfer-Experiments. Die erwarteten Produktgrößen betragen 1128 + 1764 bp für die Cm-markierte Insel im *thrW*-Gen sowie 432 bp für den freien tRNA-Locus. Die beiden *fljB*-Varianten sind 400 bp (*fljB*<sub>1,2</sub>) bzw. 50 bp (*fljB*<sub>e,n,x</sub>) groß. Als DNA-Marker wurden der 1 kb plus Ladder (Insel-PCR) sowie der 50 bp Ladder (*fljB*-PCR) verwendet.



**Abbildung 3.22: Links Insel- und rechts *fljB*-PCR potenzieller Transkonjuganten  
1 – 8) Transkonjuganten; 9) Donor, 10) Rezipient**

Um auszuschließen, dass der genetisch stark modifizierte Rezipientenstamm möglicherweise natürliche Kompetenz besitzt und die Insel nicht konjugativ sondern über Transformation übertragen wurde, wurde der Rezipient LB5010 mit gereinigter Miniprep-DNA aus dem Donor (aus der seinerzeit das zirkuläre Intermediat nachgewiesen wurde) inkubiert und anschließend auf Nähragar- und Cm-Platten ausgespatelt. Während die Nähragarplatten stark bewachsen waren, zeigten sich auf den Selektivplatten keine Kolonien.

### **3.5.3 Integration der transferierten Insel in das *S. Typhimurium*-Chromosom**

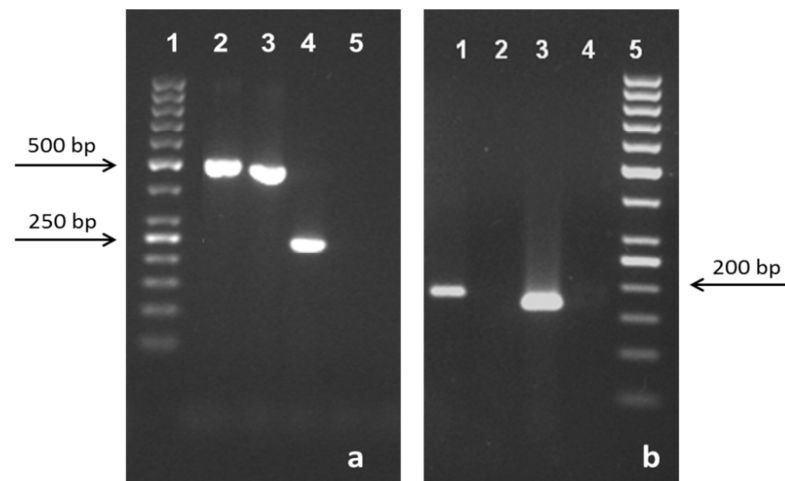
Die beiden typischen PCR-Produkte für das 5'- und das 3'-Ende der Insel erhält man nur, wenn sich das Element nächst dem *thrW* tRNA-Locus befindet, da zwei der fünf verwendeten Primer in den die Insel flankierenden chromosomalen Bereichen binden. Mit den dargestellten Resultaten (Abbildung 3.22) wurde demnach nicht nur die erfolgreiche horizontale Übertragung der 18.4 kb Insel gezeigt, es wurde gleichzeitig auch demonstriert, dass sie an spezifischer Stelle in das *S. Typhimurium*-Genom integriert wird.

## **3.6 Untersuchungen zur Funktion von Proteinen ausgewählter Leserahmen**

Bisher konnte gezeigt werden, dass das 18.4 kb Element, welches typischerweise nächst dem *thrW* t-RNA-Locus in (hauptsächlich) monophasischen STM-Isolaten lokalisiert ist, strukturelle Merkmale einer genomischen Insel aufweist und horizontal übertragen werden kann. Vergleichende Untersuchungen eines Insel-tragenden Isolates mit seiner Insel-deletierten Mutante zeigten keine Unterschiede hinsichtlich des Invasions- und Replikationsvermögens in den getesteten Zelllinien und im Maus-Colitis-Model. Auch Sequenzvergleichsanalysen lieferten kaum Anhaltspunkte zur Rolle des 18.4 kb Elementes im Allgemeinen und einzelner Leserahmen im Besonderen – die Funktion der Insel ist damit nach wie vor ungeklärt. Für die weitere funktionelle Charakterisierung sollten deshalb die Genprodukte ausgewählter Leserahmen näher untersucht werden.

### **3.6.1 C-terminale Markierung der ORFs 3a und 9a**

Die Produkte der beiden sehr kurzen Leserahmen 3a (252 bp) und 9a (241 bp) wurden durch das Effective T3-Programm der Universität Wien als Typ III-Effektoren eingestuft. Um diese Vorhersage zu überprüfen, wurde ORF 3a mit einem C-terminalen HA-Tag und ORF 9a mit einem FLAG-Tag versehen. Dies erfolgte mittels PCR, wobei die Primer so gewählt wurden, dass der markierte ORF zudem von Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in den Expressionsvektor pBAD24 flankiert wurde. Nach der Ligation des Inserts in den Vektor wurde dieser erfolgreich in *E. coli* DH5 $\alpha$  sowie in den monophasischen STM-Stamm RKI 08-05217 und seine Insel-deletierte Mutante WR 2039 transformiert (Primer Nr. 298/299; Abbildung 3.23). In WR 2039 wurde die Transkription der getaggtten Leserahmen mittels RT-PCR überprüft (Primer Nr. 169/170 und 173/174; Abbildung 3.23).

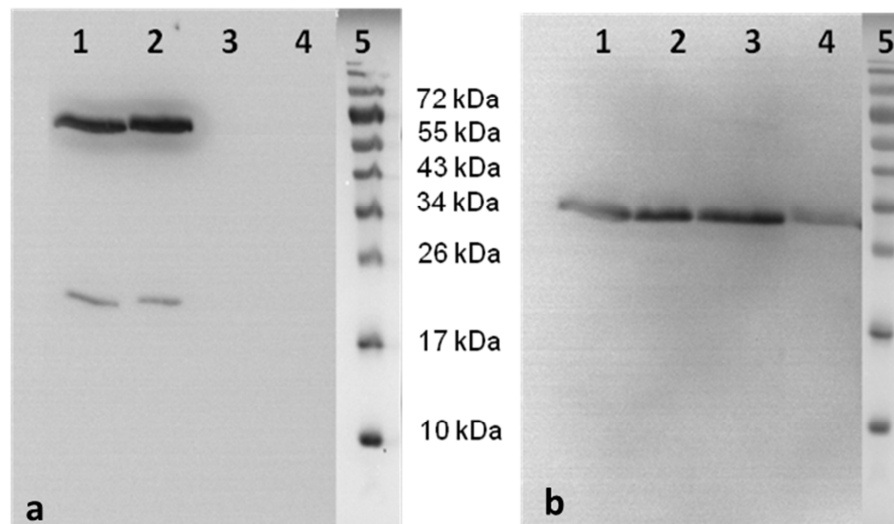


**Abbildung 3.23: a) Transformations- und b) Transkriptionskontrolle**

- |  |  |
|--|--|
| 1) 50 bp DNA Ladder                    | 1) WR 2039 / pBAD24 (3a::HA); 196 bp   |
| 2) WR 2039 / pBAD24 (3a::HA); 508 bp   | 2) wie 1) aber ohne RT-Schritt         |
| 3) WR 2039 / pBAD24 (9a::FLAG); 484 bp | 3) WR 2039 / pBAD24 (9a::FLAG); 169 bp |
| 4) WR 2039 / pBAD24 (leer); 244 bp     | 4) wie 3) aber ohne RT-Schritt         |
| 5) WR 2039 ohne Vektor                 | 5) 50 bp DNA Ladder                    |

### 3.6.2 Detektion der Genprodukte mittels Westernblot

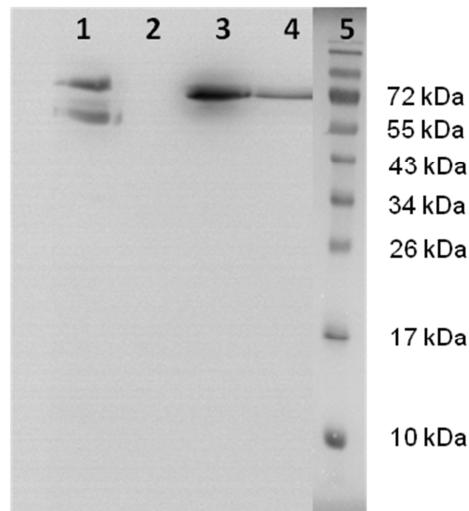
Zum Nachweis der markierten Genprodukte wurden die Proteine des Kulturüberstandes und der Pelletfraktion aufgearbeitet (s. 2.6) und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Übertragung auf eine PVDF-Membran im Semidry-Blotter und die Inkubation mit Tag-spezifischen Antikörpern. Zur Detektion kamen HRP-gekoppelte Sekundärantikörper zum Einsatz; die Visualisierung erfolgte über Chemilumineszenz. Von den zehn markierten ORF-Produkten konnten nur zwei im Westernblot nachgewiesen werden: das putative Prophagenprotein ORF 8::FLAG und der putative Typ III-Effektor ORF 10::HA. Während ORF 8::FLAG nur in der Pelletfraktion sowohl von *E. coli* als auch *S. Typhimurium* nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.24a), war das ORF 10::HA-Produkt auch in den Überständen beider Spezies zu finden (Abbildung 3.24b).



**Abbildung 3.24: Western Blot (a) ORF 8::FLAG (ca. 60 kDa) und (b) ORF 10::HA (ca. 30 kDa)**

- 1) *E. coli* DH5a Pelletfraktion
- 2) STM 08-05217 Pelletfraktion
- 3) *E. coli* DH5a TCA-gefällter Überstand
- 4) STM 08-05217 TCA-gefällter Überstand
- 5) Protein-Standard

Wenn der Leserahmen 10 für einen Typ III-Effektor kodiert, sollte das resultierende Protein zwar im Überstand des *Salmonella*-Stammes zu finden sein, nicht aber in dem von *E. coli* DH5a, da dieser kein funktionsfähiges Typ III-Sekretionssystem besitzt. Möglicherweise handelte es sich bei der detektierten Bande um ein Artefakt, das nicht durch Sekretion des Proteins sondern durch Autolyse der Bakterienzelle im Überstand nachgewiesen werden konnte. Um diese Option zu überprüfen, wurden die gleichen Proteinproben im Westernblot mit einem Antikörper gegen ein zytosolisches Protein, in diesem Fall DnaK, ein bakterielles Hsp70-Analog, inkubiert (Abbildung 3.25). Die DnaK-Bande trat bei DH5α sowohl im Pellet als auch im Überstand auf, was dafür spricht, dass hier tatsächlich Autolyse stattgefunden hat. Im *Salmonella*-Stamm dagegen war die DnaK-Bande nur in der Pelletfraktion zu finden. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass der Nachweis des ORF 10::HA-Produktes im Kulturüberstand von STM RKI 08-05217 auf einem spezifischen Sekretionsvorgang zurückzuführen ist.



**Abbildung 3.25: Western Blot  $\alpha$ DnaK (ca. 70 kDa)**

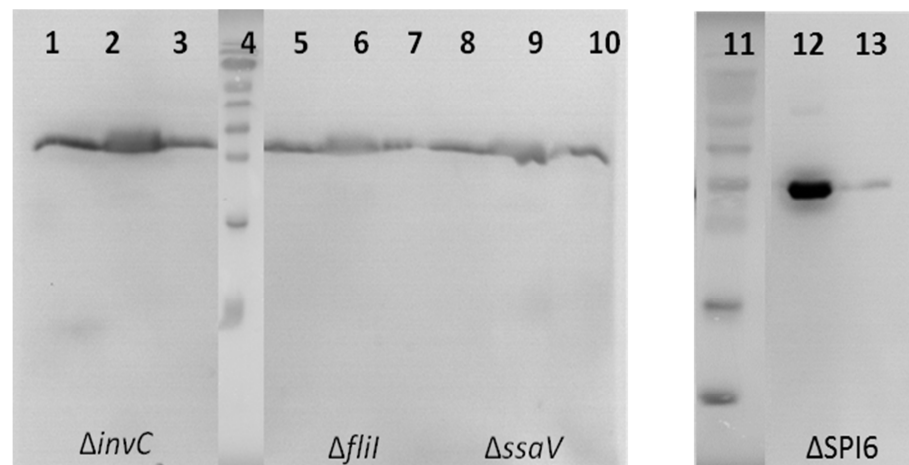
- 1) STM 08-05217 Pelletfraktion
- 2) STM 08-05217 TCA-gefällter Überstand
- 3) *E. coli* DH5a Pelletfraktion
- 4) *E. coli* DH5a TCA-gefällter Überstand
- 5) Protein-Standard

### 3.6.3 Nachweis des ORF 10-Proteins in Typ III-Sekretionsmutanten von *S. Typhimurium*

Zwei unabhängige Vorhersageprogramme haben das ORF 10-Produkt als putativen Typ III-Effektor erkannt. Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das Protein tatsächlich sekretiert wird. Hier sollte untersucht werden, welches Sekretionssystem an der Ausschleusung beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde das pBAD24-Vektorkonstrukt mit ORF 10 unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren  $P_{BAD}$ -Promotors in drei Typ III-Einzel-Sekretionsmutanten, eine Typ III-Doppelmutante sowie eine Typ VI-Mutante von *S. Typhimurium* transformiert:

- MvP818  $\Delta invC::FRT$ ; SPI1-T3SS-Mutante von STM NCTC12023
- P2D6  $ssaV::mTn5$ ; SPI2-T3SS-Mutante von STM NCTC12023
- $\Delta invC::FRT$ ;  $ssaV::mTn5$ ; SPI1-2-T3SS-Doppelmutante von STM NCTC12023
- MvP1213  $\Delta flil$ ; Flagella-T3SS-Mutante von STM NCTC12023
- MvP919  $\Delta SPI6::aph$ ; SPI6-T6SS-Mutante von STM NCTC12023

Proteinaufarbeitung, SDS-PAGE und Westernblot wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Im Ergebnis zeigte sich, dass das ORF 10-Produkt in den Kulturüberständen aller Sekretionsmutanten nachgewiesen werden konnte. Um falsch-positive Resultate auszuschließen, wurde wiederum der anti-DnaK-Antikörper eingesetzt; das zytosolische DnaK-Protein war nur in den Pelletfraktionen zu finden.



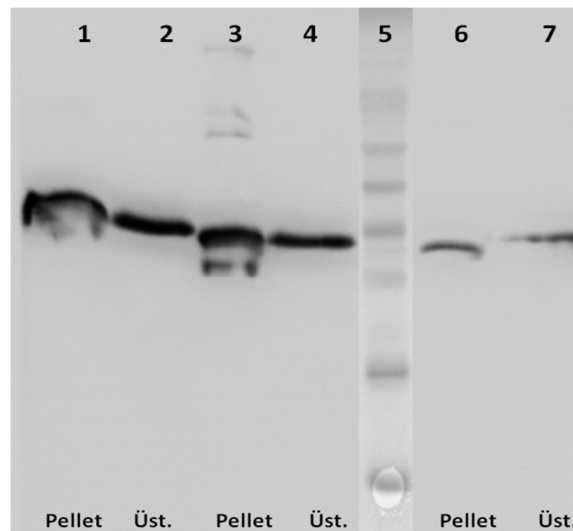
**Abbildung 3.26: Western Blot ORF 10::HA (Sekretionsmutanten)**

- 1, 5, 8, 12) Pelletfraktion unbehandelt
- 2, 6, 9) Pelletfraktion BugBuster-behandelt
- 3, 7, 10, 13) TCA-gefällter Überstand
- 4, 11) Protein-Standard

#### **3.6.4 Sekretion von N-terminal verkürzten ORF 10-Varianten**

Sollte es sich bei ORF 10 tatsächlich um einen Typ III-Effektor handeln, so würde man davon ausgehen, dass dieser innerhalb der ersten ca. 25 N-terminalen Aminosäuren ein Sekretionssignal trägt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei neue ORF 10-Konstrukte in pBAD24 kloniert: ORF 10<sub>AS16-245</sub> und ORF 10<sub>AS26-245</sub>. Als Kontrolle diente der ungekürzte Leserahmen (Abbildung A.4). Für weitergehende Analysen und zur Verstärkung des Westernblot-Signals wurden die ORF-Varianten diesmal mit einem C-terminalen 3xFLAG-Epitoptag versehen. Die Vorgehensweise zur Herstellung der Klone entspricht im Wesentlichen der unter 3.6.2 beschriebenen, allerdings wurden hier die Vorwärts-Primer so gewählt, dass die auf das Startcodon folgenden 45 bzw. 75 Nukleotide (15 bzw. 25 Aminosäuren) deletiert wurden. Anschließend wurde der Vektor mit den N-terminal

verkürzten ORF 10-Inserts (sowie ORF 10 ungekürzt) in den monophasischen STM-Stamm RKI 08-05217 sowie in die oben beschriebenen STM Typ III- und Typ VI-Sekretionsmutanten transformiert und die Kulturüberstände nach Proteinaufreinigung und SDS-PAGE im Westernblot analysiert. Wie Abbildung 3.27 verdeutlicht, waren im Wildtyp-Stamm RKI 08-05217 auch die verkürzten ORF 10-Produkte nachweisbar. Die DnaK-Kontrollen zeigten keine Banden in den Überstands-Fractionen.



**Abbildung 3.27: Western Blot ORF 10::3xFLAG, N-terminal verkürzt in 08-05217 WT**

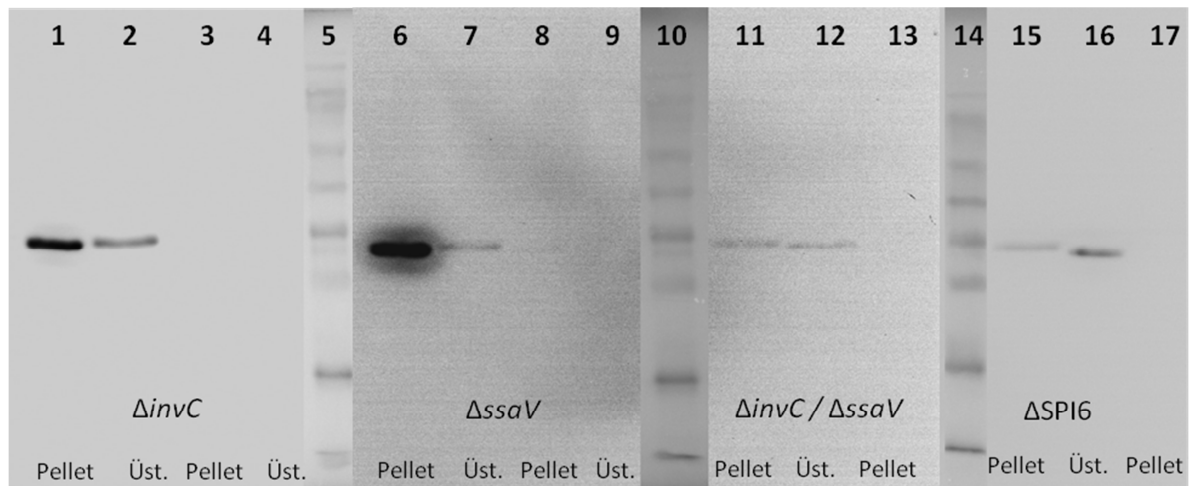
1, 2) ORF 10::3xFLAG ungekürzt

3, 4) ORF 10::3xFLAG<sub>AS16-245</sub>

5) Proteinstandard

6, 7) ORF 10::3xFLAG<sub>AS26-245</sub>

Bei allen Sekretionsmutanten, außer der Flagella-Mutante (*ΔfliI*), konnte das um 15 AS verkürzte Protein im Überstand detektiert werden (Abbildung 3.28). Nach Expression im *ΔfliI*-Stamm trat weder im Pellet noch im Überstand eine Bande auf. Auch das um 25 AS verkürzte ORF 10-Produkt war weder im Pellet noch im Überstand aller getesteten Sekretionsmutanten nachweisbar.



**Abbildung 3.28: Western Blot ORF 10::3xFLAG trunziert in Typ III- und Typ VI-Mutanten**

1, 2, 6, 7, 11, 12, 15, 16) ORF 10::3xFLAG<sub>AS16-245</sub>

3, 4, 8, 9, 13, 17) ORF 10::3xFLAG<sub>AS26-245</sub>

5, 10, 14) Proteinstandard

Zusammenfassend kann man zur Sekretion des ORF 10-Produktes feststellen, dass die ungekürzte Variante in den Überstandsfraktionen des *S. Typhimurium*-Wildtyp-Stammes und aller zu Verfügung stehenden Sekretionsmutanten detektierbar war (Typ III-Single- und Doppelmутanten; Typ VI-Mutante). Die anti-DnaK-Kontrollen bestätigten jeweils, dass die Überstände nicht mit zytosolischen Proteinen verunreinigt waren (nicht gezeigt).

Im Wildtyp-Stamm fanden sich zudem beide N-terminal verkürzten Varianten des Proteins im Überstand. Die um 15 Aminosäuren trunzierte Version des ORF 10-Produktes wurde in den Überständen aller Sekretionsmutanten außer der *fliI*-Mutante gefunden (wo auch in der Pelletfraktion kein Signal detektiert werden konnte). Die um 25 AS verkürzte Proteinform konnte in den Sekretionsmutanten dagegen weder im Überstand noch in der Zellfraktion nachgewiesen werden. Das war ein auffälliger Unterschied zum STM-Wildtyp-Stamm, bei dem Expression und Sekretion des ORF 10<sub>AS26-245</sub> Produktes, wenn auch in reduzierter Menge, nachweisbar war (Abbildung 3.27).



## 4 Diskussion

### 4.1 Das Serovar 4,[5],12:i:- unter epidemiologischen Gesichtspunkten

Am Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen in Wernigerode fiel im Jahr 2006 eine ungewöhnliche Zunahme an Serovar 4,[5],12:i:- Einsendungen auf. Zu bemerken ist an dieser Stelle, dass solche Stämme schon immer sporadisch auftraten, dann aber aufgrund der nicht möglichen eindeutigen Zuordnung zu einem bekannten Serovare nur als Ssp.I oder Salmonellen der B-Gruppe erfasst wurden. In einigen anderen Laboren im In- und Ausland wurde die Zunahme dieser Isolate sogar erst später registriert, weil hier z. T. auf den mitunter langwierigen Nachweis der 2. Geißelphase verzichtet wurde, wenn die Isolate Typhimurium-spezifische Lysotypen, PFGE-Muster o.ä. aufwiesen. Hier wurden die Stämme dann als *S. Typhimurium* erfasst, ohne zu bemerken, dass es sich um eine monophasische Variante handelte [167]. Nachdem die Serovar 4,[5],12:i:- Isolate aufgrund ihrer raschen Verbreitung national und international zunehmend Beachtung fanden, sollte zunächst geklärt werden, welchem bereits im White-Kauffmann-Le Minor-Schema beschriebenen *Salmonella* Serovar diese Isolate zuzuordnen sind oder ob sie gar ein neues Serovar darstellen. Beispielsweise unterscheidet sich *S. Lagos* serologisch nur in der Ausprägung der 2. Geißelphase von *S. Typhimurium*, wird diese nicht exprimiert, sind beide Serovare mittels Serotypie nicht voneinander abgrenzbar. *Salmonella* Lagos ist aber im Gegensatz zu STM ein äußerst selten vorkommendes Serovar (in der Stammsammlung des NRZ gibt es nur einen einzigen Stamm). Viel wahrscheinlicher war, dass es sich um eine monophasische *S. Typhimurium*-Variante handelte. Diese Vermutung konnte durch Untersuchungen, die sowohl im Routine-Betrieb des NRZ als auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, untermauert werden. So wiesen alle 4,[5],12:i:- Isolate einen *S. Typhimurium*-typischen Lysotyp auf und trugen Typhimurium-spezifische Prophagen an den entsprechenden tRNA-Integrationsstellen im Genom. Außerdem ergab die PCR-Analyse, dass von 45 getesteten tRNA-Stellen (85 tRNA-Loci wurden zu 45 Regionen zusammengefasst) 40 mit denen von STM LT2 übereinstimmten, weitere vier zeigten nur geringe Größenunterschiede. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Genome von monophasischen Isolaten und *S. Typhimurium* einander sehr ähnlich sind. Durch die Bestimmung eines STM-spezifischen IS200-Elements im Flagellin-Gencluster zwischen *fliB* und *fliA* nach Burnens *et al.* [151] wurde die eindeutige Zuordnung zum Serovar Typhimurium möglich. Die Resultate der im Zuge dieser Arbeit auf das IS-Element getesteten 68 *Salmonella enterica*-Isolate (einschließlich ein *S. Lagos*) stimmten ausnahmslos mit den

erwarteten Ergebnissen überein (s. 3.1.3). Dieser Ansatz, der von Tennant *et al.* [168] dahingehend erweitert wurde, im Multiplex-Ansatz gleichzeitig das Vorhandensein des *fljB*-Gens für die 2. Geißelphase zu prüfen, wird inzwischen von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority; EFSA) zur Verifizierung monophasischer STM-Isolate empfohlen [167].

Die rasche Verbreitung der monophasischen Serovar 4,[5],12:i:- Isolate in mehreren europäischen Staaten und den USA [121,156] warf zudem die Frage auf, ob diese Stämme ihren Ursprung in einem gemeinsamen Vorläufer haben oder ob sich parallel mehrere voneinander unabhängige klonale Linien herausgebildet haben. Bei den seit ca. 2006 auftretenden deutschen sowie den meisten in dieser Arbeit untersuchten europäischen Isolaten sprach viel für einen gemeinsamen Ursprungsclon: die große Mehrheit der Stämme wies einheitliche Lysotypen auf (DT193 oder DT120; beide unterscheiden sich nur in der Lysis eines der 31 Anderson-Phagen), zeigten ein typisches Antibiotika-Resistenzmuster (ASSuT) und waren dem MLST-Typ ST34 zuzuordnen. Dennoch war innerhalb der Population eine geringe Heterogenität hinsichtlich Lyso- und Resistenztyp zu verzeichnen, was aber durch nachfolgende horizontale Ereignisse erklärt werden könnte. Die vor 2006 beschriebenen 4,[5],12:i:- Varianten aus Spanien [169] und den USA [170] gehörten offenbar zu zwei anderen Ursprungslinien. Als Beleg dafür wurde u. a. das unterschiedliche Ausmaß der Deletionen im Flagella-Gencluster herangezogen [156]. Danach konnten bislang drei verschiedene Linien unterschieden werden, die sich wahrscheinlich unabhängig voneinander herausgebildet haben: die spanische, die amerikanische sowie eine weitere, deren Vertreter keiner der beiden vorgenannten Linien zugeordnet werden können und zu der die während dieser Arbeit getesteten europäischen Isolate gehören (mit Ausnahme des spanischen Isolates, das dem spanischen Typ zuzurechnen ist; s. 3.1.5).

## 4.2 Bedeutung der 2. Geißelphase für *Salmonella* spp.

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, wurden monophasische *S. Typhimurium*-Isolate schon früher sporadisch nachgewiesen und die „Dunkelziffer“ könnte weit höher liegen, wenn man berücksichtigt, dass ggf. auf den Nachweis der Geißelphase verzichtet wurde, wenn das entsprechende Isolat mit anderen Methoden (PFGE, Lysotypie etc.) als *S. Typhimurium* identifiziert wurde. Dennoch waren diese Stämme nicht in der Lage, sich gegen die biphasische Variante durchzusetzen – dieser Umstand hat sich in den letzten Jahren geändert,

was dafür spricht, dass neben dem Verlust des zweiten Flagella-Antigens andere Ereignisse stattgefunden haben, die diesem Typ einen Selektionsvorteil verschaffen.

Die Akquisition eines zweiten Flagellin-Locus durch einen gemeinsamen Vorläufer der Ssp. I, II, IIIb und VI verbunden mit der Fähigkeit des Phasenwechsels bildete einen Meilenstein in der Evolution von *Salmonella enterica*, dem eine bedeutende Rolle bei der Anpassung an warmblütige Wirtsorganismen zugeschrieben wird [171] und der diese Subspezies von den phylogenetisch älteren IIIa und IV abgrenzt (Abbildung 1.2). Das Vermögen, zwei verschiedene Flagella-Antigene zu exprimieren, wurde lange vorrangig als Möglichkeit interpretiert, durch die Erhöhung der Antigendiversität der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Da dieser Effekt für die einzelnen Serovare jedoch nur von Dauer wäre, bis das Immunsystem eine Antwort gegen die 2. Geißelphase generiert hat und sich auch monophasische Serotypen offensichtlich sehr erfolgreich etabliert haben (*S. Typhi* und *S. Enteritidis*), wird diskutiert, ob das Umgehen der Immunreaktion wirklich eine Erklärung für den Mechanismus des Phasenwechsels sowie die große Vielfalt an Flagella-Antigenen ist [172], zumal die Erreger, sobald sie sich in der Wirtszelle befinden, dem Immunsystem ohnehin nicht mehr zugänglich sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des angeborenen Immunsystems hauptsächlich durch die Interaktion zwischen LPS und TLR4 erfolgt, während die Erkennung von Flagellin durch TLR5 nur eine untergeordnete Rolle spielt [173]. Auch gänzlich geißellose Salmonellen kommen vor, z. B. das an Hühnervögel adaptierte Serovar Gallinarum. Da Flagellen zum einen die Beweglichkeit des Bakteriums sicherstellen und zum anderen die Antwort auf chemotaktische Stimuli vermitteln [174], erscheint dieser Funktionsverlust auf den ersten Blick nachteilig. So beschreiben Stecher und Kollegen, dass motile *S. Typhimurium* im entzündeten Darm einen Selektionsvorteil gegenüber der übrigen Mikroflora besitzen, weil sie sich die von der Mucosa als Antwort auf die Infektion vermehrt gebildeten Mucine (glycosylierte Proteine) als Nährstoffquelle erschlossen haben, zu der sie auf chemotaktische Reize hin durch Flagellenbewegung migrieren. Nicht-flagellierte Mutanten können nicht in gleicher Weise profitieren und sind deshalb attenuiert [175]. Monophasische STM-Varianten wurden im genannten Artikel nicht untersucht, so dass bislang nicht geklärt wurde, ob beide Flagella-Varianten für diesen Effekt gleich bedeutsam sind. Möglicherweise bewirken veränderte Umweltbedingungen einen verminderten Selektionsdruck auf die Ausprägung beider Flagella-Varianten [5] oder diese ist bei wirtsadaptierten Serovaren u. U. unnötig bzw. unwirtschaftlich. Insbesondere gilt dies für Serovare, die einen systemischen Krankheitsverlauf verursachen und sich währenddessen

intrazellulär vermehren, wie *S. Typhi*. McQuiston und Kollegen gehen davon aus, dass das später erworbene *fljB*-Gen zur Ausprägung der 2. Geißelphase weniger häufig exprimiert wird und sein Verlust deshalb kaum Auswirkungen auf das Überleben des Stammes hat. Die Autoren sehen darin eher ein „Ersatzrad“ für kurzzeitige Notsituationen oder einen „Winterreifen“, der nur unter gewissen Bedingungen benötigt wird bzw. den Zugang zu bestimmten Nischen erlaubt. Ob bzw. durch welche Stimuli der Phasenwechsel induziert wird oder ob er zufällig erfolgt, ist bislang nicht geklärt.

#### 4.3 Tragen die monophasischen Isolate eine neue Antibiotika-Resistenz-Insel?

Bevor sich die monophasische Variante von *S. Typhimurium* so stark verbreitete, dominierten biphasische Isolate des Lysotyps DT104. Boyd und Kollegen beschrieben, dass die Fünffach-Resistenz ACSSuT in diesen STM-Isolaten durch die Gene *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1*, *tetR*, *tet(G)* vermittelt wird, die im Resistenz-Cluster der *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) kodiert sind [153]. Das Resistenzmuster der hier beschriebenen monophasischen Variante unterscheidet sich davon auf den ersten Blick nur durch die Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol. Für monophasische *S. Typhimurium*-Stämme aus Italien zeigten Lucarelli et. al., dass diese die SG1 nicht besitzen, sondern die ASSuT-Resistenz chromosomal auf anderen Loci (*bla*<sub>TEM</sub>, *strA-strB*, *sul2* und *tetA(B)*) determiniert ist und postulierten das Vorhandensein einer neuen Resistenzinsel in den monophasischen *S. Typhimurium*-Isolaten [123]. Die Resistenz-vermittelnden Gene *bla*<sub>TEM</sub>, *strA-strB*, *sul2* und *tetA(B)* konnten für die in der vorliegenden Arbeit getesteten monophasischen Isolate bestätigt werden (s. 3.1.4). Neueste Untersuchungen (ebenfalls von Lucarelli und Kollegen) zur Lokalisation der Resistenzgene kamen zu dem Ergebnis, dass sie in zwei benachbarten chromosomalen Regionen zu finden sind: RR1 in STM2753 und RR2 in STM2759 [176]. RR1 schließt die Gene *bla*<sub>TEM</sub>, *strA-strB* und *sul2* ein, während *tetA(B)* in RR2 zu finden ist. Beide Regionen werden jeweils von gleichgerichteten IS26-Elementen flankiert und weisen 99% Sequenzhomologie mit entsprechenden Bereichen des *E. coli*-Plasmids pO111\_1 (GenBank accession no. AP010961) auf, welches aber zusätzlich ein *aph*-Gen für die Ausprägung einer Kanamycin-Resistenz trägt, das in den Resistenzregionen der STM-Isolate fehlt. Die STM-Loci zwischen RR1 und RR2 (STM2754 – STM2758) sind vorhanden aber invertiert. Die ASSuT-Resistenz in den europäischen monophasischen *S. Typhimurium*-Stämmen wird demzufolge nicht durch eine

neue Resistenzinsel vermittelt, sondern durch Gene, die wahrscheinlich über mehrere „illegitime“ Rekombinationsereignisse ins Genom integriert wurden. RR1 und RR2 werden zwar jeweils von IS26-Elementen flankiert, da aber keine *direct repeats* nachgewiesen werden konnten, gilt eine Übertragung durch Transposition als unwahrscheinlich [176]. Bemerkenswerterweise grenzen diese Resistenz-vermittelnden Bereiche unmittelbar an das von Garaizar *et al.* [155] beschriebene Gencluster STM2758 – STM2773, das das *fljAB*-Operon für den Flagella-Phasenwechsel einschließt und in monophasischen STM deletiert ist.

#### 4.4 Eine neue genomische Insel in monophasischen *Salmonella* Typhimurium

Die Anzahl identifizierter *Salmonella* Pathogenitätsinseln ist in den letzten Jahren auf 22 angewachsen und wird sich sicher auch zukünftig weiter erhöhen [44,45]. Einige SPIs kommen in allen Vertretern der Gattung *Salmonella* vor, andere nur in *S. enterica*, manche sind gar serovar-spezifisch. Eine Reihe dieser Inseln ist bereits gut charakterisiert (SPIs 1, 2, 4, 6 etc.; s. 1.3.1), von vielen ist die Funktion jedoch noch unbekannt. Neben den Pathogenitätsinseln wurden für *Salmonella* spp. weitere genomische Inseln beschrieben, die nicht primär mit Virulenzeigenschaften assoziiert sind. Bekanntestes Beispiel ist hier sicher die *Salmonella* Genomic Island 1 (SG1), ein 43 kb großes Element u. a. im Genom von *S. Typhimurium* DT104, das die ACSSuT Resistenz-vermittelnden Gene trägt [153].

Das in dieser Arbeit beschriebene 18.4 kb Fragment im Genom von (vorrangig) monophasischen *Salmonella* Typhimurium-Stämmen besitzt die grundlegenden Eigenschaften einer horizontal erworbenen genomischen Insel nach der Definition von Hacker *et al.* [38]: die Insertionsstelle liegt unmittelbar an einem tRNA-Locus (*thrW*), der G+C-Gehalt ist mit 47% deutlich niedriger als der des *S. Typhimurium* LT2-Gesamtgenoms (52%), das Element wird von *direct repeats* flankiert und kodiert für eine Integrase. Diese Merkmale gelten jedoch nicht ausschließlich für genomische Inseln, sondern ebenso für defekte Prophagen. Allerdings sind diese beiden genetischen Elemente kaum voneinander abgrenzbar, denn die meisten genomischen Inseln tragen phagen-assoziierte Gene (so auch die hier beschriebene) und man geht davon aus, dass einige von Prophagen abstammen [177]. Sowohl GIs als auch defekte Prophagen (*phage remnants*) gehören zum flexiblen Teil des bakteriellen Genpools [178] und können über die auf ihnen kodierten Virulenz-, Resistenz- oder Fitnessfaktoren die Eigenschaften ihres Wirtsbakteriums beeinflussen.

#### 4.4.1 Verbreitung der 18.4 kb Insel

Die Detektion der Insel erfolgte zunächst in einem einzelnen monophasischen *S. Typhimurium* Isolat (RKI 06-01900), das die typischen Charakteristika der sich in Deutschland verbreitenden monophasischen STM-Variante aufwies: Lysotyp DT193, Resistenzmuster ASSuT, MLST-Typ ST34. Die anschließende Sequenzierung des Fragments ermöglichte die Etablierung einer PCR zum Screenen von (monophasischen) *S. Typhimurium* Isolaten. Da der *thrW* tRNA-Locus eine bekannte Insertionsstelle für die STM-Prophagen P22 und ST64T ist [91], wurde ein Multiplex PCR-Ansatz entwickelt, der zwischen dem freien Locus, der Integration eines Prophagen sowie der Insertion der neuen genomischen Insel diskriminiert. Von den über 2100 getesteten monophasischen STM-Isolaten aus zwölf europäischen Staaten waren 71% insel-positiv, betrachtet man nur den Lysotyp DT193, waren es sogar 90%. Parallel dazu wurden auch 200 biphasische STM-Isolate untersucht; hier war die Insel in knapp 14% der Stämme nachweisbar (13% in biphasischen DT193), s. 3.2.3. Die 18.4 kb Insel ist demnach durchaus typisch für monophasischen STM-Stämme (insbesondere für die des Lysotyps DT193), sie ist aber kein Alleinstellungsmerkmal und daher als epidemiologischer Marker nur begrenzt geeignet. Die retrospektive Analyse aller 79 Serovar 4,[5],12:i:- Isolate der Jahre 2001 bis 2004 aus der NRZ-Stammsammlung ergab in fünfzehn Fällen (19%) ein positives Ergebnis, was darauf hindeutet, dass das 18.4 kb Element nicht unmittelbar mit der überdurchschnittlich starken Verbreitung der monophasischen *S. Typhimurium*-Variante seit 2006 in Zusammenhang steht. Daneben wurden achtzehn 4,[5],12:i:- Stämme, die zwischen 1965 und 1989 in Frankreich isoliert wurden, untersucht. In keinem von ihnen war die Insel nachweisbar. In anderen *Salmonella*-Serovaren und -Subspezies konnten die Insel oder Teile davon bislang nicht detektiert werden. Mögliche Gründe dafür könnten eine hohe Spezifität der Insel selbst oder der Rekombinationssequenzen sein, vielleicht liegt die Ursache aber auch nur darin, dass *S. Typhimurium* und seine monophasische Variante zu den am weitesten verbreiteten Serovaren mit einem sehr breiten Wirts- und Nischenspektrum gehören. Für eine verlässliche Aussage war die hier getestete Anzahl von 20 Nicht-Typhimurium-Isolaten zu gering.

Aufgrund der ausgedehnten Sequenzhomologien zu verschiedenen *Escherichia coli* und *Shigella dysenteriae* bzw. *boydii*-Genomen wurden auch ausgewählte Stämme dieser Spezies mittels der Single-ORF-PCR auf das Vorhandensein der Insel geprüft. Einzelne Leserahmen konnten in Vertretern beider *Shigella*-Spezies nachgewiesen werden. Für *E. coli* ETEC H10407, den Stamm mit den weitreichendsten Homologien, wurden 13 von 17 ORFs nachgewiesen (Abbildung 3.13). Diese Ergebnisse legen zum einen nahe, dass die Insel aus mehreren

Abschnitten besteht, die vom gemeinsamen Vorläufer der monophasischen STM-Isolate evtl. in mehreren Schritten akquiriert wurden, und dass die Insel (oder Teile davon) ursprünglich von einem anderen Mitglied der *Enterobacteriaceae*-Familie stammt und zwischen den Gattungen und Spezies ausgetauscht werden kann / konnte. Ein Transfer von genetischem Material zwischen Bakterien verschiedener Spezies oder Gattungen ist nicht ungewöhnlich, auch wenn die Effizienz i. d. R. niedriger ist als bei Erregern der gleichen Spezies [32]. Im Falle der hier beschriebenen 18.4 kb Insel könnte man spekulieren, dass sie in Asien entstanden ist bzw. dort auf *S. Typhimurium* übertragen wurde, da zum einen einige der untersuchten Stämme aus Dänemark und Finnland (beide Staaten haben nur sehr geringe Infektionszahlen aber ein vorbildliches Surveillance-System) mit Reisen nach Thailand bzw. Indonesien in Verbindung gebracht wurden und zum anderen *Shigella dysenteriae* bzw. *boydii* ihr hauptsächliches Verbreitungsgebiet auf dem asiatischen Kontinent haben, während sie in Mitteleuropa nur sporadisch auftreten. Zudem könnte die große Bevölkerungsdichte in den asiatischen Ballungsräumen in Kombination mit oft unzulänglichen sanitären Bedingungen (fehlende Kanalisation) den HGT zwischen verschiedenen Gattungen begünstigen, da sie statistisch gesehen häufiger aufeinander treffen.

#### **4.4.2 Strukturelle und funktionelle Charakteristika der 18.4 kb Insel**

Die strukturelle Charakterisierung der Insel erfolgte zunächst *in silico*, anschließend sollten die getroffenen Vorhersagen experimentell bestätigt werden. Die nachfolgend an die Sequenzierung des ca. 20 kb *Long Range* PCR-Produktes an der *thrW* tRNA-Stelle durchgeführte Leserahmensuche ergab insgesamt 27 ORFs zwischen 138 bp (ORF 1b) und 2115 bp (ORF 12), die lt. Vorhersage in 5 putativen Operons organisiert sein sollten (s. 3.3.3.1). Die Insel wird von *direct repeats* flankiert, innerhalb des Fragments finden sich *inverted repeats* – beispielsweise werden die ORFs 9a und 10 (put. Operon 3) von solchen Elementen flankiert, die auf zusätzliche Rekombinationsereignisse hindeuten. Nukleotid-Blast-Analysen ergaben weitreichende Homologien mit anderen Mitgliedern der Enterobakterien-Familie wie *E. coli* und *Shigella* spp., jedoch ist die 18.4 kb Insel in keinem dieser annotierten Genome komplett nachweisbar (vgl. Abbildung A.1). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass das 18.4 kb Element aus mehreren Teilstücken bestand, die von einem gemeinsamen Vorläufer wahrscheinlich sequenziell akquiriert wurden und in dieser Kombination bislang nur in *S. Typhimurium* nachgewiesen werden konnten. Vergleicht man die Operonvorhersage mit den Nukleotid-BLAST-Analysen, fallen zwei Abweichungen auf: das

putative Operon 4 (ORFs 10b, 11 und 12) kommt in keiner der Vergleichssequenzen anderer *Enterobacteriaceae* als zusammenhängender Genkomplex vor, obwohl die Einzelgene in verschiedenen *E. coli*-Vertretern gefunden wurden – eine Tatsache, die zunächst gegen die Operon-Hypothese spricht. In der RT-PCR wurden aber genübergreifende Transkripte für ORF 10b / 11 sowie ORF 11 / 12 detektiert, außerdem handelt es sich bei den Produkten der ORFs 11 und 12 jeweils um putative DNA-Transferproteine – sie haben also gleiche bzw. ähnliche Funktionen, was die Organisation in einem Operon sinnvoll erscheinen lässt. Die Operon-Vorhersage ergab zudem ein weiteres Operon am 3'-Ende der Insel, das aus zwei Leserahmen in negativer Orientierung besteht. Diese ORFs wurden mit dem verwendeten ORF-Finder nicht gefunden und wurden daher in Tabelle 3.6 nicht berücksichtigt. Bei einem der beiden ORF-Produkte handelt es sich lt. BLASTp um ein putatives Phagenprotein ohne nähere Spezifikation, beim zweiten um ein hypothetisches Protein.

#### 4.4.2.1 Putative Funktionen ausgewählter ORF-Produkte

Protein-BLAST Analysen ergaben vorrangig Phagen-assoziierte Genprodukte (ORFs 1, 1b, 2, 3a, 4, 5, 6, 7, 10b, 11, 12, 13a, 14), die in den meisten Fällen nicht näher charakterisiert waren. Bei den Betrachtungen sollte berücksichtigt werden, dass die Annotierung als Phagen-Gen möglicherweise auf Eigenschaften beruht, die auch anderen mobilen genetischen Elementen zuzuschreiben sind. Das betrifft insbesondere Gene zur Mobilisierung und deren Regulation. So gilt die Assoziation mit Phagen-Genen als eine charakteristische Eigenschaft genomischer Inseln, von denen viele beispielsweise phagen-ähnliche Integrasen besitzen [41,178]. Bei den Produkten der ORFs, die nicht mit Phagen in Verbindung gebracht wurden, handelt es sich hauptsächlich um hypothetische Proteine. Im Folgenden soll auf die ORFs eingegangen werden, für deren Produkte eine Funktion bekannt ist bzw. vermutet wird.

##### *ORF 1 (putative Prophagen-Integrase)*

Leserahmen 1 ist der einzige ORF der Insel, dem mit großer Sicherheit eine eindeutige Funktion zugeordnet werden kann, was sicher auch der Tatsache geschuldet ist, dass Integrasen als Schlüsselenzyme des horizontalen Gentransfers anzusehen und daher sehr gut charakterisiert sind. Anhand konservierter Domänen (NCBI-Tool im Rahmen der BLAST-Analyse) wurde das Enzym als Bakteriophagen P4 Integrase identifiziert, wie sie in temperenten Phagen, integrativen Plasmiden, Pathogenitäts- und Symbiose-Inseln und anderen mobilen genetischen Elementen zu finden ist. P4 Integrasen vermitteln sowohl



integrative als auch exzise sequenz-spezifische Rekombinationen zwischen den sog. *attachment sites* auf dem Phagengenom einerseits und dem bakteriellen Chromosom andererseits. Die Phagen *attachment site* (*attP*) befindet sich meist in unmittelbarer Nähe des Integrase-Gens, während die *attachment site* des Bakteriums (*attB*) typischerweise einem tRNA-Locus benachbart ist [179]. Durch seine Excisionase-Aktivität ist das Enzym an der Mobilisierung des entsprechenden DNA-Fragments beteiligt, während die Rekombinase-Funktion - gemeinsam mit den flankierenden repetitiven Sequenzen - die Integration ins Rezipientengenom an spezifischer Stelle vermittelt. Das nachgewiesene ORF 1-Transkript belegte die Aktivität des Gens und deutete auf eine mögliche Mobilität / Mobilisierbarkeit hin.

#### *ORF 1b (putativer Phagen-Transkriptionsregulator)*

Für Transkriptionsregulatoren sind vielfältige Funktionen denkbar. Naheliegend wäre die Regulation von Insel-kodierten Genen – möglicherweise von solchen, die Einfluss auf die Mobilisierung haben, wie z. B. die Integrase.

#### *ORF 3 (Protein der antA/antB Antirepressor-Familie)*

Auch dieser ORF kodiert wahrscheinlich für ein regulatorisches Protein. Die Mitglieder dieser Familie sind homolog zu putativen Antirepressoren verschiedener *E. coli*-Bakteriophagen [180]. Für *S. Typhimurium*-Prophagen wurde gezeigt, dass Antirepressoren bedeutsam für deren Induktion sind. Bei diesem alternativen Weg zur RecA-abhängigen proteolytischen Spaltung des Repressors wird dieser durch Bindung des Antirepressors inaktiviert und dadurch der Übergang vom lysogenen in den lytischen Status initiiert. Dabei kann der Antirepressor auf verschiedene Repressoren wirken und so in *trans* die Induktion mehrerer Prophagen in polylysogenen *S. Typhimurium*-Stämmen bewirken [181].

#### *ORF 3a (putatives Prophagen-Protein)*

BLAST-Analysen ergaben keine weitere Spezifikation, allerdings wurde das ORF-Produkt als möglicher Typ III-Effektor vorhergesagt. Ein Nachweis der Sekretion des nur ca. 10 kDa großen Proteins gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht.

#### *ORF 4 (Protein der Ash-Familie / Phagen Immunitäts-/Repressorprotein)*

Ash-Proteine kommen beispielsweise im *E. coli* Phagen P4 vor, einem lysogenen Phagen, der zum Eintritt in den lytischen Zyklus auf einen Helferphagen angewiesen ist (z. B. P2). Ash steht dabei für *adaption to a second helper* [182]. Repressor-Proteine dienen der Aufrechterhaltung des lysogenen Status des integrierten Prophagen indem sie die Expression der Proteine für den lytischen Zyklus unterdrücken. Wird die DNA des Wirtsbakteriums geschädigt, erfolgt die Einleitung des lytischen Zyklus durch Inaktivierung des Repressors durch RecA-abhängige proteolytische Spaltung oder Bindung eines Antirepressors (s. o.). Zudem vermittelt der Repressor Immunität gegen eine Superinfektion mit einem gleichartigen Phagen.

#### *ORF 6 (putative $\beta_2$ -Untereinheit eines nicotinergen Acetylcholinrezeptors [nAChR] in *Shigella dysenteriae*)*

Diese Art Rezeptoren kommt vorrangig in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems von Säugern vor, ihre Präsenz wurde aber auch in anderen Zelltypen nachgewiesen, z. B. in Immunzellen und hier speziell in Alveolar-Makrophagen [183]. Bakterielle nAChR-Homologe wurden vor wenigen Jahren erstmals von Bocquet *et al.* beschrieben [184]. Es handelt sich demnach um Ionenkanäle, die durch extrazelluläre Protonen geöffnet werden können. Die Autoren vermuten einen Anpassungsmechanismus an wechselnde pH-Werte im umgebenden Milieu. Ob das ORF 6-Produkt tatsächlich an der Bildung eines Ionenkanals beteiligt ist, bleibt fraglich, da diese Kanäle aus mehreren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen, während hier nur eine  $\beta_2$ -Untereinheit vorhergesagt wurde. Zudem wurde das ORF-Produkt als *in silico* zytoplasmatisches Protein eingestuft, Transmembrandomänen wurden mit keinem der verwendeten Vorhersageprogramme gefunden.

#### *ORFs 8 und 9 (Zink-Bindedomänen einer Primase-Helicase)*

Zink-Bindedomänen kommen in sehr vielen Enzymen und Nukleinsäure-bindenden Proteinen vor, je nach Funktion des Proteins wirken die  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen katalytisch, regulatorisch oder stabilisierend. Primase-Helicase-Komplexe sind im Replikationsprozess dafür verantwortlich, die doppelsträngige DNA zu entwinden und aufzuspalten (Helicase-Aktivität) und kurze RNA-Stücke (Primer) für die nachfolgende Strang-Synthese durch die Polymerase zu generieren (Primase-Aktivität). Die Leserahmenprodukte könnten demnach auf eine potenzielle Selbstreplikationsfähigkeit hinweisen.

*ORF 9a (hypothetisches Protein)*

BLAST-Analysen ergaben keine Hinweise auf die Funktion des ORF-Produktes, es wurde aber als möglicher Typ III-Effektor vorhergesagt. Der Leserahmen überlappt am 3'-Ende mit ORF 10, der für ein weiteres putatives Effektorprotein kodiert, und bildet lt. *in silico*-Vorhersage gemeinsam mit diesem ein Operon. Dieses wird von *inverted repeats* flankiert, was bedeuten könnte, dass die beiden Leserahmen unabhängig vom Rest der Insel ins Wirtsgenom aufgenommen wurden. Versuche, die Sekretion der ORF 9a-Produktes mittels Westernblot nachzuweisen, waren nicht erfolgreich.

*ORF 10 (hypothetisches Protein)*

Auch hier handelt es sich um ein hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion, das *in silico* von zwei unabhängigen Programmen als Typ III-Effektor eingestuft wurde. Daneben konnte in der Aminosäuresequenz des ORF 10-Produktes eine putative Chaperon-Bindedomäne nahe dem N-terminus identifiziert werden, wie sie in vielen Typ III-Effektoren von *Salmonella* und *Shigella* zu finden ist [166] (Abbildung 3.12). Für dieses ORF-Produkt gelang der Nachweis in Bakterien-Überständen mittels Westernblot. Das Protein war nach Expression in *S. Typhimurium* Typ III- und Typ VI-Einzelmutanten noch immer im Überstand nachweisbar, ebenso verhielt es sich bei Verwendung einer SPI1/2-T3SS-Doppelmutante. Aus den Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass das ORF 10-Produkt entweder über keins der Typ III-Sekretionssysteme von *S. Typhimurium* exportiert wird oder alle drei dazu in der Lage sind. Zur Überprüfung müsste hier eine Mutante eingesetzt werden, in der alle drei T3SS inaktiviert wurden. Da *S. Typhimurium* nach derzeitigem Kenntnisstand nur ein T6SS besitzt, kann ein Export des Proteins über dieses System mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Das um 15 AS verkürzte Protein konnte im Überstand aller Sekretionsmutanten, außer der Flagella-Mutante (*Δflii*) detektiert werden (Abbildung 3.28). In dieser war allerdings auch in der Zellfraktion keine Bande detektierbar. Das um 25 AS verkürzte ORF 10-Produkt war weder im Pellet noch im Überstand aller getesteten Sekretionsmutanten nachweisbar, was für eine unzureichende Menge aufgereinigten Proteins in den Proben spricht. Jedoch konnten beide verkürzten Varianten nach Expression im Wildtyp in den Überständen detektiert werden; die N-terminalen 25 Aminosäuren scheinen also wider Erwarten kein essenzielles Sekretionssignal zu enthalten.

*ORFs 11 und 12 (put. Phagen-DNA Transferprotein gp20 / Injektionsprotein)*

Beide Leserahmen bilden ein putatives Operon und stellen damit wahrscheinlich eine funktionelle Einheit dar - wofür auch die übereinstimmenden BLAST-Ergebnisse sprechen. Erstaunlicherweise kommen die beiden Leserahmen aber in keinem der annotierten Vergleichs-Isolate in voller Länge gemeinsam vor (Abbildung A.1). Die ORF-Produkte wurden als phagen-assoziierte DNA-Transferproteine eingestuft. Bakteriophagen infizieren ihr Wirtsbakterium, indem sie sich mit ihren Tailspike-Proteinen an dessen Oberfläche anheften (an LPS oder Membranproteine) und die im Phagenkopf (Capsid) verpackte DNA über den (oft kontraktilen) Phagenschwanz durch die äußere Membran ins Periplasma der Bakterienzelle injizieren (vergl. Abbildung 1.8). Im Falle des *Salmonella*-Phagen P22 werden die drei Injektionsproteine gp7, gp16 und gp20 gemeinsam mit der DNA durch die äußere Membran geschleust [185]. ORF 11 wurde als gp20-Homolog eingestuft. Eine vermutete Aufgabe dieser Glykoproteine ist der Schutz der viralen Nucleinsäuren vor Nucleasen im Periplasma, zudem vermittelt gp16 den Transport der Phagen-DNA über die innere Membran ins Zytoplasma, indem es möglicherweise eine Pore bildet [186]. Für die beiden anderen Proteine konnten die Autoren keine Membran-Assoziation feststellen. Im Gegensatz dazu ergaben die hier verwendeten Vorhersageprogramme transmembrane  $\beta$ -Faltblätter für beide ORF-Produkte. Dies spricht allerdings für eine Lokalisation der Proteine in der äußeren Bakterienmembran. Das ORF 11-Protein wurde von einem weiteren Vorhersageprogramm als extrazellulär eingestuft; das Produkt von ORF 12 dagegen als zytoplasmatisch.

Zudem würde man erwarten, dass die Leserahmen putativer DNA Transfer- bzw. Injektionsproteine, welche ihre Funktion in der Infektion eines neuen Wirtsbakteriums während des lytischen Phagenzyklus haben, im lysogenen Stadium transkriptionell inaktiv sind, da ihre Expression durch einen Repressor (der evtl. durch ORF 4 kodiert wird) unterdrückt werden sollte. Für beide ORFs wurde aber mRNA detektiert. Dieser Umstand ist umso erstaunlicher, da es sich bei der Insel nicht um einen induzierbaren Prophagen handelt, denn es finden sich auf ihr keine weiteren Gene für Phagen-Strukturmoleküle – ein lytischer Zyklus und damit ein Phagen-DNA-Transfer scheint demnach ausgeschlossen. Pukatzki und Kollegen haben gezeigt, dass Typ VI-Effektoren von *Vibrio cholerae* strukturelle Homologien zu Tailspike-Proteinen des *E. coli*-Phagen T4 aufweisen. Da Tailspike-Komplexe in der Lage sind, die Wirtszellmembran zu perforieren und so die Phagen-DNA-Passage ins bakterielle Zytoplasma ermöglichen, vermuteten die Autoren eine analoge Funktion für die TypVI-Effektoren von *V. cholerae*, die sie anschließend auch belegen konnten [78]. Eine herausfordernde

Hypothese wäre es, diese Erkenntnisse auf die hier beschriebenen Leserahmenprodukte zu übertragen und ihre Mitwirkung an einem neuartigen Sekretionssystem zu postulieren.

#### *ORF 13 (putatives Membranprotein)*

Die Alignment-Analyse sagt zwar ein Membranprotein voraus, ob damit die innere oder äußere Membran gemeint ist, bleibt aber offen. Verschiedene *in silico*-Vorhersagen ergeben sowohl transmembrane  $\alpha$ -Helix- als auch  $\beta$ -Strangmotive, die subzelluläre Lokalisation wird aber als „*inner membrane*“ angegeben. Informationen zu einer möglichen Funktion liegen nicht vor. Der Leserahmen gehört zu keinem der vorhergesagten Operons und ist in negativer Richtung orientiert, dennoch sollte ein möglicher funktioneller Zusammenhang mit den beiden vorab beschriebenen ORFs überprüft werden - insbesondere hinsichtlich einer evtl. Beteiligung an der Bildung einer Membranpore.

#### *ORF 14 (Abi-like Protein)*

Phagen-Proteine dieser Familie wurden in verschiedenen Bakterienspezies gefunden. „Abi“ steht dabei für abortive Infektion, einen Phagen-Resistenzmechanismus, der Lysogene vor der lytischen Infektion durch gleichartige Phagen schützt. Für das Vorhandensein funktioneller Phagen-Resistenzgene auf der Insel sprechen die vergleichenden Lysotypie-Ergebnisse unter 3.4.1, die übereinstimmend zeigen, dass Isolate mit Insel weniger stark lysiert werden als Stämme, die die Insel nicht besitzen – unabhängig davon, ob die Insel ursprünglich vorhanden war oder mittels Transduktion eingefügt wurde. Möglicherweise ist das ORF 14-Produkt für diese Phenotyp-Veränderung (mit)verantwortlich.

#### *ORF 15 (PerC transcriptional activator)*

Das Protein PerC gilt als Aktivator der LEE (*locus of enterocyte effacement*) Pathogenitätsinsel über den LEE1-Promotor in enteropathogenen *E. coli* (EPEC), wo es auf dem pEAF-Plasmid determiniert ist. PerC-ähnliche Proteine kommen auch in LEE-positiven enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) vor, wo sie durch lambdoide Prophagen kodiert werden [187]. Proteine dieser Familie haben demzufolge herausragende Bedeutung bei der Expression der LEE-kodierten pathovar-spezifischen Virulenzeigenschaften von EPEC- und EHEC-Stämmen. Hinweise auf eine vergleichbare PAI in monophasischen *S. Typhimurium*-Isolaten gibt es bislang nicht, allerdings ist derzeit auch noch kein annotiertes Gesamtgenom eines Vertreters der europäischen monophasischen STM-Linie verfügbar. Dennoch stellt ORF 15 als einziger

Leserahmen der 18.4 kb Insel einen Zusammenhang zu einem bekannten Virulenzmechanismus her.

#### **4.4.2.2 Zell- und Mausinfektionsversuche**

Um einen potenziellen Einfluss der 18.4 kb Insel auf das Invasions- bzw. Replikationsvermögen monophasischer *S. Typhimurium*-Isolate zu untersuchen, wurden Zellinfektionsexperimente mit der polarisierten Epithelzelllinie MDCK (Invasion) sowie der Maus-Makrophagen-Linie RAW264.7 (intrazelluläre Replikation) durchgeführt. Beide Zelllinien haben sich als Modelle zur Untersuchung intrazellulärer Phenotypen von *Salmonella enterica* bewährt [188,189]. Für die MDCK-Zellen wurde zudem eine ca. 50-fach höhere *S. Typhimurium*-Internalisierungsrate beschrieben als für die nicht polarisierte Epithelzelllinie HeLa [189]. Obwohl die Ergebnisse der zur Anfertigung dieser Arbeit durchgeführten Versuche hinsichtlich der erreichten Invasions- bzw. Replikationsraten nicht konsistent waren, konnte für die verwendeten Zelllinien festgestellt werden, dass die Insel weder das Eindringen in MDCK-Epithelzellen noch die Vermehrung in RAW-Makrophagen beeinflusst. Parallel zu den *in vitro* Infektionsversuchen wurden der insel-tragende monophasische Wildtypstamm, die Deletionsmutante sowie die Revertante im Maus-Colitis-Modell [148] getestet (s. 2.5.4). Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen hinsichtlich der Besiedelung der untersuchten Organe (Cecum, Leber, Milz, mesenteriale Lymphknoten) festgestellt werden, die Ergebnisse der *in vitro* Versuche wurden damit bestätigt. Die mit Hilfe der verwendeten Infektionsmodelle erzielten Resultate führen insgesamt zu dem Schluss, dass die Funktion des 18.4 kb Elements wahrscheinlich nicht unmittelbar mit dem Eindringen und Überleben in der eukaryotischen Wirtszelle verknüpft, sondern in anderen Bereichen zu suchen ist. Möglicherweise ist die Insel sogar in einer Lebensphase von *S. Typhimurium* außerhalb eines warmblütigen Wirtsorganismus von Bedeutung.

#### **4.4.3 Replikationsfähigkeit der 18.4 kb Insel**

Die Excision der Insel aus dem Wirtszell-Chromosom, verbunden mit der Ausprägung eines zirkulären Zwischenproduktes, konnte in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden. Die Bildung des ringförmigen Intermediates ist in zweierlei Hinsicht bedeutsam: einerseits könnte sie die Voraussetzung für den horizontalen Transfer des Elementes darstellen, andererseits

aber auch seine autonome Vermehrung innerhalb der Wirtszelle ermöglichen. Genomische Inseln gelten im Allgemeinen als nicht selbst-replikativ [40], allerdings wurden auch Ausnahmen von dieser Regel beschrieben [190,191]. Für eine erfolgreiche Replikation nach plasmidalem Vorbild wird ein funktionales Replikationsmodul benötigt, das aus dem Replikationsursprung (*oriV*), dem Initiator-Protein (bei Plasmiden Gram-negativer Bakterienspezies i. d. R. RepA), verschiedenen Enzymen (Helicase, Primase, Polymerase) sowie weiteren Proteinen besteht. Die Enzymaktivitäten können dabei vom Wirtsbakterium *in trans* bereitgestellt werden. Die *oriV*-Region ist eine AT-reiche Region, an der die DNA leicht aufgeschmolzen werden kann und die gekennzeichnet ist durch multiple direkte Wiederholungssequenzen (Iterons) sowie inverse Sequenz-Wiederholungen. Monomere des Initiator-Proteins binden an die Iterons und formen so den Initiationskomplex; Dimere binden dagegen an die *inverted repeats*, die mit der *repA*-Promotorregion überlappen, und fungieren damit als Selbst-Repressoren. Eine Region, die alle diese Eigenschaften erfüllt, wurde innerhalb der 18.4 kb Insel nicht gefunden, auch gibt es keine Leserahmen, die *repA*-Homologien aufweisen. RepA kann allerdings auch von anderen Plasmiden in der Zelle rekrutiert werden [191-193].

Eine andere Form der Selbst-Replikation kommt z. B. beim *E. coli* Phagen P4 vor. Genau genommen handelt es sich bei diesem Element um ein Phagen-Plasmid (Phasmid) [194]. Dieses kann sowohl als Prophage ins Genom integrieren (bevorzugte Form), als auch als *high copy number* Plasmid außerhalb des Bakterienchromosoms vorkommen (ca. 0.3% aller P4-Lysogene) [195]. In der letztgenannten Form ist P4 zur RepA-unabhängigen autonomen Replikation fähig. Neben dem *ori* sind die sog. *cis replicating region* (*crr*) sowie das ebenfalls auf P4 kodierte  $\alpha$ -Protein für die Vervielfältigung erforderlich. Das multifunktionelle  $\alpha$ -Protein bindet an die *ori*- sowie an die *crr*-Region und besitzt sowohl Primase- als auch Helicase-Aktivität. Zur Elongation wird eine Wirtszell-Polymerase benutzt [194]. Abgesehen von einer Integrase, die zur P4-Familie gezählt wird, weist die 18.4 kb Insel keine Sequenzhomologien zu dem *E. coli* Phagen auf. Allerdings wurden für die Leserahmen 8 und 9 Primase- bzw. Helicase-Domänen identifiziert.

#### **4.4.4 Horizontale Übertragbarkeit der 18.4 kb Insel**

Unter der Annahme, dass die Integration der Insel ins Genom monophasischer *S. Typhimurium*-Isolate ein relativ nah zurückliegendes Ereignis war, sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich immer noch um ein mobiles (oder mobilisierbares) Element handelt. Zunächst stellte sich die Frage, welcher Gruppe mobiler genetischer Elemente die Insel zuzuordnen ist. Da sie ins Genom integriert ist, handelt es sich nicht um ein klassisches Plasmid. Auch ein integratives Plasmid ist die Insel nicht, denn diese werden üblicherweise nicht an tRNA-Loci ins Chromosom eingefügt [196]. Trotz der beidseitigen repetitiven Sequenzen ist die Insel auch kein Transposon, da sie stets an der gleichen Stelle im Chromosom zu finden ist und es keine Hinweise darauf gibt, dass sie innerhalb des Genoms springt. Obwohl das Fragment sich an einer bekannten Prophagen-Integrationsstelle im Genom befindet und die typischen *attachment sites* aufweist, ist es zudem kein intakter Prophage, da die Gene für die Ausbildung von Phagen-Strukturproteinen fehlen. Transfer-assoziierte Gene, wie sie für ICEs typisch sind, wurden ebenfalls nicht gefunden. Möglicherweise handelt es sich um einen kryptischen Prophagen oder um ein integratives mobilisierbares Element.

Der Umstand, dass die Insel in dieser Form bislang nur in *S. Typhimurium* und hier bevorzugt in der monophasischen Variante des Lysotyps DT193 (und naher Verwandter) gefunden wurde, deutet darauf hin, dass sie von einem Vorläuferstamm einmalig (wahrscheinlich in mehreren Schritten) akquiriert und klonal an die Nachkommen weitergegeben wurde, wo sie nun stabil im Genom integriert ist. Es könnte sich hierbei um einen defekten Prophagen handeln, da zum einen durch BLAST-Analysen mehrere Phagen-assoziierte Gene vorhergesagt wurden und zum anderen die Deletion der Insel den Lysotyp beeinflusst hat. Diese Vermutung wurde durch ein Experiment unterstützt, welches zum Ziel hatte, spontane Verlustmutanten der Insel nachzuweisen: während der über fast achtzehn Monate durchgeführten vierwöchigen Passagen des Teststammes RKI 06-1900 konnte keine solche Mutante detektiert werden. Da bei diesem Versuchsansatz nur eine begrenzte Zahl zufällig ausgewählter Kolonien getestet wurde (keine natürliche Selektion möglich), kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass ein solches Deletions-Ereignis stattgefunden hat. Für eine verlässlichere Aussage sollte der Versuch mit der Cm-markierten Insel wiederholt werden. Über *replica plating* wäre eine Selektion auf Cm-sensitive Verlustmutanten möglich.



Im Umkehrschluss wurde versucht, das 18.4 kb Fragment durch Konjugation auf einen geeigneten Empfänger zu übertragen, nachdem seine Mobilisierung durch Detektion eines zirkulären Zwischenproduktes bewiesen wurde. Vorab wurde am 3'-Ende der Insel im monophasischen Isolat RKI 08-05217 ein Selektionsmarker in Form einer Cm-Kassette eingefügt (Stamm WR 2076) und die so markierte Insel in den biphasischen Laborstamm STM LT2 transduziert (Stamm WR 2077). Beide Mutanten WR 2076 und WR 2077 wurden als Donoren eingesetzt. Als Rezipient wurde LB5010 gewählt, ebenfalls ein (stark modifizierter) Abkömmling von STM LT2. Unter Verwendung des Stammpaares WR 2077 / LB5010 konnte die 18.4 kb Insel mit unerwartet großer Effizienz übertragen werden. Die hohen Konjugationsraten (s. 3.5.2) sind z. T. dadurch erklärbar, dass LB5010 durch Mutation der chromosomalen Restriktions-Modifikationssysteme besonders gut als Rezipient für Konjugationsexperimente geeignet ist [135]. In der Umwelt bzw. im gesunden Wirtsorganismus sind solche Transferereignisse sehr viel seltener, da der für die Übertragung nötige direkte Zellkontakt aufgrund einer relativ geringen Dichte an *Enterobacteriaceae* (verglichen mit der restlichen mikrobiellen Darmflora) kaum stattfindet. Neueste Daten von Stecher *et al.* zeigen aber, dass Entzündungsreaktionen im Darm den HGT zwischen kommensalen und pathogenen Enterobakterien unterstützen, indem sie die natürliche Darmflora supprimieren, die Kolonisierung der *Enterobacteriaceae* (und damit das Erreichen der nötigen Zelldichte) dagegen fördern [197,198].

Ein konjugativer Transfer ist prinzipiell nur möglich, wenn alle zur Übertragung benötigten Mobilisierungs- und Transfergene auf dem Element selbst kodiert sind, wie es i. d. R. bei konjugativen Plasmiden oder Integrativen Konjugativen Elementen (ICE) einschließlich konjugativen Transposons der Fall ist, oder wenn die Transfer-Faktoren anderweitig in *cis* oder in *trans* bereit gestellt werden, beispielsweise durch ein Helferplasmid oder ein ICE-Element [31]. Die *origin of transfer (oriT)*-Region muss auf dem zu übertragenden Element selbst vorhanden sein. Die hier beschriebene 18.4 kb Insel besitzt eine putative Integrase (ORF 1), die wahrscheinlich für die Integration und die Mobilisierung aus dem bakteriellen Chromosom bedeutsam ist, Transfergene für eine interzelluläre Übertragung sind dagegen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht (oder nicht mehr) auf der Insel kodiert. Daraus kann man schlussfolgern, dass das 18.4 kb Element zwar mobilisierbar aber nicht selbstübertragbar ist - ähnlich wie es für die SGI1 gezeigt wurde [42], es sich also nicht um ein ICE-Element handelt. Die durchgeführten Konjugationsexperimente unterstützen diese Vermutung, denn sie waren nur erfolgreich, wenn WR 2077 als Donor verwendet wurde.

Dieser Stamm besitzt das ca. 94 kb (60 MDa) große serovar-spezifische Virulenz-Plasmid pSLT [199], das in biphasischen *S. Typhimurium* weit verbreitet ist; in der monophasischen STM-Variante kommt es dagegen sehr selten vor [120]. pSLT galt lange als nicht-konjugativ [200], Ahmer und Kollegen konnten seine eigenständige Übertragbarkeit aber schließlich nachweisen [201] und spätere Sequenzanalysen zeigten, dass auf dem Plasmid (NC\_003277.1) ein Transfer-Operon kodiert ist. Der Donor WR 2076 besitzt dieses Plasmid nicht. Möglicherweise stellte dieses mobile Element die Transfer-Maschinerie für die Übertragung der Insel zur Verfügung. In diesem Fall würde man erwarten, dass sich der Anteil an biphasischen *S. Typhimurium* mit 18.4 kb Insel in Zukunft erhöht. Da diese Stämme bislang nicht routinemäßig auf das Vorhandensein der Insel untersucht wurden, kann an dieser Stelle keine Aussage über eine evtl. Zunahme solcher Isolate getroffen werden. Alternativ könnten aber auch ins Genom integrierte mobile Elemente wie ICEs den konjugativen Transfer vermitteln. Für diesen Vorgang scheinen Ähnlichkeiten in den *oriT*-Regionen von Bedeutung zu sein [202] [43] [203], obwohl bislang nur sehr wenige *oriT*-Regionen genomischer Inseln identifiziert werden konnten. In Frage kommende mobilisierende IC-Elemente wurden für den Wildtyp des Donorstammes (STM LT2) allerdings bislang nicht beschrieben.

Wie oben erwähnt, finden sich auf der 18.4 kb Insel keine Gene, die eindeutig mit einem konjugativen Transferprozess in Verbindung stehen. Dennoch gibt es einige Leserahmen, deren Beteiligung an einem konjugativen Transfer-Ereignis nicht ausgeschlossen werden kann. Die ORFs 8 und 9 zeigen Ähnlichkeiten mit Helicase-Domänen und könnten u. U. an der DNA-Modifikation im Vorfeld eines Transfer-Ereignisses beteiligt sein. ORF 1b kodiert für einen putativen Transkriptions-Regulator. Eine von vielen beschriebenen Funktionen dieser regulatorischen Proteine ist die Förderung oder Unterdrückung von Transfer-assoziierten Genen [204]. Bemerkt werden soll an dieser Stelle auch, dass Protein-BLAST-Analysen für die Aminosäuren 24 bis 61 des ORF 6a eine 68%ige Ähnlichkeit zur „type IV secretion/conjugal transfer ATPase, VirB4 family“ von *Salmonella enterica* sv. Montevideo ergaben (GenBank: EHC71374.1). Bei VirB4 handelt es sich um eine ATPase, die sowohl für den Substrat-Transport über die innere Membran als auch für die T4 Pilus-Assemblierung benötigt wird. VirB4-Homologe wurden in allen Spezies mit T4SS nachgewiesen, was auf eine fundamentale Rolle des Proteins innerhalb des T4-Sekretionsapparates hindeutet [85]. Die ähnliche Region sowie der gesamte ORF 6a sind verglichen mit der Größe des VirB4-ähnlichen Proteins in *S. Montevideo* nur sehr klein, weshalb sie in der Tabelle der ORF-Homologen keine Erwähnung fand (s. 3.3.2). Dennoch gibt sie einen Hinweis darauf, dass die Insel möglicherweise für

Komponenten kodiert, die an einem Typ IV-vermittelten DNA-(oder Protein-) Transfer beteiligt sein könnten. Für *Salmonella* spp. wurde nur ein chromosomales T4SS auf SPI7 beschrieben, welche bislang in *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* und einigen *S. Derby*-Isolaten gefunden wurde [88].

Extrachromosomale zirkuläre Zwischenprodukte können sowohl beim konjugativen als auch beim Phagen-vermittelten Transfer gebildet werden [41]. Eine Übertragung durch Transduktion wäre auch für die hier beschriebene Insel denkbar. Da viele GIs / PAIs Phagengene besitzen (v. a. Integrasen) und auch sonst mehrere Eigenschaften mit (Pro-)Phagen teilen, wie die Lokalisation an tRNA-Loci, flankierende repetitive Sequenzen etc., ging man lange davon aus, dass genomische Inseln von Prophagen abstammen und über Transduktion akquiriert wurden [205]. Außerdem ist z. B. von *Vibrio cholerae* bekannt, dass die Interaktion zwischen Bakteriophagen zur sequenziellen Akquisition von Virulenzgenen führen kann. Boyd *et al.* verweisen allerdings auch darauf, dass das Vorhandensein von phagen-ähnlichen Integrasen und *attachment sites* keine hinreichenden Beweise für einen Transfer durch Transduktion darstellen, da beispielsweise auch konjugative Transposons in tRNA-Gene integrieren können und ähnliche Integrasen nutzen [205]. Ein weiteres Argument gegen die Übertragung der Insel durch Transduktion liegt im gleichen genetischen Hintergrund von Donor und Rezipient begründet – beides sind STM LT2-Abkömmlinge, auch wenn der Rezipient sehr stark modifiziert wurde. Man würde demnach den gleichen Prophagenbesatz erwarten, was zur Folge hätte, dass ein aktivierter (und transduzierender) Prophage des Donors den Rezipienten nicht (super-)infizieren könnte (Phagenimmunität). Der Rezipientenstamm LB5010 wurde während dieser Arbeit nicht auf seinen Prophagengehalt untersucht. Auch wenn die Mechanismen des Transfers der Insel hier nicht eindeutig geklärt werden konnten, kann festgestellt werden, dass es sich um ein mobilisierbares genetisches Element handelt, das nach der Übertragung in einen geeigneten Rezipienten an spezifischer Stelle (am *thrW* tRNA-Locus) in dessen Chromosom rekombiniert.

## 5 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnten wesentliche Merkmale und Eigenschaften einer bislang unbekannten 18.4 kb Insel im *thrW* tRNA Locus von *Salmonella* Typhimurium beschrieben werden, die vorrangig die strukturelle Organisation und Verbreitung des Elements betreffen. Die Aufklärung der Funktion der Insel gelang bisher jedoch nicht und läßt Raum für weiterführende Untersuchungen. Diese könnten sich sowohl auf die Produkte einzelner Leserahmen bzw. putativer Operons fokussieren, wie es am Beispiel von ORF 10 bereits begonnen wurde, oder einen mehr globalen Ansatz verfolgen, der die Beziehung des Gesamtelementes zu seinem Wirtsorganismus in den Mittelpunkt stellt.

Der Leserahmen 10 wurde in dieser Arbeit als vielversprechendes Target identifiziert, da es sich bei seinem Produkt nach Angabe zweier unabhängiger Vorhersageprogramme um einen putativen Typ III-Effektor handelt. Die Sekretion des ORF-Produktes konnte experimentell bestätigt werden, doch ist bislang nicht geklärt, ob das Protein tatsächlich in die Wirtszelle transloziert wird, in welchem Stadium des Infektionszyklus das ggf. passiert und welche eukaryotischen Zielstrukturen u. U. eine Rolle spielen. Hinweise zur Beantwortung dieser Fragen würden sich aus der eindeutigen Identifizierung des beteiligten Sekretionssystems ergeben. Dafür müßten weitere Untersuchungen mit Typ III- Doppel- und Dreifach-Mutanten von *S. Typhimurium* erfolgen. Zudem könnte man versuchen, putative bakterielle oder eukaryotische Interaktionspartner über *pull down*-Experimente mit dem getaggen ORF 10-Protein zu ermitteln, um Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen zu können.

Dem ORF 10 benachbart befinden sich zwei Gene, die für putative DNA-Transfer- bzw. Injektionsproteine kodieren (ORFs 11 und 12). Diese mit einem neuartigen Sekretionssystem in Verbindung zu bringen mag zunächst abwegig erscheinen, dennoch üben sie wahrscheinlich eine Funktion aus, die nicht mit der Übertragung von Phagen-DNA in Verbindung steht, denn anders ist ihre transkriptionelle Aktivität in einem defekten Prophagen nicht zu erklären. Da gezeigt werden konnte, dass Komponenten eines T6SS von *V. cholerae* homolog zu Phagenproteinen sind, die den Virus-DNA-Transport in die Wirtszelle vermitteln [78], sollten die beiden ORF-Produkte unter diesem Gesichtspunkt unbedingt weiter analysiert werden. Insbesondere wäre zu klären, ob das ORF 10-Produkt nach Deletion der Leserahmen 11 und 12 noch immer sekretiert wird.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die 18.4 kb Insel horizontal übertragen werden kann, wobei eine Selbstübertragbarkeit weitestgehend auszuschließen ist, da sich auf dem Element weder Transfergene für eine konjugative Übertragung noch Gene für Phagenstrukturproteine befinden. Der Transfermechanismus konnte daher nicht abschließend aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang sollte das pSLT-Plasmid im eingesetzten Donor (ein LT2-Abkömmling) noch einmal auf potenzielle Helfer-Aktivitäten untersucht werden. Außerdem sollte der Rezipientenstamm LB5010 auf integrierte Prophagen getestet werden, um zu klären, ob ein Transduktionsereignis zwischen Donor und Rezipient möglich wäre oder ob dem Phagenimmunitätsmechanismen entgegenstehen.

Daneben stellt sich die Frage, ob das Element in seiner zirkulären Form selbst-replikativ ist. So wurden bereits für einige genomische Inseln *oriV*-Regionen identifiziert [206]. Bislang gibt es für die 18.4 kb Insel keine Hinweise auf replikative Strukturen (mit Ausnahme der putativen Primase-Helicase-Domänen kodiert durch die ORFs 8 und 9), was einen autonomen Replikationsvorgang unwahrscheinlich erscheinen lässt. Doch würde auch der eindeutige Nachweis des Unvermögens zur Selbst-Replikation die funktionelle Charakterisierung der Insel vervollständigen.

Schlussendlich bleibt die Frage offen, warum sich die monophasische *S. Typhimurium*-Variante in den letzten Jahren so stark verbreitet hat, die biphasische Ursprungsform dagegen zurückgeht. Dieses Phänomen ist nur durch einen selektiven Vorteil der monophasischen Stämme gegenüber den biphasischen erklärbar, der sich evtl. in einer stärkeren Anpassungsfähigkeit an spezielle Nischen oder Umweltbedingungen widerspiegelt. Zum Zwecke der Aufklärung eines solchen Mechanismus könnten Wachstumsexperimente unter verschiedenen Anzuchtbedingungen oder Untersuchungen zur Biofilmbildung durchgeführt werden. Auch würde die Ganzgenomsequenzierung monophasischer Isolate Aufschluss über weitere Abweichungen im Genom von mono- und biphasischen *S. Typhimurium* Isolaten geben, die ggf. in derartige Prozesse involviert sind. Die Assemblierung der Genomsequenz des RKI 06-01900 Isolates stand bei Abschluss dieser Arbeit leider noch aus.

## Anhang

| Oligo-Nr.  | Verwendungszweck und Oligo-Name       | 5' → 3' - Sequenz     | Quelle                      |
|--|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <b>Primer für Prophagen-Integrationsstellen in <i>S. Typhimurium</i></b> |                                       |                       |                             |
| 1  | W104att_pp490                         | TGGCGTCGTCATCTATTC    | Bossi (unpublished)         |
| 2  | W104_phage                            | GGCGCTTATAGAGTCTGC    | dto.                        |
| 3  | W104att_pp495                         | TCGAGGGGAAACACATAA    | dto.                        |
| 4  | Fels-2/sopEphi_pp210 phage            | TGAACTGTCCAGAGTGCG    | dto.                        |
| 5  | Fels-2/sopEphi_pp244                  | ACGCGTGTCACAAGTCTG    | dto.                        |
| 6  | Fels-2/sopEphi_pp299                  | TGGTGCTAAACATGGTGC    | dto.                        |
| 7  | P22/ST64T att_pp452(Pr. 2 Abb. 3.6)   | TGGCGCATGGTAAACAAG    | dto.                        |
| 8  | P22/ST64T att_pp530 (Pr. 1 Abb. 3.6)  | GGTCAGCACGCAGAAATTAC  | dto.                        |
| 9  | P22/ST64T_pp533 phage(Pr. 3 Abb. 3.6) | GGTGTTCTGCTACAAGGAAAG | dto.                        |
| 10   | ST64B att_pp453                       | AGGGCCACTTAATCATCG    | dto.                        |
| 11   | ST64B_pp454 phage                     | TGCGTTGGTGTGGATAAG    | dto.                        |
| 12   | ST64B att_pp456                       | GCATAAGATGGCGATACG    | dto.                        |
| 13   | Gifsy-1att_pp457                      | AGTTCCTGCTCTCCTTAC    | dto.                        |
| 14   | Gifsy-1att_pp460                      | GGCGTGTGATAAAAGTTC    | dto.                        |
| 15   | Gifsy-1_pp505 phage                   | TGGGTTAACTCAAGCAA     | dto.                        |
| 16   | Gifsy-2att_pp769                      | CCGCTACCTGCACATCAT    | dto.                        |
| 17   | Gifsy-2_pp770 phage                   | GCAGTCGCATCGCTACAT    | dto.                        |
| 18   | Gifsy-2att_pp772                      | GCAGTCGCATCGCTACAT    | dto.                        |
| 19   | Gifsy-3attpp_599                      | TTGGCGGTATCGGTATTG    | dto.                        |
| 20   | Gifsy-3att_pp600                      | TCCATCAGGCGTTCAAAG    | dto.                        |
| 21   | Gifsy-3_pp601 phage                   | CGCAAATCCCCAGAATAC    | dto.                        |
| 22   | Fels-1att_pp602                       | GCACGGGATGAGCAAAGA    | dto.                        |
| 23   | Fels-1att_pp603                       | CGCTGACGCTGACCATTA    | dto.                        |
| 24   | Fels-1_pp604 phage                    | TTATTGACGCCTGCCATCA   | dto.                        |
| <b>Primer für tRNA-Regionen</b>  |                                       |                       |                             |
| 25   | uppertRNAregA                         | GCAAAGTTTGTACCCGCAAT  | Laverde Gómez (unpublished) |
| 26   | lowertRNAregA                         | AACCTCACAACCCGAAGATG  | dto.                        |
| 27   | uppertRNAregB                         | CGAGCTGGGTTTAGAACGTC  | dto.                        |
| 28   | lowertRNAregB                         | GGCAATAGCCTTTTCCATCA  | dto.                        |
| 29   | uppertRNAregC                         | GCTTTTGGCGTACACGGTAT  | dto.                        |
| 30   | lowertRNAregC                         | ATTCGCGGTAATTACGCTGTC | dto.                        |
| 31   | uppertRNAregD                         | GGAAGCGCAAATGGAAAAGTA | dto.                        |
| 32   | lowertRNAregD                         | CCATACGCTGAAGGTGGAAT  | dto.                        |
| 33   | uppertRNAregE                         | GCGGAGTGACTTTGTCTGCT  | dto.                        |
| 34   | lowertRNAregE                         | ACACGCGAGGAAAATAGACG  | dto.                        |
| 35   | uppertRNAregG                         | CGCTTTGTTTTCTTGACACA  | dto.                        |
| 36   | lowertRNAregG                         | ACGGCAAGATGGAAAAACAC  | dto.                        |
| 37   | uppertRNAregH                         | GAAGCGTCTTAACGCGATGT  | dto.                        |
| 38   | lowertRNAregH                         | ACTGTTGAATTTCCGGATCG  | dto.                        |
| 39   | uppertRNAregI                         | GGTGTACGCGGGATAGTTGT  | dto.                        |
| 40   | lowertRNAregI                         | TAACGCCTGGGATAACGAAG  | dto.                        |
| 41   | uppertRNAregJ                         | TACCCAAAGCGAAACATTCC  | dto.                        |
| 42   | lowertRNAregJ                         | GCGGAGCAGCAGAAAAATAC  | dto.                        |
| 43   | uppertRNAregK                         | TCGCAACGGTAACATATCCA  | dto.                        |
| 44   | lowertRNAregK                         | ATACCTGGCTGACGGCATAAC | dto.                        |
| 45   | uppertRNAregL                         | GGCCGATACTAACGCCTTTT  | dto.                        |
| 46   | lowertRNAregL                         | AAGGCAAAACGGCTGAACT   | dto.                        |
| 47   | uppertRNAregM                         | CGGATATCTGCAAAGCCTGT  | dto.                        |
| 48   | lowertRNAregM                         | GCTGCGAGGTATTTCCATA   | dto.                        |
| 49   | uppertRNAregN                         | ATTCAGCTGATTGCGCTTT   | dto.                        |
| 50   | lowertRNAregN                         | GCGGTTATATCCTGGCGTTA  | dto.                        |
| 51   | uppertRNAregO                         | CGTCGGGTAGTGATTCTGGT  | dto.                        |
| 52   | lowertRNAregO                         | CCTCGGTGACGCCTATATGT  | dto.                        |

|     |                                 |                                    |      |
|-----|---------------------------------|------------------------------------|------|
| 53  | uppertRNAregP                   | GATGATAGCCCGCAAATTA                | dto. |
| 54  | lowertRNAregP                   | AGCAAAGCGCAACCTACAAT               | dto. |
| 55  | uppertRNAregQ long              | TTTGTAATTTTCCGGTTGTATTGTCATGT      | dto. |
| 56  | lowertRNAregQ long              | TTAACGAGTCGAGCTCAAATCCTGTAG        | dto. |
| 57  | uppertRNAregR                   | ACCTCGCTCGACATTGAGTT               | dto. |
| 58  | lowertRNAregR                   | TCTGGCTTAATGCTGCCTTT               | dto. |
| 59  | uppertRNAregS                   | CTTCCCAGATAATGCCGAAA               | dto. |
| 60  | lowertRNAregS                   | TAACTTTGGCATTGGCCTTC               | dto. |
| 61  | uppertRNAregT                   | ATTTTACC GGCCGATTACC               | dto. |
| 62  | lowertRNAregT                   | CTGCTGATATGCGCGATAGA               | dto. |
| 63  | uppertRNAregU                   | GTTTGCCAACGCGATTATCT               | dto. |
| 64  | lowertRNAregU                   | CTCCTGATAGCGTCACGACA               | dto. |
| 65  | uppertRNAregV                   | CAGCGGATAGCTGATTTTCC               | dto. |
| 66  | lowertRNAregV                   | ACGCACGAGGAGAGAGGTAA               | dto. |
| 67  | uppertRNAregW                   | CCACCACCACACAGAAGTTG               | dto. |
| 68  | lowertRNAregW                   | AAGATCACGATCTGGCATCC               | dto. |
| 69  | uppertRNAregX                   | GCCAGCAGGAATTAACCAA                | dto. |
| 70  | lowertRNAregX                   | AAGGGATTTGCTTGCTGAGA               | dto. |
| 71  | uppertRNAregY new               | GAAACTGGCAGGCTTGAGTC               | dto. |
| 72  | lowertRNAregY new               | ACGAGTCACACTGGGTTTCC               | dto. |
| 73  | uppertRNAregZ                   | TTGCCTGTTTCATCAAAACGA              | dto. |
| 74  | lowertRNAregZ                   | CGAGTTGGTGAGACCCTCAT               | dto. |
| 75  | uppertRNAregZ <sub>A</sub>      | CGGCTTAAAGAAGACGAACG               | dto. |
| 76  | lowertRNAregZ <sub>A</sub>      | AATTCGGTAAAGCGGTGTG                | dto. |
| 77  | uppertRNAregZ <sub>B</sub>      | TGCTTTTCTCGGAACACCTT               | dto. |
| 78  | lowertRNAregZ <sub>B</sub>      | GTTCCAGTAATTCGGCTCA                | dto. |
| 79  | uppertRNAregZ <sub>C</sub>      | TAACGCTGGCGCAATTTTAT               | dto. |
| 80  | lowertRNAregZ <sub>C</sub>      | CCTCCATCAGCAAGAAATGG               | dto. |
| 81  | uppertRNAregZ <sub>D</sub> new  | GTCTGCGATGAGTCCGGTAT               | dto. |
| 82  | lowertRNAregZ <sub>D</sub> new  | CCAATGGCGATCTTTTGTTT               | dto. |
| 83  | uppertRNAregZ <sub>E</sub>      | CGGCTTAAAGAAGACGAACG               | dto. |
| 84  | lowertRNAregZ <sub>E</sub>      | AATTCGGTAAAGCGGTGTG                | dto. |
| 85  | uppertRNAregZ <sub>F</sub>      | TGCTTTTCTCGGAACACCTT               | dto. |
| 86  | lowertRNAregZ <sub>F</sub>      | GTTCCAGTAATTCGGCTCA                | dto. |
| 87  | uppertRNAregZ <sub>G</sub> long | GAAAAGACTAATTCAGTTGCATTGCTTAC      | dto. |
| 88  | lowertRNAregZ <sub>G</sub> long | CCTGAGAAAGATAGTCGTCCTTCCACTTA      | dto. |
| 89  | uppertRNAregZ <sub>H</sub>      | CAGCACAGCTTCTGCTAACG               | dto. |
| 90  | lowertRNAregZ <sub>H</sub>      | GGATAATAACCCGACGCGTA               | dto. |
| 91  | uppertRNAregZ <sub>I</sub>      | CAGTTTCACCAGAGGCATCA               | dto. |
| 92  | lowertRNAregZ <sub>I</sub>      | GTTGAAAACCAACCGGAAGA               | dto. |
| 93  | uppertRNAregZ <sub>J1</sub>     | TATGCCACCTGGAAGTGTA                | dto. |
| 94  | lowertRNAregZ <sub>J1</sub>     | TTCCCTCACGGTACTGGTTC               | dto. |
| 95  | uppertRNAregZ <sub>J2</sub>     | AGAGTAACGGAGGAGCACGA               | dto. |
| 96  | lowertRNAregZ <sub>J2</sub>     | CGCCATAACGAGTTTTCCAT               | dto. |
| 97  | uppertRNAregZ <sub>K</sub>      | GATTAGCCAACTGCGCTTTC               | dto. |
| 98  | lowertRNAregZ <sub>K</sub>      | ACAACAGGCGTGGATAGGAC               | dto. |
| 99  | uppertRNAregZ <sub>L</sub>      | GGCGAAACGGATACCAGTAA               | dto. |
| 100 | lowertRNAregZ <sub>L</sub>      | GCCCTACTCATCGAGCTCAC               | dto. |
| 101 | uppertRNAregZ <sub>M</sub>      | CCCGCATTACGTGAAAAGTT               | dto. |
| 102 | lowertRNAregZ <sub>M</sub>      | TCGGGTCTATACCCTGCAAC               | dto. |
| 103 | uppertRNAregZ <sub>N</sub>      | CGCAAAATGTGAGCGATAGA               | dto. |
| 104 | lowertRNAregZ <sub>N</sub>      | ATGTACGGAACGCCTACCTG               | dto. |
| 105 | uppertRNAregZ <sub>O</sub>      | ACGACGTTGTTGCATGGTAA               | dto. |
| 106 | lowertRNAregZ <sub>O</sub>      | AACCTCACAACCCGAAGATG               | dto. |
| 107 | uppertRNAregZ <sub>P</sub> long | AGGAACTAAAAGCTAAAGTGCGAGAACAA<br>C | dto. |
| 108 | lowertRNAregZ <sub>P</sub> long | CTATTCACCAACTGGCTAATCAACAAAAAC     | dto. |
| 109 | uppertRNAregZ <sub>Q</sub>      | AATAGCGCGTCGTTGTCTTT               | dto. |
| 110 | lowertRNAregZ <sub>Q</sub>      | TCATTGAAGTGACGCTACCG               | dto. |
| 111 | uppertRNAregZ <sub>R</sub>      | GCCGGCAATTAATGTAAACG               | dto. |

|  |  |                             |                                |
|--|--|-----------------------------|--------------------------------|
| 112  | lowertRNAregZ <sub>R</sub>               | TTGCCAGTGAAGAGAAATG         | dto.                           |
| 113  | uppertRNAregZ <sub>S</sub>               | TTGGCAATGATGAAGTGGAA        | dto.                           |
| 114  | lowertRNAregZ <sub>S</sub>               | ACGGACTGGATGTTGGTAGC        | dto.                           |
| <b>Long Template PCR für thrW tRNA-Locus</b>   |  |                             |                                |
| 115  | Long proA-STM0325 new forw.              | TGTCAACGCCTCTACCCGTTTACC    | diese Arbeit                   |
| 116  | Long proA-STM0325 new rev.               | CATCTGTAAAGCGGTACGTCTGGCATC | diese Arbeit                   |
| <b>Okkupationszustand des thrW tRNA-Locus (zus. mit Oligos Nr. 7 – 9)</b>            |  |                             |                                |
| 117  | thrW insert left lower (Pr. 4 Abb. 3.6)  | GAGTAACTGGACAATGCC          | Laverde Gómez<br>(unpublished) |
| 118  | thrW insert right upper (Pr. 5 Abb. 3.6) | ATCAGCCCATTAGCTGCCTG        | dto.                           |
| <b>Single-ORF-Primer</b>   |  |                             |                                |
| 119  | thrW_ORF1(935)upper                      | AGGTATCGCTGGTGGTATCG        | diese Arbeit                   |
| 120  | thrW_ORF1(935)lower                      | AGTCGGCATACCATTTGAAGC       | diese Arbeit                   |
| 121  | thrW_ORF2(169)upper                      | AGTTAGAACGCCAGCTTGGA        | diese Arbeit                   |
| 122  | thrW_ORF2(169)lower                      | TGCTGAGAAAAGTCCGTTGTG       | diese Arbeit                   |
| 123  | thrW_ORF3(207)upper                      | CTAAAAGCCCGTCTCAGTGC        | diese Arbeit                   |
| 124  | thrW_ORF3(207)lower                      | GTTTCATATGGTCGCGAGGTT       | diese Arbeit                   |
| 125  | thrW_ORF4(681)upper                      | TCCACAAAAACATTCGTCCA        | diese Arbeit                   |
| 126  | thrW_ORF4(681)lower                      | GTCTCGTGAGGGAGAGTTGC        | diese Arbeit                   |
| 127  | thrW_ORF5(163)upper                      | TCCACAAAAACATTCGTCCA        | diese Arbeit                   |
| 128  | thrW_ORF5(163)lower                      | TTCACCCCCAAGAATTACCA        | diese Arbeit                   |
| 129  | thrW_ORF6(230)upper                      | CGTGTGAGCTGGAAATTGAA        | diese Arbeit                   |
| 130  | thrW_ORF6(230) lower                     | CGCACTCTCCACATCGATTA        | diese Arbeit                   |
| 131  | thrW_ORF7(494)upper                      | CAACGATGGCATGACAGAAC        | diese Arbeit                   |
| 132  | thrW_ORF7(494)lower                      | CGGCAATAAAGCTGTTGTGA        | diese Arbeit                   |
| 133  | thrW_ORF8(1202) upper                    | CCGCTGATGTTCTGGGTATT        | diese Arbeit                   |
| 134  | thrW_ORF8(1202) lower                    | TTCATTACCGGCACAGACAA        | diese Arbeit                   |
| 135  | thrW_ORF9(855)upper                      | TTGTCTGTGCCGGTAATGAA        | diese Arbeit                   |
| 136  | thrW_ORF9(855)lower                      | TCCGACCTCTGGTAGTTCTGT       | diese Arbeit                   |
| 137  | thrW_ORF10(577)upper                     | CCAAAGTCTGGAACGCACTT        | diese Arbeit                   |
| 138  | thrW_ORF10(577)lower                     | CGCTGGCTTAACCTTGATGC        | diese Arbeit                   |
| 139  | thrW_ORF11(1007)upper                    | TGGCAGGTTTCATGATGGATA       | diese Arbeit                   |
| 140  | thrW_ORF11(1007)lower                    | CTGGCTGTGATACCTGCTCA        | diese Arbeit                   |
| 141  | thrW_ORF12(244)upper                     | GTCTGGGTGGCATTCTGAT         | diese Arbeit                   |
| 142  | thrW_ORF12(244)lower                     | CCGCTGGTGATATCGTCTTT        | diese Arbeit                   |
| 143  | thrW_ORF13(219)upper                     | CGATCAAAATTGAAAGGCAAA       | diese Arbeit                   |
| 144  | thrW_ORF13(219)lower                     | GAATGCTCAGGCTGTCATCA        | diese Arbeit                   |
| 145  | thrW_ORF14(646)upper                     | GCTGTTCCGGTTAAGGTTCA        | diese Arbeit                   |
| 146  | thrW_ORF14(646)lower                     | CGCTAAGCCAGTTTGGGAAG        | diese Arbeit                   |
| 147  | thrW_ORF15(250)upper                     | AGGAAAGCTGAAGAGCTGGA        | diese Arbeit                   |
| 148  | thrW_ORF15(250)lower                     | CATTTAACCGGAAGGCGTTA        | diese Arbeit                   |
| 149  | thrW_ORF16(447)upper                     | TTCATGCCGTGATCCAGTTA        | diese Arbeit                   |
| 150  | thrW_ORF16(447)lower                     | TAGCCTGCAATCTGTCGTTG        | diese Arbeit                   |
| 151  | thrW_ORF17(312)upper                     | CCGCATGTATTACCTGAT          | diese Arbeit                   |
| 152  | thrW_ORF17(312)lower                     | TTGAACCGGATAACCTCGAA        | diese Arbeit                   |
| <b>Single-ORF-RT-PCR-Primer (sofern nicht Oligos Nr. 119 – 152 verwendet wurden)</b> |  |                             |                                |
| 153  | thrW_ORF1(218)upper                      | CAGGCTCTTTCGCTTATTGG        | diese Arbeit                   |
| 154  | thrW_ORF1(218)lower                      | GTTTCTATCCACGCGGTGTT        | diese Arbeit                   |
| 155  | thrW_ORF7(415)upper                      | AAACATCATGTACCGCAGCA        | diese Arbeit                   |
| 156  | thrW_ORF7(415)lower                      | GGCATTCTTGTTCGACAT          | diese Arbeit                   |
| 157  | thrW_ORF8(198) upper                     | CGTTACGCATGTCACCATC         | diese Arbeit                   |
| 158  | thrW_ORF8(198) lower                     | CTACGCCTCCTGGCTTGTAG        | diese Arbeit                   |
| 159  | thrW_ORF9(515)upper                      | CTGAACCAATGCCGAATTTT        | diese Arbeit                   |
| 160  | thrW_ORF9(515)lower                      | TCCGACCTCTGGTAGTTCTGT       | diese Arbeit                   |
| 161  | thrW_ORF11(242)upper                     | AACAGCCCCAAAAGATCATGG       | diese Arbeit                   |
| 162  | thrW_ORF11(242)lower                     | CCTGACGGAGTATTGCCATT        | diese Arbeit                   |
| 163  | thrW_ORF15(165)upper                     | ACGATGATCGGGAATGGATA        | diese Arbeit                   |
| 164  | thrW_ORF15(165)lower                     | CATTTAACCGGAAGGCGTTA        | diese Arbeit                   |



| RT-PCR-Primer für sekundäre ORFs und gyrA |                         |                          |              |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------|
| 165                                       | ORF1a(139)upper         | CCTAATAGCGTGATCCTGCC     | diese Arbeit |
| 166                                       | ORF1a(139)lower         | CGTCAAATGTCTGAATACGCC    | diese Arbeit |
| 167                                       | ORF1b(101)upper         | CTCTCTGAAGTTCAAAGGCG     | diese Arbeit |
| 168                                       | ORF1b(101)lower         | GCCCGACTTCCAATTTTTACC    | diese Arbeit |
| 169                                       | ORF3a(167)upper         | AAAGGAGAAGCTCACCCGAC     | diese Arbeit |
| 170                                       | ORF3a(167)lower         | CGCGATAAAACGCTCACTCG     | diese Arbeit |
| 171                                       | ORF6a(172)upper         | ACATCCAGCTCATTGAAGCG     | diese Arbeit |
| 172                                       | ORF6a(172)lower         | TTGCCCAACAATTCGTCCG      | diese Arbeit |
| 173                                       | ORF9a(185)upper         | ACAAAGTGCGCCAGTTAG       | diese Arbeit |
| 174                                       | ORF9a(185)lower         | TTCTGCTGCCATATCTGTTG     | diese Arbeit |
| 175                                       | ORF10a(113)upper        | TTTTGCTCATCTGGCAGAC      | diese Arbeit |
| 176                                       | ORF10a(113)lower        | AAAAACGTCACGCCCTTG       | diese Arbeit |
| 177                                       | ORF10b(94)upper         | TGAGAAGCAAATGGAAGCG      | diese Arbeit |
| 178                                       | ORF10b(94)lower         | CGAGCAATTCGTGGATCG       | diese Arbeit |
| 179                                       | ORF13a(267)upper        | GGCATTGTGGTACATAGCTTGG   | diese Arbeit |
| 180                                       | ORF13a(267)lower        | CAACACATCACCCTACTCTG     | diese Arbeit |
| 181                                       | ORF14a(154)upper        | GCGAGAACAGACCGATTAAAC    | diese Arbeit |
| 182                                       | ORF14a(154)lower        | TTCTGGCTGATATTGAGCG      | diese Arbeit |
| 183                                       | ORF15a(147)upper        | TTGACCATCGCCAACTTG       | diese Arbeit |
| 184                                       | ORF15a(147)lower        | TGGCTTCTTCCACTGGTAG      | diese Arbeit |
| 185                                       | gyrA(169)forward        | AGTCCTATCTGGATTATGCGAT   | [207]        |
| 186                                       | gyrA(169)revers         | CGATTACGTCACCAACGACA     | dto.         |
| RT-PCR-Primer für put. Operons            |                         |                          |              |
| 187                                       | Operon 1_gesamt_forward | TTAGAATCTAGAGACGAGGTGG   | diese Arbeit |
| 188                                       | Operon 1_gesamt_revers  | GGCGGCTCAGAAATTAATC      | diese Arbeit |
| 189                                       | Operon 1a_forward       | ACAGGTAAAAATTGGAAGTCGG   | diese Arbeit |
| 190                                       | Operon 1a_revers        | TGTAAGGGGCGTAACATCAG     | diese Arbeit |
| 191                                       | Operon 1b_forward       | GCGAACATAAATGATCACAACG   | diese Arbeit |
| 192                                       | Operon 1b_revers        | AATAACCGGGACAATTGCG      | diese Arbeit |
| 193                                       | Operon 2_gesamt_forward | CATATTGCTGCCGAGTCTGA     | diese Arbeit |
| 194                                       | Operon 2_gesamt_revers  | GGCATTCTTTGTTCCGACAT     | diese Arbeit |
| 195                                       | Operon 2a_forward       | CATATTGCTGCCGAGTCTGA     | diese Arbeit |
| 196                                       | Operon 2a_revers        | GTCTCGTGAGGGAGAGTTGC     | diese Arbeit |
| 197                                       | Operon 2b_forward       | CGTGACGTTCAATTCCTGCTG    | diese Arbeit |
| 198                                       | Operon 2b_revers        | TTGAAGTGCGGACGTAAGGC     | diese Arbeit |
| 199                                       | Operon 2c_forward       | CGTGCTCATCTTTGGTTAACG    | diese Arbeit |
| 200                                       | Operon 2c_revers        | CCCAGCAATGATTCAATTTCC    | diese Arbeit |
| 201                                       | Operon 2d_forward       | CGTGTGAGCTGGAATTGAA      | diese Arbeit |
| 202                                       | Operon 2d_revers        | TTGCCCAACAATTCGTCCG      | diese Arbeit |
| 203                                       | Operon 2e_forward       | CTCAATGGCGTACCAGAAG      | diese Arbeit |
| 204                                       | Operon 2e_revers        | CATCAATATATGAGACGGCCTC   | diese Arbeit |
| 205                                       | Operon 3_gesamt_forward | CATGGGCGAATGTTGAAATG     | diese Arbeit |
| 206                                       | Operon 3_gesamt_revers  | TTAATTCTTCGCGCTCCG       | diese Arbeit |
| 207                                       | Operon 4_gesamt_forward | TGAGAAGCAAATGGAAGCG      | diese Arbeit |
| 208                                       | Operon 4_gesamt_revers  | CCGCTGGTGATATCGTCTTT     | diese Arbeit |
| 209                                       | Operon 4a_forward       | TGAGAAGCAAATGGAAGCG      | diese Arbeit |
| 210                                       | Operon 4a_revers        | AGTTAAAGTGTAAGCCAGCG     | diese Arbeit |
| 211                                       | Operon 4b_forward       | TTCTTCGTCGCAGACATTG      | diese Arbeit |
| 212                                       | Operon 4b_revers        | ACTGTGGAGAGGCGATAAC      | diese Arbeit |
| 213                                       | Operon 5_gesamt_forward | TTCTGGCTGATATTGAGCG      | diese Arbeit |
| 214                                       | Operon 5_gesamt_revers  | GCGAGAACAGACCGATTAAAC    | diese Arbeit |
| fliB-fliA intergenische Region            |                         |                          |              |
| 215                                       | RFLIA                   | GCGGTATACAGTGAATTCAC     | [152]        |
| 216                                       | FFLIB                   | CTGGCGACGATCTGTCGATG     | dto.         |
| fljB-Primer (2. Geißelphase)              |                         |                          |              |
| 217                                       | fljB_Lim_upper          | ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC | [208]        |
| 218                                       | fljB_Lim_lower          | TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG | dto.         |

|     | Nachweis von Gen-Deletionen im fljB-Cluster |  |                         |
|-----|---|--|-------------------------|
| 219 | STM2758 upper                               | GCCACCAGACATGGTTAAGAC  | Rabsch<br>(unpublished) |
| 220 | STM2758 lower                               | TGCCGATAGTGACCTCCTTC   | dto.                    |
| 221 | STM2759 upper                               | GCATCTGGTAATTGAAACGC   | dto.                    |
| 222 | STM2759 lower                               | GGGGAATAAAGCTCATGCTG   | dto.                    |
| 223 | STM2760 upper                               | CGCCTCTTTATGGCTCAGAC   | dto.                    |
| 224 | STM2760 lower                               | CCTGGGATAAACAGCTGGAA   | dto.                    |
| 225 | STM2761 upper                               | TCGATGCCAGTGATTTCCA  | dto.                    |
| 226 | STM2761 lower                               | CTTGCCCCACAAAATTGACT   | dto.                    |
| 227 | STM2762 upper                               | TCTTCGCAAGCAATGAAAT  | dto.                    |
| 228 | STM2762 lower                               | GGTAGTGCTAGGCGTTTTCG   | dto.                    |
| 229 | STM2763 upper                               | AGCACTAAGCCAGCCGATAA   | dto.                    |
| 230 | STM2763 lower                               | GACCGGGGAAAATATTTCTG   | dto.                    |
| 231 | STM2764 upper                               | TTCAATCGACAATGCCTCA  | dto.                    |
| 232 | STM2764 lower                               | ACGGTTTTCCGAAGCTTTTT   | dto.                    |
| 233 | STM2765 upper                               | TCGGTTCTCGTCTCAAGAT  | dto.                    |
| 234 | STM2765 lower                               | GCATCAGATCATTGCCGTAA   | dto.                    |
| 235 | STM2766 upper                               | GGATGCACTTTACCCTAG   | dto.                    |
| 236 | STM2766 lower                               | TTCAATAACGTGCCAGCAG  | dto.                    |
| 237 | STM2767 upper                               | TCCGCAATTATCCTTTCGAC   | dto.                    |
| 238 | STM2767 lower                               | AGAGACCCTTTGAGGCGTTT   | dto.                    |
| 239 | STM2768 upper                               | TCTGCCAGTTGACGTTTCAG   | dto.                    |
| 240 | STM2768 lower                               | CCTGAATTCGTCAGGAAGC  | dto.                    |
| 241 | STM2769 upper                               | GAAGCATTCACTGACGCAAA   | dto.                    |
| 242 | STM2769 lower                               | TAACCACGGCCAGATAAAGC   | dto.                    |
| 243 | STM2770 upper (fljA)                        | GCATTTACGCCTGTCGTTTT   | dto.                    |
| 244 | STM2770 lower (fljA)                        | GGCGAGAAGCTGAAATATGG   | dto.                    |
| 245 | STM2771 upper (fljB)                        | TGCATCATCAAGACCCGATA   | dto.                    |
| 246 | STM2771 lower (fljB)                        | AACGACGGTATCTCCATTGC   | dto.                    |
| 247 | STM2772 upper (hin)                         | GGAGAAAATCATGGCTACTATTGG   | dto.                    |
| 248 | STM2772 lower (hin)                         | TGCGGTCACAATTTGCACTA   | dto.                    |
| 249 | STM2773 upper (iroB)                        | CCAGCATGAGCATACTGCAA   | dto.                    |
| 250 | STM2773 lower (iroB)                        | GCGATTACCGAGGAAGGTATT  | dto.                    |
| 251 | STM2774 upper (iroC)                        | CCTCCATAACACCTGGCACT   | dto.                    |
| 252 | STM2774 lower (iroC)                        | AGCCGCTATCAACTGCTCAT   | dto.                    |
|     | Antibiotika-Resistenzgene                   |  |                         |
| 253 | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> _TemA (Ap)        | ATAAAATTCTTGAAGAC  | [123]                   |
| 254 | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> _TemB (Ap)        | TTACCAATGCTTAATCA  | dto.<br>dto.            |
| 255 | strA-strB_SAF (Strep)                       | AGCAGAGCGCGCCTTCGCTG   | dto.                    |
| 256 | strA-strB_SBR (Strep)                       | CCAAAGCCCACTTCACCGAC   | dto.                    |
| 257 | sul2_Sul2F_(Sulfamerazin)                   | TCAACATAACCTCGGACAGT   | dto.                    |
| 258 | sul2_Sul2R_(Sulfamerazin)                   | GATGAAGTCAGCTCCACCT  | dto.                    |
| 259 | tet(B)_TetBF (Tc)                           | ACGTTACTCGATGCCAT  | dto.                    |
| 260 | tet(B)_TetBR (Tc)                           | AGCACTTGCTCCTGTT   | dto.                    |
| 261 | SG1-Integron 5'CS                           | GGCATCCAAGCAGCAAG  | dto.                    |
| 262 | SG1-Integron 3'CS                           | AAGCAGACTTGACCTGA  | dto.                    |
|     | Red Swap-Primer (Datsenko / Wanner-Methode) |  |                         |
| 263 | H1-P1 thrW_proA                             | TAAGTGATCGGCTTTGGCGATGGTACGA<br>TTCGTGCGTAAgcgattgttaggctggagct      | diese Arbeit            |
| 264 | H2-P2 thrW_STM0325                          | AGCAGTGTTTAATTATAGTGAGTGTGATTA<br>CAATCGGTAGccatggtccatatgaatatcctcc | diese Arbeit            |
| 265 | H1-P1_CmORF17                               | ATCATACAATAAGTGGGTTAAAGGGAGAG<br>CGTTACCGCCTggaacttcggaataggaacttc   | diese Arbeit            |
| 266 | H2-P2_CmORF17                               | TTCCGCCCTGAAATTTGGTTGTTATTTCATA<br>CAGCATATCaatcctggtgtccctgttg      | diese Arbeit            |
| 267 | H1-P1_ORF10::3xFLAG                         | TATTTCAAAAAAAGGATTATGTGCTGCTAT                                       | diese Arbeit            |

|  |                                  |  |                            |
|--|----------------------------------|--|----------------------------|
|  | chromosomal                      | GGGTAAAAATGACTACAAAGACCATGACG<br>GTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACA<br>AGGATGACGATGACAAGTAAGcgattgtgtag<br>gctggagct |                            |
| 268  | H2-P2_ ORF10::3xFLAG chromosomal | AAATGACCTCTCCCCACCTGTACAGACCTG<br>TACCATTATccatggtccatatgaatcctcc  | diese Arbeit               |
| 269  | pKD3_cat c1                      | TTATACGCAAGGCGACAAGG   | [138]                      |
| 270  | pKD3_cat c2                      | GATCTTCCGTCACAGGTAGG   | dto.                       |
| 271  | pKD4_Km k1                       | CAGTCATAGCCGAATAGCCT   | dto.                       |
| 272  | pKD4_Km k2                       | CGGTGCCCTGAATGAACTGC   | dto.                       |
| 273  | pKD4_Km kt                       | CGGCCACAGTCGATGAATCC   | dto.                       |
| 274  | pKD46 upper gam                  | TGGCAGAACACATCCGGTAC   | diese Arbeit               |
| 275  | pKD46 lower exo                  | TCATCCCGCTCAATCACGAC   | diese Arbeit               |
| <b>Kontrollprimer Transduktion (P22_pac)</b>                                       |                                  |  |                            |
| 276  | P22_upper pac2                   | GTCATGGGCGAAATCCTAAA   | Ediberidze,<br>unpublished |
| 277  | P22_lower pac2                   | CAACTTGCGACTGCTCTTG  | dto.                       |
| 278  | P22_upper pac3                   | CTCATGACGGTCACCAACAC   | dto.                       |
| 279  | P22_lower pac3                   | CCACTGGACGTACAACATCG   | dto.                       |
| <b>Primer für zirkuläres Intermediat (Ringschluss)</b>                             |                                  |  |                            |
| 280  | Excis. ORF 17 forw.              | GAGGTTATCCGGTTCAAAGTAG   | diese Arbeit               |
| 281  | Excis. ORF 1 rev.                | ATCTTTTCCTCTCGTTTCGC   | diese Arbeit               |
| 282  | thrW_ORF17(176)upper             | TATCTGGCGCGATTACATACA  | diese Arbeit               |
| 283  | thrW insert left lower           | GAGTAACTGGACAATGCC   | diese Arbeit               |
| 284  | Seq.forward                      | GTATTAAAGCCCCGTTTCGTC  | diese Arbeit               |
| 285  | Seq. revers                      | GCCTTCTCTTTGGCTTGG   | diese Arbeit               |
| <b>Primer für Epitop-Tagging</b>   |                                  |  |                            |
| 286  | ORF3a::HA_forward                | CATGAATTCTAATGAGCAGCGCAAAGGAG<br>AAC   | diese Arbeit               |
| 287  | ORF3a::HA_revers                 | CAGTCTAGATTATTAcgcgtagtccggaacgtcgt<br>acgggtaGCATTTGTAACTCCGCGAAC   | diese Arbeit               |
| 288  | ORF9a::FLAG_forward              | CATGAATTCTAATGATGAGCACACCATTTT<br>AC   | diese Arbeit               |
| 289  | ORF9a::FLAG_revers               | CAGTCTAGATTATTAttgtcgtcgtcgtctttgtag<br>tcTTGTTTCATGTTTACCTCTC   | diese Arbeit               |
| 290  | ORF10::3xFLAG_forward            | CATGAATTCTAATGAACAATAACTATTGCA<br>TA   | diese Arbeit               |
| 291  | ORF10::3xFLAG_revers             | CAGTCTAGATTATTActgtcatcgtcatccttgta<br>atcgatgtcatgattataatcacggtcatggtctttgt<br>agtcATTTTACCCATAGCAG            | diese Arbeit               |
| <b>Primer für N-terminale Verkürzung von ORF 10 (revers Primer: Oligo Nr. 291)</b> |                                  |  |                            |
| 292  | ORF10::3xFLAG(aa17-246)_forw.    | CATGAATTCTAATGGAAGAATTA AAAAGTT<br>TCGCTACA  | diese Arbeit               |
| 293  | ORF10::3xFLAG(aa27-246)_forw.    | CATGAATTCTAATGGGGAATGCTGGCGAC<br>ATCCAAAGT   | diese Arbeit               |
| <b>Kontrollprimer Konjugation (neben Oligos 7, 8, 117, 118)</b>                    |                                  |  |                            |
| 294  | Sense-F1mod                      | CTTATGCCRATAATGGTACTACTAG  | [209]                      |
| 295  | Antisense-R1mod                  | TTTGACCAAYKYMGCSCAT  | dto.                       |
| 296  | Sense-Fe                         | GGCAACCCGACAGTAAGTGGCGATAC   | dto.                       |
| 297  | Antisense-Rx                     | CCATCCTTAAAGGATACGGC   | dto.                       |
| <b>pBAD24-Primer (Insertionskontrolle)</b>   |                                  |  |                            |
| 298  | pBAD24_seq_forward               | GGCGTCACACTTTGCTATGC   | [139]                      |
| 299  | pBAD24_seq_revers                | CAGACCGCTTCTGCGTTCTG   | dto.                       |

Tabelle A.1: Primer und Oligonukleotide

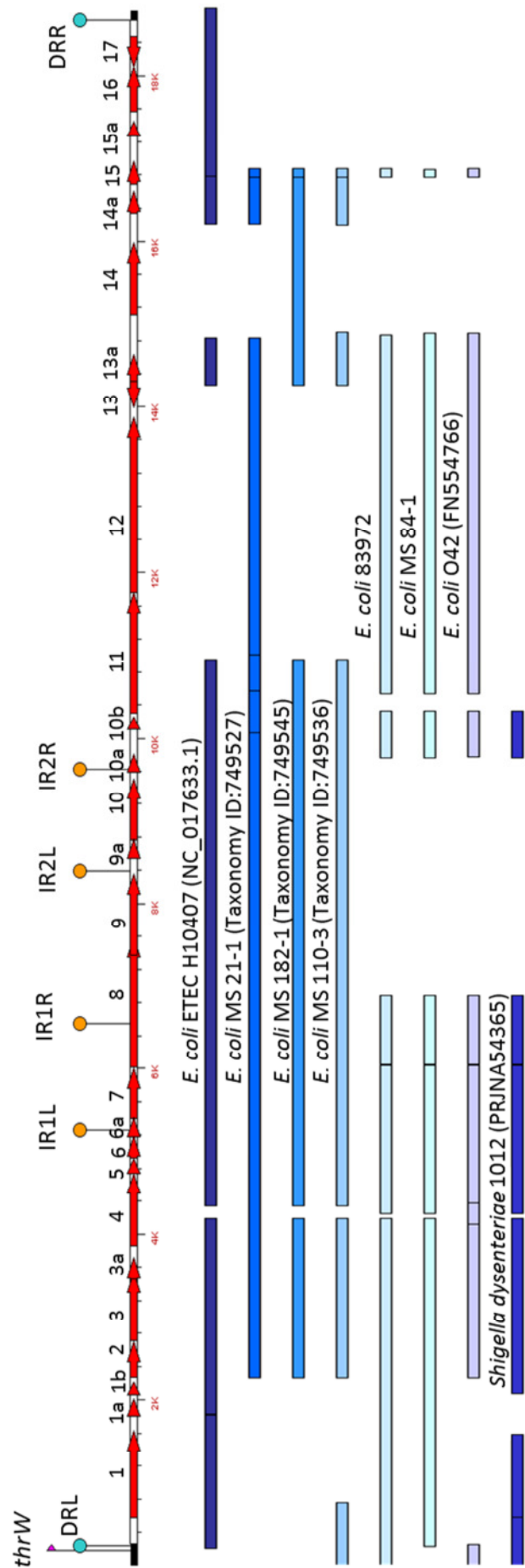


Abbildung A.1: Sequenzhomologien der Insel zu anderen *Enterobacteriaceae*

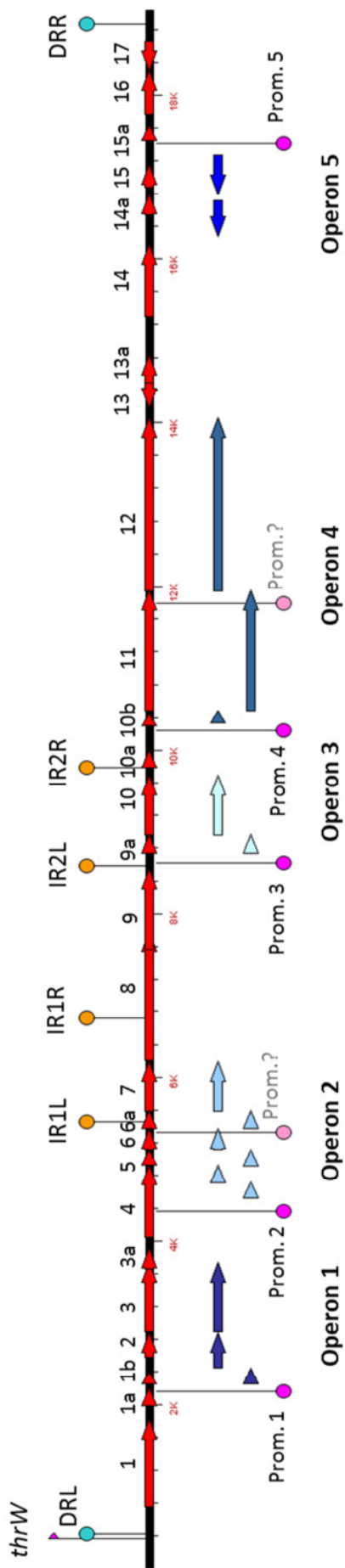


Abbildung A.2: Putative Operonstrukturen und Promotoren

rot: 27 ORFs der NCBI-Vorhersage; IR: *inverted repeat*; DR: *direct repeat*

Mol 1 STM 06-01900 (1 to 19089) Mol 2 STM LT2 (19 to 685)  
 Number of sequences to align: 2  
 Total length of aligned sequences with gaps: 19102 bps  
 Settings: Similarity significance value cutoff: >= 60%

Summary of alignment results:  
 Total length of aligned sequences with gaps: 19102 bps  
 Matching bases: 654 / 19102 (3%)  
 Gaps: 18448 / 19102 (96%)  
 Local homology blocks used in this alignment: 2

```

STM 06-01900      1  gggtttgaagcgcttaccacctataagtggatcggttttggcgatggtagcattcgtgcgtaattaatga
STM LT2           19  gggtttgaagcgcttaccacctataagtggatcggttttggcgatggtagcattcgtgcgtaattaatga

STM 06-01900      71  cgagcgggtgcaaaaaatagccggttgagtagcaaggctattgacgcaccgcccgggttagttttaaccttc
STM LT2           89  cgagcgggtgc-aaaaatagccggttgagtagcaaggctattgacgcaccgcccgggttagttttaaccttc
                                thrWtRNA-Locus
STM 06-01900      141  taccctcgtagttcaccgcggtgaacacacccttctcaggggccgatatagtcagttggtagagcagcgca
STM LT2           158  taccctcgtagttcaccgcggtgaacacacccttctcaggggccgatatagtcagttggtagagcagcgca
                                direct repeat
STM 06-01900      211  ttctgaatgcgaagggtcgtaggttcgactcctattatcggcaccattcaaacatctcccaagtctacta
STM LT2           228  ttctgaatgcgaagggtcgtaggttcgac-----

STM 06-01900      281  aagtctttcaaaaccccttataatccgcgtattaaagcccggttcgtcttttgacgtctactaaagtccc
STM LT2           -----

STM 06-01900      351  tcaaaatctacgggtcagatgggggtacttatgggggtatttgcgttcgggttagtgagggtaccccaa
STM LT2           -----

STM 06-01900: nt 421 bis nt 18410 nicht dargestellt

STM 06-01900      18411  cgaggttatccggttcaaagtagctaagtatctcttttttgcgactggctattctcatggtggtgatt
STM LT2           -----

STM 06-01900      18481  ccttattgtgggatagcactatcatacaataagtgggttaaaggagagcggtaccgcctgatatgctgt
STM LT2           -----

STM 06-01900      18551  atgaataacaaccaaatttcaggggcggaagaaagatatgggggtacttttgggggtatctataaaaaat
STM LT2           -----

STM 06-01900      18621  gaacaataaaaaaaggcaacaaaaacaaagattatcgctatgtgtattgttccctattatc-gcaccat
STM LT2           256  -----tccctattatcggcaccat
                                direct repeat
STM 06-01900      18690  cttaatcaatcacttatgtacaacctcatttctcaaaaacaccattttttg-----ctctcgg
STM LT2           274  cttaatcaatcacttatgtacaacctcatttctcaaaaacaccattttttgctctcgggtacactctcgg

STM 06-01900      18740  gtacacaactagcaaaacataagcagtatccacctaaccctaaagatgatttctgtttaccatgcgcca
STM LT2           344  gtacacaactagcaaaacataagcagtatccacctaaccctaaagatgatttctgtttaccatgcgcca

STM 06-01900      18818  tgagttggcctaccatttgataggctgaatacgtattggaagattctacattccatcatgttaatgatt
STM LT2           414  tgagttggcctaccatttgataggctgaatacgtattggaagattctacattccatcatgttaatgatt

STM 06-01900      18888  ccgtctcagagctatgtactctgacccacgtaatatgggcacaaacctaaagcgaggttctggttt
STM LT2           484  ccgtctcagagctatgtactctgacccacgtaatatgggcacaaacctaaagcgaggttctggttt
                                STM0325
STM 06-01900      18958  tcaaatgttccggactgagaccgccacaggcactgtgacgacgtaccgattgtaatacactcactat
STM LT2           554  tcaaatgttccggactgagaccgccacaggcactgtgacgacgtaccgattgtaatacactcactat

STM 06-01900      19028  aattaacactgctgtccgcattatttccgggtgacaaagtccctctccgtggatacattcc
STM LT2           624  aattaacactgctgtccgcattatttccgggtgacaaagtccctctccgtggatacattcc

```

Abbildung A.3: Alignment der flankierenden Regionen der Insel mit dem STM LT2 Genom

Die Nukleotide 421 bis 18410 der 18.4 kb Insel sind nicht dargestellt, da es für sie keine Entsprechung im LT2-Genom gibt.



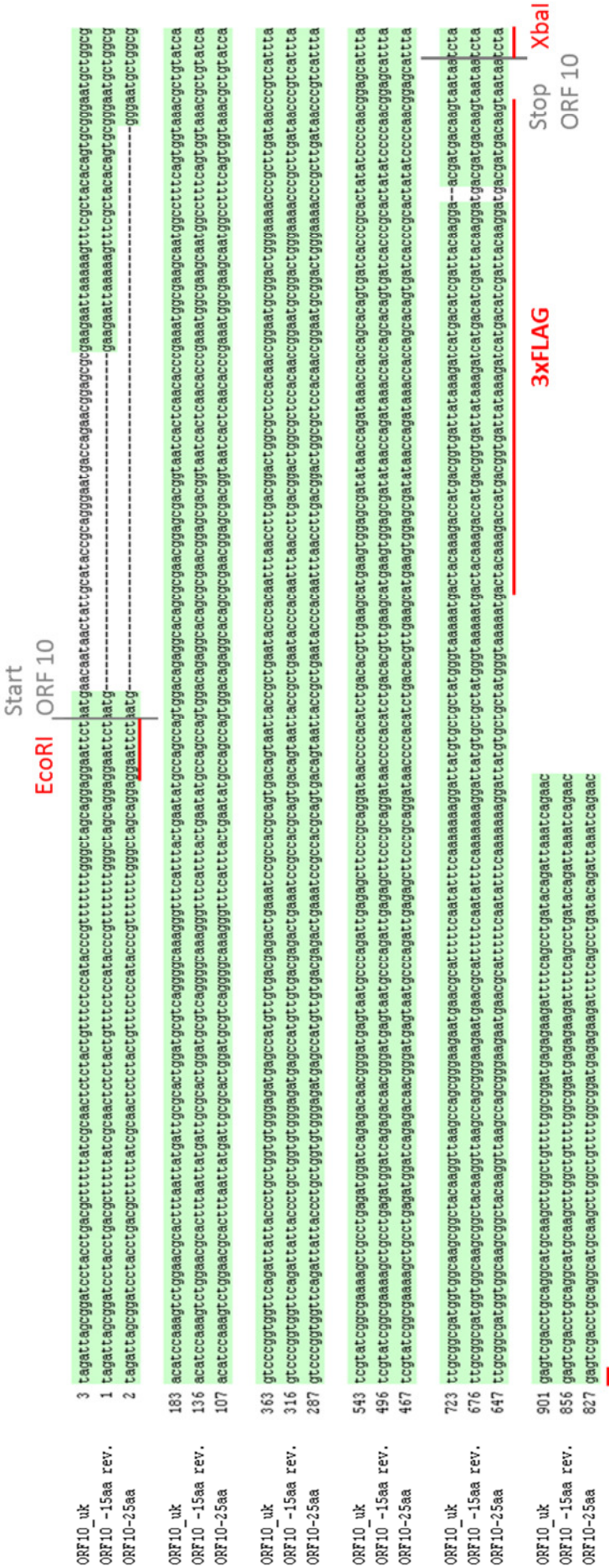


Abbildung A.4: Sequenz-Vergleich der N-terminal verkürzten ORF 10-Konstrukte

## Abkürzungsverzeichnis

|             |   |
|-------------|---|
| Abb.        | Abbildung   |
| AK          | Antikörper  |
| Ap          | Ampicillin  |
| APS         | Ammoniumperoxodisulfat  |
| A. bidest   | zweifach destilliertes Wasser ( <i>aqua bidestillata</i> )                            |
| AS          | Aminosäure ( <i>amino acid</i> )  |
| ATP         | Adenosin-5'-triphosphat   |
| ATPase      | Adenosintriphosphatase  |
| $\beta$ -ME | $\beta$ -Mercaptoethanol  |
| bp          | Basenpaar(e)  |
| °C          | Grad Celsius  |
| ca.         | circa   |
| Carb        | Carbenicillin   |
| cfu         | Koloniebildende Einheiten ( <i>colony forming units</i> )                             |
| Cm          | Chloramphenicol   |
| DEPC        | Diethylpyrocarbonat   |
| DMEM        | Dulbecco's MEM  |
| DMSO        | Dimethylsulfoxid  |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP        | 2'-Desoxiribonukleosid-5'-triphosphat   |
| DTT         | Dithiotreitol   |
| E.          | Escherichia   |
| ECL         | Enhanced Chemiluminescence  |
| EDTA        | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| et al.      | und andere ( <i>et alii</i> )   |
| etc.        | und so weiter ( <i>et cetera</i> )  |
| g           | Erdbeschleunigung / Gramm   |
| GI          | Genomic Island  |
| h           | Stunde(n)   |
| HGT         | horizontaler Gentransfer  |
| HPLC        | Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>High-performance liquid chromatography</i> ) |



|          |  |
|----------|--|
| HRP      | Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )                      |
| ICE      | Integratives konjugatives Element ( <i>integrative conjugative element</i> ) |
| Ig       | Immunglobulin  |
| IM       | Innere Membran   |
| i. d. R. | in der Regel   |
| Km       | Kanamycin  |
| kb       | Kilobasenpaare   |
| kDa      | Kilodalton   |
| L        | Liter  |
| LB       | Luria Bertani  |
| LPS      | Lipopolysaccharid(e)   |
| LT       | Lysotyp  |
| M        | Molar  |
| mA       | Milliampere  |
| MDR      | Mehrfachresistenz ( <i>multidrug resistance</i> )                            |
| MEM      | Minimal Essential Medium   |
| µg       | Mikrogramm   |
| mg       | Milligramm   |
| MGE      | mobiles genetisches Element  |
| MHK      | Minimale Hemmkonzentration   |
| min.     | Minute(n)  |
| µl       | Mikroliter   |
| ml       | Milliliter   |
| MLST     | Multilokus-Sequenztypisierung  |
| mM       | Millimolar   |
| MOI      | Multiplicity of Infection  |
| mRNA     | Messenger RNA  |
| NaCl     | Natriumchlorid   |
| ng       | Nanogramm  |
| nm       | Nanometer  |
| NRZ      | Nationales Referenzzentrum   |
| nt       | Nukleotid  |
| OD       | Optische Dichte  |

|          |  |
|----------|--|
| OM       | Äußere Membran ( <i>outer membrane</i> )                               |
| ORF      | Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )                       |
| PAGE     | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PBS      | Phosphate Buffered Saline  |
| PCR      | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase-chain-reaction</i> )          |
| PFGE     | <u>P</u> uls <u>f</u> eld <u>g</u> ele <u>l</u> ektrophorese           |
| pg       | Picogramm  |
| pH       | lat. <i>potentium hydrogenii</i>                                       |
| pmol     | Picomol  |
| PMSF     | Phenylmethylsulfonylfluorid  |
| PVDF     | Polyvinylidendifluorid   |
| RNA      | Ribonukleinsäure   |
| rpm      | Rotationen pro Minute  |
| RT       | Raumtemperatur / Reverse Transkription                                 |
| s        | Sekunde(n)   |
| s.       | siehe  |
| S.       | Salmonella / Seite   |
| SCV      | Salmonella containing vacuole  |
| SDS      | Sodiumdodecylsulfat  |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                    |
| SGI      | Salmonella Genomic Island  |
| Sh.      | Shigella   |
| SOC      | <u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression |
| sog.     | sogenannt (-e, -er)  |
| SPI      | Salmonella Pathogenicity Island  |
| ST       | Sequenztyp   |
| STM      | Salmonella Typhimurium   |
| s. u.    | siehe unten  |
| sv.      | Serovar  |
| Tab.     | Tabelle  |
| TBE      | Tris-Borat-EDTA  |
| TBS      | Tris Buffered Saline   |
| TCA      | Trichloracetat   |

|       |  |
|-------|--|
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin             |
| Tet   | Tetracyclin                                    |
| TLR   | Toll-like receptor                             |
| tRNA  | Transfer-RNA                                   |
| Tris  | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan               |
| T3SS  | Typ-III-Sekretionssystem                       |
| T4SS  | Typ-IV-Sekretionssystem                        |
| T6SS  | Typ-VI-Sekretionssystem                        |
| usw.  | und so weiter                                  |
| u. U. | unter Umständen                                |
| V     | Volt   |
| v. a. | vor allem                                      |
| Wt    | Wildtyp  |
| w/v   | Masse pro Volumen ( <i>weight per volume</i> ) |
| w/w   | Masse pro Masse ( <i>weight per weight</i> )   |
| z. B. | zum Beispiel                                   |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1.1: <i>Salmonella</i> -Klassifizierung.....  | 2  |
| Abbildung 1.2: Die wichtigsten Ereignisse in der Evolution der Gattung <i>Salmonella</i> .....        | 3  |
| Abbildung 1.3: Wechselwirkungen von <i>Salmonella</i> mit Zelltypen des Dünndarmepithels .....        | 8  |
| Abbildung 1.4: Horizontaler Gentransfer zwischen Bakterienzellen .....                                | 9  |
| Abbildung 1.5: Unterteilung genomischer Inseln nach funktionellen Gesichtspunkten .....               | 10 |
| Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines Typ3-Nadelkomplexes.....                                | 12 |
| Abbildung 1.7: Virulenzfaktoren im Infektionszyklus von <i>Salmonella enterica</i> .....              | 13 |
| Abbildung 1.8: Prinzipieller Aufbau eines Bakteriophagen [89] .....                                   | 18 |
| Abbildung 1.9: Stadien der Bakteriophageninfektion .....  | 19 |
| Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des Phasenwechsels in <i>S. enterica</i> .....               | 23 |
| Abbildung 2.1: One-Step-Deletion nach Datsenko & Wanner [138].....                                    | 48 |
| Abbildung 2.2: Transduktanten mit lytischen (links) bzw. lysogenen (rechts) Phagen.....               | 50 |
| Abbildung 2.3: Sequenz des 3xFLAG-getaggten ORF 10 zur Klonierung .....                               | 51 |
| Abbildung 2.4: Vektorkarte des Expressionsvektors pBAD24.....   | 52 |
| Abbildung 2.5: Eingefügte <i>cat</i> -Kassette am 3'-Ende der 18.4 kb Insel .....                     | 54 |
| Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des ringförmigen Zwischenproduktes.....                       | 55 |
| Abbildung 3.1: Humane <i>S. Typhimurium</i> -Isolate seit 2004 (NRZ).....                             | 66 |
| Abbildung 3.2: Lysotypverteilung in <i>S. Typhimurium</i> -Isolaten vom Menschen .....                | 67 |
| Abbildung 3.3: Nachweis der STM-spezifischen Insertion eines IS200-Elements.....                      | 69 |
| Abbildung 3.4: tRNA-Regionen auf dem <i>S. Typhimurium</i> LT2-Chromosom .....                        | 74 |
| Abbildung 3.5: Nachweis eines ca. 20 kb Produktes im monophasischen Teststamm.....                    | 75 |
| Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der 5-Primer Multiplex PCR und ihrer möglichen Produkte ..... | 76 |
| Abbildung 3.7: Agarose-Gel zur Verdeutlichung der drei möglichen <i>thrW</i> -Zustände .....          | 76 |
| Abbildung 3.8: G+C-Gehalt der 18.4 kb Insel und ihrer flankierenden Regionen .....                    | 79 |
| Abbildung 3.9: Ähnlichkeit des ORF 6a-Produktes mit Teilen einer Typ IV-ATPase.....                   | 80 |
| Abbildung 3.10: Darstellung putativer transmembraner $\alpha$ -Helices.....                           | 83 |
| Abbildung 3.11: Vorhergesagte $\beta$ -Faltblattstrukturen für die Leserahmen 11, 12 und 13 .....     | 84 |
| Abbildung 3.12: Gemeinsames $\beta$ -Strang-Motiv putativer Chaperon-Bindedomänen .....               | 87 |
| Abbildung 3.13: Single-ORF-PCR.....   | 90 |
| Abbildung 3.14: Reverse Transkriptase-PCR .....   | 91 |
| Abbildung 3.15: RT-PCR zum Nachweis übergreifender Transkripte .....                                  | 92 |

|  |       |
|--|-------|
| Abbildung 3.16: Vergleichende Lysotypie 1 .....  | 93    |
| Abbildung 3.17: Vergleichende Lysotypie 2 .....  | 94    |
| Abbildung 3.18: RAW264.7 Makrophagen-Infektion (MOI 2).....                                  | 95    |
| Abbildung 3.19: MDCK Epithelzell-Infektion (MOI 2).....                                      | 95    |
| Abbildung 3.20: Maus-Infektionsversuch.....  | 96    |
| Abbildung 3.21: Agarosegele zum Nachweis zirkulären Zwischenproduktes der Insel .....        | 97    |
| Abbildung 3.22: Links Insel- und rechts <i>fljB</i> -PCR potenzieller Transkonjuganten ..... | 99    |
| Abbildung 3.23: a) Transformations- und b) Transkriptionskontrolle .....                     | 101   |
| Abbildung 3.24: Western Blot (a) ORF 8::FLAG (ca. 60 kDa) und (b) ORF 10::HA (ca. 30 kDa)    | 102   |
| Abbildung 3.25: Western Blot $\alpha$ DnaK (ca. 70 kDa).....                                 | 103   |
| Abbildung 3.26: Western Blot ORF 10::HA (Sekretionsmutanten) .....                           | 104   |
| Abbildung 3.27: Western Blot ORF 10::3xFLAG, N-terminal verkürzt in 08-05217 WT .....        | 105   |
| Abbildung 3.28: Western Blot ORF 10::3xFLAG trunkiert in Typ III- und Typ VI-Mutanten....    | 106   |
| Abbildung A.1: Sequenzhomologien der Insel zu anderen <i>Enterobacteriaceae</i> .....        | xvi   |
| Abbildung A.2: Putative Operonstrukturen und Promotoren.....                                 | xvii  |
| Abbildung A.3: Alignment der flankierenden Regionen der Insel mit dem STM LT2 Genom. ....    | xviii |
| Abbildung A.4: Sequenz-Vergleich der N-terminal verkürzten ORF 10-Konstrukte.....            | xix   |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 2.1: Geräte .....   | 28 |
| Tabelle 2.2: Software.....  | 29 |
| Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien .....  | 32 |
| Tabelle 2.4: Chemikalien .....  | 34 |
| Tabelle 2.5: Antibiotika und Zusätze .....  | 36 |
| Tabelle 2.6: Bakterienstämme.....   | 37 |
| Tabelle 2.7: Relevante Insel-Mutanten .....   | 38 |
| Tabelle 2.8: Plasmide und Vektoren.....   | 40 |
| Tabelle 2.9: Zusammensetzung von SDS-Gelen .....  | 62 |
| Tabelle 2.10: Primär- und Sekundärantikörper.....   | 64 |
| Tabelle 3.1: Prophagen in monophasischen STM verschiedener Länder .....                             | 68 |
| Tabelle 3.2: Nachweis der ASSuT-vermittelnden Resistenzgene .....                                   | 71 |
| Tabelle 3.3: Deletionen im <i>fljAB</i> -Operon in 4,[5],12:i:- Isolaten verschiedener Staaten..... | 72 |
| Tabelle 3.4: Vorkommen der Insel in monophasischen STM verschiedener Lysotypen.....                 | 77 |
| Tabelle 3.5: Vorkommen der Insel in biphasischen STM verschiedener Lysotypen .....                  | 78 |
| Tabelle 3.6: Protein-BLAST-Ergebnisse für die einzelnen Leserahmen der 18.4 kb Insel .....          | 81 |
| Tabelle 3.7: Vorhersage der subzellularen Lokalisation der einzelnen ORF-Produkte .....             | 85 |
| Tabelle 3.8: Isolate mit unvollständiger 18.4 kb Insel nach Single-ORF-PCR .....                    | 88 |
| Tabelle 3.9: Bestätigung der vorhergesagten Operons der Insel mittels RT-PCR .....                  | 92 |
| Tabelle 3.10: Unterscheidungsmerkmale von Donoren, Rezipient und Transkonjuganten. ....             | 99 |
| Tabelle A.1: Primer und Oligonukleotide .....   | xv |

## Referenzen

1. Mochmann H, Köhler, W. *Meilensteine der Bakteriologie: Von Entdeckungen und Entdeckern aus den Gründerjahren der Medizinischen Mikrobiologie* (Minerva - Edition Wissen, Frankfurt / M., 1997).
2. Salmonella WCCfRaRo, Institut Pasteur rdDR, 75724 Paris Cedex 15, France. ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS. Patrick A.D. Grimont, F-XW (Ed.^(Eds) (2007)
3. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in microbiology*, 161(1), 26-29 (2010).
4. Baumler AJ. The record of horizontal gene transfer in Salmonella. *Trends Microbiol*, 5(8), 318-322 (1997).
5. McQuiston JR, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM, Jr. Do Salmonella carry spare tyres? *Trends Microbiol*, 16(4), 142-148 (2008).
6. Tschäpe H, · J.Bockemühl, J. Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, (45), 491-496 (2002).
7. Romling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S. Multicellular and aggregative behaviour of Salmonella typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Mol Microbiol*, 28(2), 249-264 (1998).
8. Romling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschape H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in Salmonella serovars important in human disease. *Int J Med Microbiol*, 293(4), 273-285 (2003).
9. Oliver JD, Dagher M, Linden K. Induction of Escherichia coli and Salmonella typhimurium into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *Journal of water and health*, 3(3), 249-257 (2005).
10. Lehmacher A, Bockemuhl J, Aleksic S. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and infection*, 115(3), 501-511 (1995).
11. Rabsch W, Prager R, Koch J *et al.* Molecular epidemiology of Salmonella enterica serovar Agona: characterization of a diffuse outbreak caused by aniseed-fennel-caraway infusion. *Epidemiology and infection*, 133(5), 837-844 (2005).
12. Werber D, Dreesman J, Feil F *et al.* International outbreak of Salmonella Oranienburg due to German chocolate. *BMC infectious diseases*, 5, 7 (2005).
13. Sheth AN, Hoekstra M, Patel N *et al.* A national outbreak of Salmonella serotype Tennessee infections from contaminated peanut butter: a new food vehicle for salmonellosis in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(4), 356-362 (2011).
14. Puohiniemi R, Heiskanen T, Siitonen A. Molecular epidemiology of two international sprout-borne Salmonella outbreaks. *J Clin Microbiol*, 35(10), 2487-2491 (1997).
15. Jain S, Bidol SA, Austin JL *et al.* Multistate outbreak of Salmonella Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice--United States, 2005. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(8), 1065-1071 (2009).
16. Loos N, Wassenaar, TM. Pathogenitätsfaktoren von enteritischen Salmonellen. *Immun Infekt*, 22(1), 14-19 (1994 ).

17. Foster JW. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Critical reviews in microbiology*, 21(4), 215-237 (1995).
18. Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol*, 36(5), 997-1005 (2000).
19. Adam D, Doerr, W., Link, H., Lode, H. *Die Infektiologie* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2004).
20. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Reviews of infectious diseases*, 10(5), 958-979 (1988).
21. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun*, 70(5), 2640-2649 (2002).
22. Crawford RW, Rosales-Reyes R, Ramirez-Aguilar Mde L, Chapa-Azuola O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4353-4358 (2010).
23. Hase K, Kawano K, Nochi T *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 462(7270), 226-230 (2009).
24. Ohno H, Hase K. Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut microbes*, 1(6), 407-410 (2010).
25. Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol*, 4(1), 22-29 (1996).
26. Monack DM, Hersh D, Ghorri N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), 249-258 (2000).
27. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ *et al.* Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401(6755), 804-808 (1999).
28. Vazquez-Torres A, Fang FC. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr Opin Microbiol*, 3(1), 54-59 (2000).
29. Niess JH, Brand S, Gu X *et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307(5707), 254-258 (2005).
30. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*, 4(12), 953-964 (2004).
31. Frost Laura S. LR, Summers Anne O. and Toussaint Ariane. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, (3), 722-732 (2005).
32. Dionisio F, Matic I, Radman M, Rodrigues OR, Taddei F. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics*, 162(4), 1525-1532 (2002).
33. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol*, 64(5), 679-699 (1952).
34. Lederberg J, Cavalli LL, Lederberg EM. Sex Compatibility in *Escherichia Coli*. *Genetics*, 37(6), 720-730 (1952).
35. Dobrindt U, Zdziarski J, Salvador E, Hacker J. Bacterial genome plasticity and its impact on adaptation during persistent infection. *Int J Med Microbiol*, 300(6), 363-366 (2010).
36. Hacker J, Bender L, Ott M *et al.* Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microbial pathogenesis*, 8(3), 213-225 (1990).



37. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 14-56 (2004).
38. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*, 23(6), 1089-1097 (1997).
39. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294(2-3), 95-102 (2004).
40. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 376-393 (2009).
41. Schneider G, Dobrindt U, Middendorf B *et al.* Mobilisation and remobilisation of a large archetypal pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* in vitro support the role of conjugation for horizontal transfer of genomic islands. *BMC microbiology*, 11, 210 (2011).
42. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckaert A. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol*, 55(6), 1911-1924 (2005).
43. Waldor MK. Mobilizable genomic islands: going mobile with oriT mimicry. *Mol Microbiol*, 78(3), 537-540 (2010).
44. Wisner AD, Taseen; White, Aaron; Potter, Andrew; Köster, Wolfgang. The *Salmonella* Pathogenicity Island-1 and -2 Encoded Type III Secretion Systems. In: *Salmonella - A Diversified Superbug*. Kumar, Y (Ed. ( InTech, 2012) 576.
45. Fookes M, Schroeder GN, Langridge GC *et al.* *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002191 (2011).
46. Gerlach RG HM. *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, 120(7-8), 317-327 (2007).
47. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(2), 379-433 (1998).
48. Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444(7119), 567-573 (2006).
49. Galan JE. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annual review of cell and developmental biology*, 17, 53-86 (2001).
50. Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol*, 11(11), 1579-1586 (2009).
51. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol*, 15(4), 749-759 (1995).
52. Mirol S, Ehrbar K, Weissmuller A *et al.* *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(7), 2348-2358 (2001).
53. Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol*, 22(4), 703-714 (1996).

54. Schlumberger MC, Hardt WD. Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol*, 9(1), 46-54 (2006).
55. Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Shears SB, Galan JE. A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol*, 39(2), 248-259 (2001).
56. Friebe A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, Hardt WD. SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *The Journal of biological chemistry*, 276(36), 34035-34040 (2001).
57. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and cell biology*, 85(2), 112-118 (2007).
58. McGhie EJ, Hayward RD, Koronakis V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive Salmonella: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *The EMBO journal*, 20(9), 2131-2139 (2001).
59. Fu Y, Galan JE. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 401(6750), 293-297 (1999).
60. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6), 2593-2597 (1996).
61. Winter SE, Baumler AJ. A breathtaking feat: to compete with the gut microbiota, Salmonella drives its host to provide a respiratory electron acceptor. *Gut microbes*, 2(1), 58-60 (2011).
62. Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of Salmonella pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, 31(2), 489-498 (1999).
63. Abrahams GL, Hensel M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular Salmonella enterica and its host cells. *Cell Microbiol*, 8(5), 728-737 (2006).
64. Lober S, Jackel D, Kaiser N, Hensel M. Regulation of Salmonella pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol*, 296(7), 435-447 (2006).
65. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J *et al.* Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*, 287(5458), 1655-1658 (2000).
66. Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M. Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. *The Journal of experimental medicine*, 195(9), 1155-1166 (2002).
67. Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD, Groisman EA. A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. *The EMBO journal*, 18(14), 3924-3933 (1999).
68. Drecktrah D, Knodler LA, Howe D, Steele-Mortimer O. Salmonella trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic*, 8(3), 212-225 (2007).
69. Steele-Mortimer O. The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol*, 11(1), 38-45 (2008).

70. Guignot J, Caron E, Beuzon C *et al.* Microtubule motors control membrane dynamics of Salmonella-containing vacuoles. *Journal of cell science*, 117(Pt 7), 1033-1045 (2004).
71. Kuhle V, Abrahams GL, Hensel M. Intracellular Salmonella enterica redirect exocytic transport processes in a Salmonella pathogenicity island 2-dependent manner. *Traffic*, 7(6), 716-730 (2006).
72. Kuhle V, Jackel D, Hensel M. Effector proteins encoded by Salmonella pathogenicity island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host cells. *Traffic*, 5(5), 356-370 (2004).
73. Brawn LC, Hayward RD, Koronakis V. Salmonella SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe*, 1(1), 63-75 (2007).
74. Deiwick J, Nikolaus T, Shea JE, Gleeson C, Holden DW, Hensel M. Mutations in Salmonella pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *J Bacteriol*, 180(18), 4775-4780 (1998).
75. Gerlach RG, Claudio N, Rohde M, Jackel D, Wagner C, Hensel M. Cooperation of Salmonella pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol*, 10(11), 2364-2376 (2008).
76. Blondel CJ, Jimenez JC, Contreras I, Santiviago CA. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes. *BMC genomics*, 10, 354 (2009).
77. Folkesson A, Lofdahl S, Normark S. The Salmonella enterica subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in microbiology*, 153(8), 537-545 (2002).
78. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(39), 15508-15513 (2007).
79. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA *et al.* Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4154-4159 (2009).
80. Mulder DT, Cooper CA, Coombes BK. Type VI secretion system-associated gene clusters contribute to pathogenesis of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 80(6), 1996-2007 (2012).
81. Parsons DA, Heffron F. *sciS*, an *icmF* homolog in Salmonella enterica serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun*, 73(7), 4338-4345 (2005).
82. Jani AJ CP. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe*, 8(1), 2-6 (2010).
83. Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475(7356), 343-347 (2011).
84. Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett*, 224(1), 1-15 (2003).
85. Fronzes R, Christie PJ, Waksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 7(10), 703-714 (2009).

86. Juhas M, Crook DW, Hood DW. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol*, 10(12), 2377-2386 (2008).
87. Juhas M, Crook DW, Dimopoulou ID *et al*. Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J Bacteriol*, 189(3), 761-771 (2007).
88. Seth-Smith HM, Fookes MC, Okoro CK *et al*. Structure, diversity, and mobility of the Salmonella pathogenicity island 7 family of integrative and conjugative elements within Enterobacteriaceae. *J Bacteriol*, 194(6), 1494-1504 (2012).
89. [upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1b/Bacteriophage\\_structure.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1b/Bacteriophage_structure.png). (Ed.^(Eds)
90. Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol*, 4(5), 395-404 (2006).
91. Bossi L, Figuerora-Bossi, N. Prophage arsenal of Salmonella enterica serovar Typhimurium. In: *Phages. Their role in Pathogenesis and biotechnology*. Adhya, MKWDIFSL (Ed. (Academic Press Washington 2005) 165-186.
92. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella. *Mol Microbiol*, 39(2), 260-271 (2001).
93. Thomson N, Baker S, Pickard D *et al*. The role of prophage-like elements in the diversity of Salmonella enterica serovars. *Journal of molecular biology*, 339(2), 279-300 (2004).
94. Perkins TT, Kingsley RA, Fookes MC *et al*. A strand-specific RNA-Seq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus Salmonella typhi. *PLoS genetics*, 5(7), e1000569 (2009).
95. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(3), 560-602, table of contents (2004).
96. Middendorf B, Hochhut B, Leipold K, Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hacker J. Instability of pathogenicity islands in uropathogenic Escherichia coli 536. *J Bacteriol*, 186(10), 3086-3096 (2004).
97. Darlington OF, Levine M. Superinfection exclusion by P22 prophage and the replication complex. *Journal of virology*, 8(3), 347-348 (1971).
98. Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 4(5), 550-557 (2001).
99. Hardt WD, Urlaub H, Galan JE. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of Salmonella typhimurium is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(5), 2574-2579 (1998).
100. Miao EA, Miller SI. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13), 7539-7544 (2000).
101. Haraga A, Miller SI. A Salmonella enterica serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun*, 71(7), 4052-4058 (2003).
102. Fang FC, DeGroote MA, Foster JW *et al*. Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13), 7502-7507 (1999).

103. Osborn AM BD. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid*, 48(3), 202-212 (2002).
104. Roberts AP, Chandler M, Courvalin P *et al.* Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*, 60(3), 167-173 (2008).
105. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 43(1), 1-4 (1999).
106. Burrus V, Waldor MK. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in microbiology*, 155(5), 376-386 (2004).
107. Lee CA, Babic A, Grossman AD. Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Mol Microbiol*, 75(2), 268-279 (2010).
108. Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol*, 8(8), 552-563 (2010).
109. Hentschel U, Hacker J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect*, 3(7), 545-548 (2001).
110. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2(5), 414-424 (2004).
111. Hauser E, Junker E, Helmuth R, Malorny B. Different mutations in the oafA gene lead to loss of O5-antigen expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of applied microbiology*, 110(1), 248-253 (2011).
112. Aldridge PD WC, Gnerer J, Karlinsey JE, Hughes KT, Sachs MS. Regulatory protein that inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in Salmonella enterica. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(30), 11340-11345 (2006).
113. Anonymus. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. In: *SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC*. Authority, EFS (Ed.^(Eds) (EFSA Journal, 2012) 2597.
114. Robert Koch-Institut: SurvStat hwrds, Datenstand: 01.03.2012. <http://www3.rki.de/SurvStat>. (Ed.^(Eds)
115. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of animal science*, 86(14 Suppl), E149-162 (2008).
116. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of animal science*, 86(14 Suppl), E173-187 (2008).
117. <http://www.p-e-g.org/econtext/germap>. Antibiotika- und Resistenzatlas für Deutschland GERMAP. (Ed.^(Eds) (2010)
118. Silverman M, Zieg J, Hilmen M, Simon M. Phase variation in Salmonella: genetic analysis of a recombinational switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(1), 391-395 (1979).
119. Hauser E, Huhn, S., Junker, E., Jaber, M., Schroeter, A., Helmuth, R., Rabsch, W., Winterhoff, N., Malorny, B. Characterisation of a phenotypic monophasic variant belonging to Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium from wild birds and its possible transmission to cats and humans. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 122(5-6), 169-177 (2009).

120. Hauser E, Tietze E, Helmuth R *et al.* Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4601-4610 (2010).
121. Mossong J, Marques P, Ragimbeau C *et al.* Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 12(6), E11-12 (2007).
122. Dionisi AM, Graziani, C., Lucarelli, C., Filetici, E., Villa, L., Owczarek, S., Caprioli, A., Luzzi, I. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and Monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog Dis*, 6(6), 711-717 (2009).
123. Lucarelli C, Dionisi AM, Torpdahl M *et al.* Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol*, 48(6), 2103-2109 (2010).
124. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B *et al.* Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(22), 19580 (2010).
125. Bone A, Noel H, Le Hello S *et al.* Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(24) (2010).
126. Arnold R, Brandmaier S, Kleine F *et al.* Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathog*, 5(4), e1000376 (2009).
127. Lower M, Schneider G. Prediction of type III secretion signals in genomes of gram-negative bacteria. *PloS one*, 4(6), e5917 (2009).
128. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410 (1990).
129. Bagos PG, Liakopoulos TD, Spyropoulos IC, Hamodrakas SJ. PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue), W400-404 (2004).
130. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785-786 (2011).
131. [softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb](http://softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb). BPROM. (Ed.^(Eds)
132. [www.softberry.com](http://www.softberry.com). FgenesB. (Ed.^(Eds)
133. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14(4), 378-379 (1998).
134. Imai K, Asakawa N, Tsuji T *et al.* SOSUI-GramN: high performance prediction for sub-cellular localization of proteins in gram-negative bacteria. *Bioinformation*, 2(9), 417-421 (2008).
135. Bullas LR, Ryu JI. *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J Bacteriol*, 156(1), 471-474 (1983).

136. Stocker BA, Males BM, Takano W. Salmonella typhimurium mutants of RfaH-phenotype: genetics and antibiotic sensitivities. *Journal of general microbiology*, 116(1), 17-24 (1980).
137. Tsai SP, Hartin RJ, Ryu J. Transformation in restriction-deficient Salmonella typhimurium LT2. *Journal of general microbiology*, 135(9), 2561-2567 (1989).
138. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6640-6645 (2000).
139. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177(14), 4121-4130 (1995).
140. Rabsch W. Salmonella typhimurium phage typing for pathogens. *Methods Mol Biol*, 394, 177-211 (2007).
141. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3140-3145 (1998).
142. <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>. (Ed.^(Eds)
143. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467 (1977).
144. Masters M. Generalized transduction. In: *Genetics of Bacteria*. J. Scaife, DL, A. Galizzi (Ed. (Academic Press, New York, 1985) 197-205.
145. Margolin P. Generalized Transduction. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987)
146. Schmieger H. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular & general genetics : MGG*, 119(1), 75-88 (1972).
147. Ferguson GC, Heinemann JA, Kennedy MA. Gene transfer between Salmonella enterica serovar Typhimurium inside epithelial cells. *J Bacteriol*, 184(8), 2235-2242 (2002).
148. Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Comparison of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun*, 73(6), 3228-3241 (2005).
149. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685 (1970).
150. Hauser E. Gefahrenidentifizierung der im Schwein epidemiologisch bedeutenden Salmonella enterica subsp. enterica Serovare 4,[5],12:i:- und Derby. In: *Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)*. (Ed.^(Eds) (Freie Universität Berlin, 2011) 126.
151. Burnens AP, Stanley J, Sack R, Hunziker P, Brodard I, Nicolet J. The flagellin N-methylase gene fliB and an adjacent serovar-specific IS200 element in Salmonella typhimurium. *Microbiology*, 143 ( Pt 5), 1539-1547 (1997).
152. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, fljB-negative Salmonella enterica subsp. enterica strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol*, 39(8), 2981-2983 (2001).
153. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A *et al.* Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of

- Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol*, 183(19), 5725-5732 (2001).
154. Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of Salmonella genomic island 1. *Microbes Infect*, 8(7), 1915-1922 (2006).
  155. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A *et al.* DNA microarray-based typing of an atypical monophasic Salmonella enterica serovar. *J Clin Microbiol*, 40(6), 2074-2078 (2002).
  156. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA *et al.* Salmonella enterica serotype 4,5,12:i:-, an emerging Salmonella serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol*, 47(11), 3546-3556 (2009).
  157. Achtman M, Wain J, Weill FX *et al.* Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in Salmonella enterica. *PLoS Pathog*, 8(6), e1002776 (2012).
  158. Trupschuch S, Laverde Gomez JA, Ediberidze I, Flieger A, Rabsch W. Characterisation of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium 4,[5],12:i:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the thrW tRNA locus. *Int J Med Microbiol*, 300(5), 279-288 (2010).
  159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1251844>. (Ed.^(Eds)
  160. [http://www.genomicsplace.com/gc\\_calc.html](http://www.genomicsplace.com/gc_calc.html). G+C calculator. (Ed.^(Eds)
  161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>. ORF finder. (Ed.^(Eds)
  162. Schulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1565(2), 308-317 (2002).
  163. Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(4), 771-795 (2004).
  164. Lee SH, Galan JE. Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol*, 51(2), 483-495 (2004).
  165. Lilic M, Vujanac M, Stebbins CE. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Molecular cell*, 21(5), 653-664 (2006).
  166. Costa SC, Schmitz AM, Jahufar FF *et al.* A new means to identify type 3 secreted effectors: functionally interchangeable class IB chaperones recognize a conserved sequence. *mBio*, 3(1) (2012).
  167. (BIOHAZ) EPoBH. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "Salmonella Typhimurium-like" strains. *EFSA Journal*, 8(10), 48 (2010).
  168. Tennant SM, Diallo S, Levy H *et al.* Identification by PCR of non-typhoidal Salmonella enterica serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), e621 (2010).
  169. Echeita MA, Aladuena A, Cruchaga S, Usera MA. Emergence and spread of an atypical Salmonella enterica subsp. enterica serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol*, 37(10), 3425 (1999).
  170. Agasan A, Kornblum J, Williams G *et al.* Profile of Salmonella enterica subsp. enterica (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. *J Clin Microbiol*, 40(6), 1924-1929 (2002).
  171. Li J, Ochman H, Groisman EA *et al.* Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of Salmonella enterica. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7252-7256 (1995).
  172. Macnab RM. Flagella and motility. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. F. C. Neidhardt, RCI, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B.



- Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (Ed. (ASM Press, Washington, D.C., 1996) 123–145.
173. Feuillet V, Medjane S, Mondor I *et al.* Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(33), 12487-12492 (2006).
  174. Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesus J, Thomsen LE. The importance of motility and chemotaxis for extra-animal survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Dublin. *Journal of applied microbiology*, 113(3), 560-568 (2012).
  175. Stecher B, Barthel M, Schlumberger MC *et al.* Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol*, 10(5), 1166-1180 (2008).
  176. Lucarelli C, Dionisi AM, Filetici E, Owczarek S, Luzzi I, Villa L. Nucleotide sequence of the chromosomal region conferring multidrug resistance (R-type ASSuT) in *Salmonella Typhimurium* and monophasic *Salmonella Typhimurium* strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(1), 111-114 (2012).
  177. Busby B, Kristensen DM, Koonin EV. Contribution of phage-derived genomic islands to the virulence of facultative bacterial pathogens. *Environmental microbiology*, (2012).
  178. Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports*, 2(5), 376-381 (2001).
  179. Esposito D, Scocca JJ. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic acids research*, 25(18), 3605-3614 (1997).
  180. Sandt CH, Hopper JE, Hill CW. Activation of prophage eib genes for immunoglobulin-binding proteins by genes from the lbrAB genetic island of *Escherichia coli* ECOR-9. *J Bacteriol*, 184(13), 3640-3648 (2002).
  181. Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L. Bacteriophage crosstalk: coordination of prophage induction by trans-acting antirepressors. *PLoS genetics*, 7(6), e1002149 (2011).
  182. Christie GE, Calendar R. Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers. *Annual review of genetics*, 24, 465-490 (1990).
  183. Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *Journal of immunology*, 167(11), 6518-6524 (2001).
  184. Bocquet N, Prado de Carvalho L, Cartaud J *et al.* A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature*, 445(7123), 116-119 (2007).
  185. Israel V. E proteins of bacteriophage P22. I. Identification and ejection from wild-type and defective particles. *Journal of virology*, 23(1), 91-97 (1977).
  186. Perez GL, Huynh B, Slater M, Maloy S. Transport of phage P22 DNA across the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol*, 191(1), 135-140 (2009).
  187. Porter ME, Mitchell P, Free A, Smith DG, Gally DL. The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J Bacteriol*, 187(2), 458-472 (2005).
  188. Gerlach RG, Jackel D, Geymeier N, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect Immun*, 75(10), 4697-4709 (2007).

189. Holzer SU, Hensel M. Divergent roles of Salmonella pathogenicity island 2 and metabolic traits during interaction of *S. enterica* serovar typhimurium with host cells. *PloS one*, 7(3), e33220 (2012).
190. Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tummler B. Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol*, 186(2), 518-534 (2004).
191. Ubeda C, Barry P, Penades JR, Novick RP. A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(36), 14182-14188 (2007).
192. del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(2), 434-464 (1998).
193. Diaz-Lopez T, Lages-Gonzalo M, Serrano-Lopez A *et al.* Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *The Journal of biological chemistry*, 278(20), 18606-18616 (2003).
194. Briani F, Deho G, Forti F, Ghisotti D. The plasmid status of satellite bacteriophage P4. *Plasmid*, 45(1), 1-17 (2001).
195. Ziegelin G, Lanka E. Bacteriophage P4 DNA replication. *FEMS microbiology reviews*, 17(1-2), 99-107 (1995).
196. Campbell AM. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J Bacteriol*, 174(23), 7495-7499 (1992).
197. Stecher B, Denzler R, Maier L *et al.* Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(4), 1269-1274 (2012).
198. Stecher B, Robbiani R, Walker AW *et al.* *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(10), 2177-2189 (2007).
199. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852-856 (2001).
200. Brown DJ, Munro DS, Platt DJ. Recognition of the cryptic plasmid, pSLT, by restriction fingerprinting and a study of its incidence in Scottish *Salmonella* isolates. *The Journal of hygiene*, 97(2), 193-197 (1986).
201. Ahmer BM, Tran M, Heffron F. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol*, 181(4), 1364-1368 (1999).
202. Bellanger X, Morel C, Gonot F, Puymège A, Decaris B, Guedon G. Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. *Mol Microbiol*, 81(4), 912-925 (2011).
203. Daccord A, Ceccarelli D, Burrus V. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol Microbiol*, 78(3), 576-588 (2010).
204. Daccord A, Mursell M, Poulin-Laprade D, Burrus V. Dynamics of the SetCD-Regulated Integration and Excision of Genomic Islands Mobilized by Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 Family. *J Bacteriol*, 194(21), 5794-5802 (2012).
205. Boyd EF, Davis BM, Hochhut B. Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol*, 9(3), 137-144 (2001).

- 206. Juhas M, Power PM, Harding RM *et al.* Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands. *Genome biology*, 8(11), R237 (2007).
- 207. Kerrinnes T, Zelas ZB, Streckel W *et al.* CsrA and CsrB are required for the post-transcriptional control of the virulence-associated effector protein AvrA of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 299(5), 333-341 (2009).
- 208. Lim YH, Hirose K, Izumiya H *et al.* Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Japanese journal of infectious diseases*, 56(4), 151-155 (2003).
- 209. Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. *Research in microbiology*, 153(2), 107-113 (2002).

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Rabsch, der mir das spannende Thema zur Verfügung gestellt und diese Dissertation betreut hat. Sein Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit, sein ansteckender Optimismus und sein unerschöpflicher Quell an Ideen haben mich auch in schwierigen Phasen immer wieder motiviert.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei der Leiterin des Fachgebietes „Bakterielle Infektionen“, Frau Prof. Dr. Antje Flieger, für ihre Förderung und Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas, für die Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf Fachtagungen präsentieren zu dürfen sowie für die Übernahme der Mentorenschaft für diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert sowie Herrn Prof. Dr. André Fleißner gilt mein außerordentlicher Dank für ihre Bereitschaft, als Vertreter der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Braunschweig dieses Promotionsverfahren als Gutachter und Fachprüfer zu begleiten.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Witte möchte ich meinen Dank dafür aussprechen, dass er als Leiter der Außenstelle Wernigerode das Zustandekommen des Projektes und damit dieser Dissertation maßgeblich gefördert hat.

Den Wissenschaftlern und technischen Assistentinnen des FG 11 bzw. des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen möchte ich ebenfalls sehr herzlich für die mir in vielfältiger Weise zuteilgewordene Unterstützung danken. Besonders Susanne Kulbe, Dagmar Busse, Marita Wahnfried und Bettina Leiste danke ich sehr für das Ausstreichen und die Typisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Salmonella*-Isolate sowie für das herzliche Arbeitsklima und so manche Erheiterung des Laboralltags.

Allen derzeitigen und ehemaligen Doktoranden und Wissenschaftlern der Fachgebiete 11 und 13 sowie der Nachwuchs- und Projektgruppen danke ich für die anregenden Gespräche und fruchtbaren Diskussionen, für das sehr gute Arbeitsklima sowie die schönen Stunden in geselliger Runde außerhalb des Labors. Dies gilt ganz besonders für Dr. Roman Gerlach und Kathrin Blank, deren geduldige Auskunfts- und Hilfsbereitschaft ich sicher am häufigsten strapaziert habe sowie für Jenny Laverde Gomez, ohne deren exzellente Vorarbeiten das Projekt in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle auch die Mitarbeiter(innen) aus dem Verwaltungs- und IT-Bereich, insbesondere Erika Kleindienst, Axenia Treichel, Dorothea Eitze sowie Dr. Michael Voigt, die mir in organisatorischen Fragen und bei technischen Problemen stets unkompliziert und umfassend geholfen haben.

Bedanken möchte ich mich zudem bei allen deutschen und internationalen Kooperationspartnern für die freundliche und unbürokratische Überlassung monophasischer STM-Isolate, bei Dr. Robert Kingsley für die Teilsequenzierung unseres monophasischen Teststammes sowie bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Mark Achtman für die MLST-Analyse ausgewählter monophasischer *Salmonella*-Isolate. Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt und Manja Bartel Scherrer gilt mein herzlicher Dank für die Durchführung der Maus-Infektionsversuche.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mein Leben jenseits der Wissenschaft in vielfältiger Weise prägen und bereichern, mich animieren, über den Tellerrand zu schauen und die Dinge im Auge zu behalten, die wirklich wichtig sind.

Und schließlich: Danke René. Für die vorbehaltlose Liebe, für den Rückhalt, für die Motivation – für jeden gemeinsamen Tag.