

**Die Rolle des Aminosäure-
und Peptidmetabolismus für das intrazelluläre Wachstum von
Salmonella enterica Subsp. *enterica* Serovar Typhimurium.**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johannes Georg Finke

Berlin, 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. L. H. Wieler

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Mutzel

Disputation am: 15.11.2013

1. Danksagung

Ich danke meinen Betreuern
Herrn Prof. Dr. Wieler und Herrn Dr. Tedin
für die fachliche und interdisziplinäre Unterstützung sowie
die anregenden Diskussionen und Reflektionen meiner Arbeit.

Auch möchte ich meiner Frau Mariko, meiner gesamten Familie und meinen
Freunden/Kollegen
für die mir entgegen gebrachte Unterstützung
danken.

Für meine Kinder.

2. Inhaltsverzeichnis

1. Danksagung	3
2. Inhaltsverzeichnis	4
3. Einleitung	8
3.1 Das Pathogen <i>Salmonella</i>	8
3.1.1 <i>Salmonella enterica</i> Subsp. <i>enterica</i> Serovar Typhimurium	9
4. Stoffwechsel von <i>S. Typhimurium</i>	10
4.1 Biosynthese von Histidin	11
4.2 C1- Stoffwechsel: Biosynthese von Serin und Glycin	12
4.2.1 C1-Stoffwechsel: Biosyn. von Aspartat, Threonin & Methionin	14
4.3 Biosyn. verzweigtkettiger Aminosäuren Isoleucin, Leucin & Valin	17
4.4 Biosynthese von Cystein	19
4.5 Biosynthese von Chorismat und von <i>para</i> -Aminobenzoessäure	20
4.6 Biosyn. aromat. Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin & Tryptophan	23
4.7 Biosynthese von Prolin und Arginin	25
4.8 Aminosäure- und Peptidaufnahmesysteme	27
5. Intrazelluläre Nährstoffakquirierung	32
5.1 Nährstoffzugänge intrazellulärer Pathogene	32
5.2 Mögliche intrazelluläre Nährstoffzugänge für <i>Salmonella</i>	33
5.3 Virulenz und Biosyntheseleistung pathogener Bakterien	34
6. Relevante Wirtszell Aspekte	35
6.1 Wirtseigene Erkennung von <i>Salmonella</i>	35
6.2 Abwehrmechanismen des Wirts bzw. der Wirtszellen	36
6.3 Infektionsmechanismus (intestinale Epithelzellen)	38
6.4 Aufnahme-, Abbau- & Prozessierungsmechnismen der Wirtszelle	40
6.5 Orientierung wirtseigener membranständiger Transportsysteme	43
6.6 SCV-Interaktion mit dem endolysosomalen System	45
6.7 Autophagie und Lysosomen	46
7. Beobachtungen und Aufgabenstellung	49
8. Materialien und Methoden	53
8.1 Materialien	53
8.1.1 Mutagenese und Testoligonukleotidprimer	53
8.1.2 Plasmide	53
8.1.3 Bakterienstämme	54
8.1.4 Zelllinie	54

8.2 Chemikalien	54
8.2.1 Chemikalien/Enzyme	54
8.2.2 Generelle Stock-Lösungen	54
8.3 Fest- / Flüssig-Medien	55
8.3.1 undefinierte/semidefinierte Medien	55
8.3.1.1 P22-Infektion/Lysogenie Unterscheidung	55
8.3.2 Definierte Medien	55
8.3.2.1 Definierte Medien Zusätze	56
8.3.2.2 <i>para</i> -Aminobenzoat	56
8.3.2.3 Aminosäure-, Purin-, Pyrimidin- und Peptidlösungen	56
8.3.3 eukaryotisches Zellkulturmedien	58
8.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte	58
8.5 Methoden	60
8.5.1 Bakterielle Wachstumsbedingungen	60
8.5.2 Wachstumsbedingungen für eukaryotische Zellkultur	60
8.5.3 Kryogene bakterielle Stammverwahrung	60
8.5.4 Kryogene eukaryotische Kulturverwahrung	60
8.5.5 Mycoplasmen-Kontrolle	61
8.6 Genetische Methoden	61
8.6.1 Transformation von <i>E. coli</i> bzw. <i>S. Typhimurium</i>	61
8.6.2 elektop. kompetente Zellen (Schnellverfahren)	61
8.6.3 elektop. kompetente Zellen (Wanner-Mutagenese)	62
8.6.4 Deletionsmutanten in Stamm 4200	62
8.6.5 Herstellung von Phagenlysate	63
8.6.6 Herstellung von Deletionsmutanten (SL1344)	63
8.6.7 Transduktion	64
8.6.8 Mutantenanalyse mittels Reinigungsausstrich	64
8.7 Molekularbiologische Methoden	65
8.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
8.7.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von DNA	65
8.7.3 Plasmidisolierung	66
8.7.4 Restriktion von DNA mittels Restriktionsenzymen	66
8.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten	67
8.7.6 Sequenzanalyse	67
8.8 Elektrophoretische Methoden	67
8.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA bzw. RNA	67
8.8.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese	68

8.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
8.9 Proteinchemische Arbeiten	71
8.9.1 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	71
8.9.2 Peptidsynthese- und Aufreinigungsmethoden	71
8.9.3 Synthese His-Taq markierter Polypeptide (Poly-Valin)	71
8.9.4 Überexpression His-Taq markierter Polypeptide	72
8.9.5 Polypeptidisolierung (Ni-TED Kit / Amicon-Filtration)	72
8.10 Zellbiologische Methoden	73
8.10.1 Passagieren adhärenenten und Suspensions-Zelllinien	73
8.10.2 Invasions- / Replikations-Assay	73
8.10.3 Messung der Zytotoxizität	74
8.11 Photometrische Methoden	75
8.12 Statistik	76
9. Ergebnisse	77
9.1 Analyse von Aminosäure-Biosynthese & – Aufnahme-Mutanten	77
9.2 Überprüfung auf homologe Rekombinationsereignisse	77
9.3 Analyse extra- und intrazellulärer Phänotypen	79
9.4 Histidin-Biosynthese	80
9.5 C1-Metabolismus rel. Aminosäuren Serin, Threonin & Glycin	83
9.6 Die Rolle der Cystein- und Methion-Biosynthese	89
9.7 Die Rolle der Aminosäuren Arginin und Prolin	90
9.8 Die Rolle der aromatischen Aminosäuren	92
9.9 Hinweise für die intraz. Verfügbarkeit von Peptiden für <i>Salmonella</i>	95
9.10 Die Rolle der Peptidtransportsysteme	98
9.11 Die Rolle von <i>para</i> -Aminobenzoat (PABA)	99
9.12 Die Rolle von <i>aroA</i>	102
9.13 Die Rolle von PABA	103
9.14 Die Rolle der verzweigtk. Aminosäuren Isoleucin, Leucin & Valin	104
9.15 Versuche mit Poly-Valin zur Inhibierung von <i>ilvGM</i> -Mutanten	108
9.16 Test auf Zytotoxizität des Tri-Valin-Peptids in Zellkultur	112
9.17 Die Rolle des Glycerol-Transports	114
10. Diskussion	116
10.1 Zielsetzung der Arbeit	116
10.2 Histidin-Auxotrophie und intravakuoläre Folgen	118
10.3 Manipulationen am C1-Stoffwechsel und deren Folgen	119
10.4 Manipulation der Prolin-Biosynthese	124
10.5 $\Delta argT$ -Phänotyp unterschiedlich in Epithelzelllinie	125

10.6 Aromat. Aminosäuren & deren Rolle für die intraz. Replikation	125
10.7 Peptidaufnahmesysteme & deren Rolle für die intraz. Replikation	129
10.8 Die <i>para</i> -Aminobenzoat Problematik	130
10.9 Die Rolle der verzweigt-kettigen Aminosäuren	133
10.10 Beeinflussung der intrav. Replikation durch artifizielles Peptid	135
10.11 Auswirkungen der Unterbindung des Glycerol-Transportes	139
10.12 Zusätzliche Ergeb. die Aminosäure & Peptidzugang stützen	140
11. Zusammenfassung	142
12. Summary	143
13. Literaturliste	145
14. Anhang	165
14.1 Tab. 13, Ergebnisübersicht	165
14.2 Ergeb. die Aminosäureunabhängigkeit / Peptidzugang stützen	167
14.3 Tab. 14, verwendete Mutagenese und Testoligonukleotidprimer	168
14.4 Tab. 15, Bakterienstämme	180
15. Abkürzungsverzeichnis	183
16. Selbstständigkeitserklärung	186
17. verwendete Internetplattformen/adressen	187
18. Plagiarismus Analyse	188
19. Lebenslauf	189

3. Einleitung

3.1 Das Pathogen *Salmonella*

Salmonellen gehören zu den Gram-negativen, fakultativ anaeroben, fakultativ intrazellulären, Stäbchen-förmigen Bakterien. Ihre Größe beträgt zwischen 0,75-1,5 x 2-5 µm (Shannon & Rowbury, 1975; Smit *et al.*, 1975). Mit Ausnahme eines Serovars (*S. enterica* subsp. *enterica* Serovar Gallinarum Pullorum, aus didaktischen Gründen wird im weiteren Text lediglich die Serovar-Bezeichnung gewählt, also z.B. *S. Gallinarum Pullorum*) sind alle Serovare motil, da sie über peritriche Begeißelung verfügen. Die für die Bewegung nötigen Flagellen bzw. deren Untereinheiten (Flagellin) können in zwei unterschiedlichen Varianten (biphasisch) vorliegen (Smith *et al.*, 1990). Monophasische *Salmonella*-Stämme exprimieren nur einen der zwei Flagellen-Antigene. Darunter befinden sich viele Isolate, wie *S. Typhi* oder *S. Enteritidis* (Dauga *et al.*, 1998), die bei Menschen schwere Erkrankungen (Typhus, Salmonellose) hervorrufen. Salmonellen können sehr lange in warmer und feuchter Umgebung überleben (Gray *et al.*, 2001; Gray & Fedorka-Cray, 2001, 2001). Das Serovar *S. Newport* konnte noch über ein Jahr in Erde nachgewiesen werden (You *et al.*, 2006).

Salmonellen sind weltweit verbreitet und weisen ein weit umfassendes Wirtsspektrum auf. Als Hauptreservoir gelten warm- und kaltblütige Tiere (Bäumler, 1997). So werden neben Nutztieren auch Haustiere wie Vögel (Foley *et al.*, 2011) und Reptilien (Bertrand *et al.*, 2008) aber auch Fische (Onyango *et al.*, 2009) und Insekten als Träger genannt (Greenberg & Klowden, 1972). Auch konnten Salmonellen in verschiedenen Gemüsesorten nachgewiesen werden (Berger *et al.*, 2010; Heaton & Jones, 2008; Gu *et al.*, 2011, Golberg *et al.*, 2011). Dies wird aber noch kontrovers diskutiert. *Salmonella* werden hauptsächlich über die fäkal-orale Route aufgenommen (Haraga *et al.*, 2008). Eine Übertragung vom Tier auf den Menschen und umgekehrt ist möglich (Saarinen *et al.*, 1996). Tiere als auch Menschen können das Pathogen asymptomatisch im Intestinaltrakt bzw. in der Gallenblase tragen (Gonzales-Escobedo *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2011). Diese werden in Zyklen mit den Fäces abgesetzt. Menschen infizieren sich hauptsächlich über kontaminiertes Wasser oder tierische Erzeugnisse wie Fleisch und Eier (Foley *et al.*, 2011). Mit der kontaminierten Nahrung gelangt *Salmonella* in den Verdauungstrakt. Die Fähigkeit, adaptiv eine Säuretoleranz zu etablieren, hilft möglicherweise dem Pathogen den niedrigen pH-Wert des Magens zu passieren (Haraga *et al.*, 2008). *Salmonella* verfügt über verschiedene Mechanismen, mit denen das Pathogen auf die unterschiedlichen Abschnitte und die vorherrschenden Milieus des Intestinaltrakts kompensatorisch antworten kann (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). In tierischen Wirten infizieren *Salmonella* typischerweise intestinale Epithelzellen des distalen Ileums (Saarinen *et al.*, 1996). Nach dem Eintritt in den Dünndarm dringt das Pathogen in intestinale Epithelzellen bzw. M-Zellen (Peyersche Plaques) (Jepson

& Clark, 2001, Lu & Walker, 2001) oder dendritische Zellen (Sundquist *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2008) ein und wandert nach einer intrazellulären Replikationsphase in das lymphatische Gewebe des Intestinaltrakts. Ist *Salmonella* einmal im lymphatischen Gewebe, nehmen Makrophagen das Pathogen durch Phagozytose auf. *Salmonella* kann innerhalb von Makrophagen in ähnlicher Weise überleben wie in Epithelzellen, indem es das Phagosom für seine eigenen Zwecke modifiziert. Innerhalb der Makrophagen kann es zu einer systemischen Ausbreitung kommen, die im schlimmsten Fall zu einer Sepsis bzw. Meningitis führen (Mahajan *et al.*, 1968; Cooke *et al.*, 2009).

Salmonellen zählen zur Familie der Enterobacteriaceae und werden aufgrund verschiedener serologischer Eigenschaften mittels Antigen-Differenzierung unterschieden. Dieses sogenannte „Kaufmann-White-LeMinor Schema“ ermöglicht es heute, über 2500 verschiedene „Serovare“ voneinander zu trennen (Brenner *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003; Tindall *et al.*, 2005). Die Antigenstrukturen, die für die Unterscheidung herangezogen werden, bestehen aus O-Antigen (Lipopolysaccharidschicht), H-Antigen (Flagella) und Vi-Antigen (Kapselbestandteil) (Popoff *et al.*, 2004). Trotz serologischer Differenzierbarkeit in über 2500 Serovaren, beruhend auf genetischen bzw. genomischen Unterschieden, gruppiert man die *Salmonellae* in nur zwei Spezies, die eine Gattung bilden, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Die Spezies *Salmonella enterica* unterteilt sich ihrerseits in sechs Subspezies (Chan *et al.*, 2003; Tindall *et al.*, 2005). Die Subspezies „*enterica*“, mit ca. 1500 Serovaren, bildet die größte Gruppierung unter den Subspezies. Zu dieser zählt auch das für diese Arbeit relevante Pathogen *Salmonella* Typhimurium. Es gilt als sicher, dass es wirtsadapierte Serovare gibt als auch solche, die ein breites Wirtsspektrum aufweisen (Rabsch *et al.*, 2002). Das für diese Untersuchung wichtige *Salmonella* Serovar Typhimurium zählt zu den Serovaren, die ein breites Wirtsspektrum infizieren können.

3.1.1 *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serovar Typhimurium

Das Pathogen *S. Typhimurium* verursacht beim Menschen eine lokale Gastroenteritis mit Lymphadenitis, gefolgt von Diarrhoe (Santos & Bäumler, 2004). Es verursacht im Tiermodell (Maus) eine systemisch verlaufende Typhus-gleiche Erkrankung (Zhang *et al.*, 2003) und wird deswegen häufig als Modell für die medizinische Erforschung des humanen Typhus, welcher durch *S. Typhi* verursacht wird, verwendet. In Kälbern (Rind) ebenso wie im Menschen sind Infektionen mit *S. Typhimurium* auf den Intestinaltrakt beschränkt (Santos & Bäumler, 2004). Die unterschiedlichen Krankheitsbilder, die durch *S. Typhimurium* in Maus und Rind verursacht werden, beruhen auf genetischen Unterschieden der Wirtsspezies, die Varianzen in der angeborenen Immunantwort aufweisen sowie die Fähigkeit der wirtseigenen Makrophagen, die bakterielle Replikation zu kontrollieren (Bäumler *et al.*, 1996; Santos & Bäumler, 2004).

Der für diese Untersuchung verwendete *S. Typhimurium* Stamm SL1344 trägt die kryptische Prophage St64B (Figueroa-Bossi & Bossi, 2004) sowie die Prophage SopE Φ (Figueroa-Bossiet *al.*, 2001). Des Weiteren weist SL1344 stammspezifische Phänotypen auf. Dazu zählen: eine Histidin-Auxotrophie, eine Streptomycin-Resistenz und die Unfähigkeit, Biofilme zu bilden (Hoiseth & Stocker, 1981; Garcia *et al.*, 2004). In Studien (Ahmer *et al.*, 1999) wurde gezeigt, dass SL1344 nicht befähigt ist, eine Konjugation als Donorstamm durchzuführen. Dies konnte aber durch Studien von Garcia-Quintanilla & Casadesus (2011) widerlegt werden. Des Weiteren, und dies ist für diese Arbeit sehr interessant, ist SL1344 trotz der Histidin-Auxotrophie virulent in Mäusen und kann auch zum Tod dieser Tiere führen (Leung & Finlay, 1991).

Grundsätzlich muss hier auch darauf hingewiesen werden, dass sich der Stamm SL1344 in besonderem Maße für diese Arbeit anbot. Zum einen aus dem Grund, dass bereits umfassende Daten, basierend auf Arbeiten mit diesem Stamm, vorliegen und verifiziert sind. Zum anderen muss in deutlichem Hinweis auf die Vergleichbarkeit mit diesen zuvor erhobenen Daten/Arbeiten verwiesen werden, die in den letzten Dekaden eine Fülle an Informationen zum Stamm selbst zur Verfügung stellten. Wären für die vorliegende Untersuchung ein anderer Stamm bzw. andere Derivate zum Einsatz gekommen, wäre die Vergleichbarkeit und somit der Erkenntnisgewinn in fragwürdigem Maße zu überprüfen gewesen. Unter der Bedingung, dass zu SL1344 jedoch umfassende Arbeiten zu Stoffwechsel und Biosynthese vorliegen, ist eine aufbauende Arbeit wie diese als weiterer Erkenntnisblock klar einzuordnen und als solcher auch zu verstehen. Resultierend daraus erübrigt sich eine Argumentation, die rein auf Stamm- bzw. Isolat-spezifischen Beobachtungen beruht.

4. Stoffwechsel von *S. Typhimurium*

Wie bereits zuvor schon angedeutet, kann *S. Typhimurium* ein breites Substratspektrum verwenden. Die Grundlagen dafür bilden einerseits spezifisch und unspezifisch arbeitende Aufnahmesysteme sowie Enzymmaschinerien für den Substratkatabolismus bzw. für den Anabolismus. Die dissimilatorischen Fähigkeiten schließen verschiedenste Zucker, Polyole sowie Carboxylate, aber auch einfache Kohlenstoffverbindungen wie Acetate und Fettsäuren mit ein (Lin, 1987, 1996; Nunn, 1987; Clark & Cronan, 1996). Die Fähigkeit, durch Heterotrophie in aeroben bzw. anaeroben Habitaten effizient replikationsfähig zu bleiben, macht *S. Typhimurium* zu einer höchst anpassungsfähigen Spezies. Die komplexe Stoffwechselleistung von *S. Typhimurium* ist nach wie vor Bestandteil aktueller Forschung (Bumann, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010). Das Pathogen eignet sich hervorragend als Experimentalorganismus, da ein breites Spektrum an etablierten genetischen Manipulations- und Analysemethodika existiert, was unter anderem dazu beitrug, die verwandte Gattung

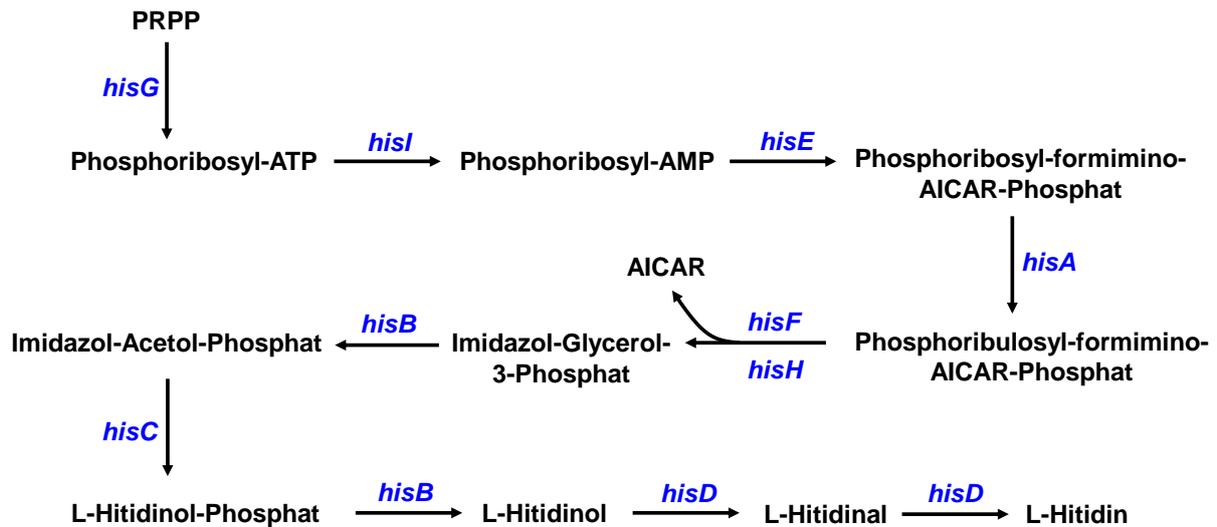
Escherichia (Groisman & Ochman, 1997; Bäumler, 1997) biochemisch als auch genetisch besser zu verstehen.

In jüngster Zeit werden Anstrengungen unternommen, mittels „*metabolic flux analysis*“ (MFA, metabolische Fluss Analyse) bzw. „*C¹³-Isotopologue profiling*“ (C¹³-Isotopolog Profil) Stoffwechselrouten genau zu studieren (Raghunathan *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010; Götz *et al.*, 2010). Eine alternative und klassische Methode besteht in der Verwendung von Biosynthese-Deletionsmutanten und deren Replikationsanalyse in *in vitro*- bzw. *in vivo*-Versuchen. Mittels *in vitro*-Replikationsanalyse wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedenster Biosynthesewege von *S. Typhimurium* analysiert. Um einen Einblick in die Stoffwechsellistung und die beteiligten Biosynthesewege zu erhalten, wird im Folgenden ein kurzgefasster Überblick über die für diese Arbeit relevanten Stoffwechselwege in schematischer Übersicht gegeben.

4.1 Biosynthese von Histidin

Der in Abb. 1 dargestellte Biosyntheseweg, mit allen beteiligten Enzymen, orientiert sich an dem in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Histidin-Biosyntheseweg (00340).

An der Biosynthese von Histidin sind acht Enzyme beteiligt, die alle in einem Operon kodiert vorliegen (Brenner & Ames, 1971). Des Weiteren sind mit der Biosynthese verschiedene Regulatoren assoziiert, die nicht in unmittelbarer Umgebung zum Operon positioniert sind (Winkler, 1987, 1996). Zwei der acht für die Biosynthese nötigen Enzyme sind bifunktional. Dazu zählen *hisB* und *hisIE*, die für unabhängig katalytische Schritte verantwortlich sind (Winkler, 1987, 1996). Zur kompletten Erläuterung der biosynthetischen Schritte und der beteiligten Regulationsmechanismen wird hier auf die Studien von Winkler (1987, 1996) verwiesen. Die Ausgangssubstrate für die Biosynthese von Histidin sind Phosphoribosyl-pyrophosphat (PRPP) und ATP. Ursprung des Phosphoribosyl-pyrophosphats ist der Pentosephosphatweg. Phosphoribosylpyrophosphat ist ebenso an der Biosynthese von Pyrimidin, Purin bzw. Pyridin Nukleotiden und Tryptophan (Neuhard & Nygaard, 1987, Nygaard & Zalkin, 1996; Neuhard & Kelln, 1996; Pittard, 1987, 1996; Winkler, 1987, 1996) beteiligt. Durch die Phosphoribosyl-Transferase, kodiert durch *hisG*, findet eine Dislokation der C-1 Einheit von PRPP mit der N-1 Einheit des ATP-Purinringsystems statt (vgl. Abb. 1). Eine Unterbrechung dieser Reaktion hat zur Folge, dass die Biosynthese von Histidin vollständig unterbunden wird.



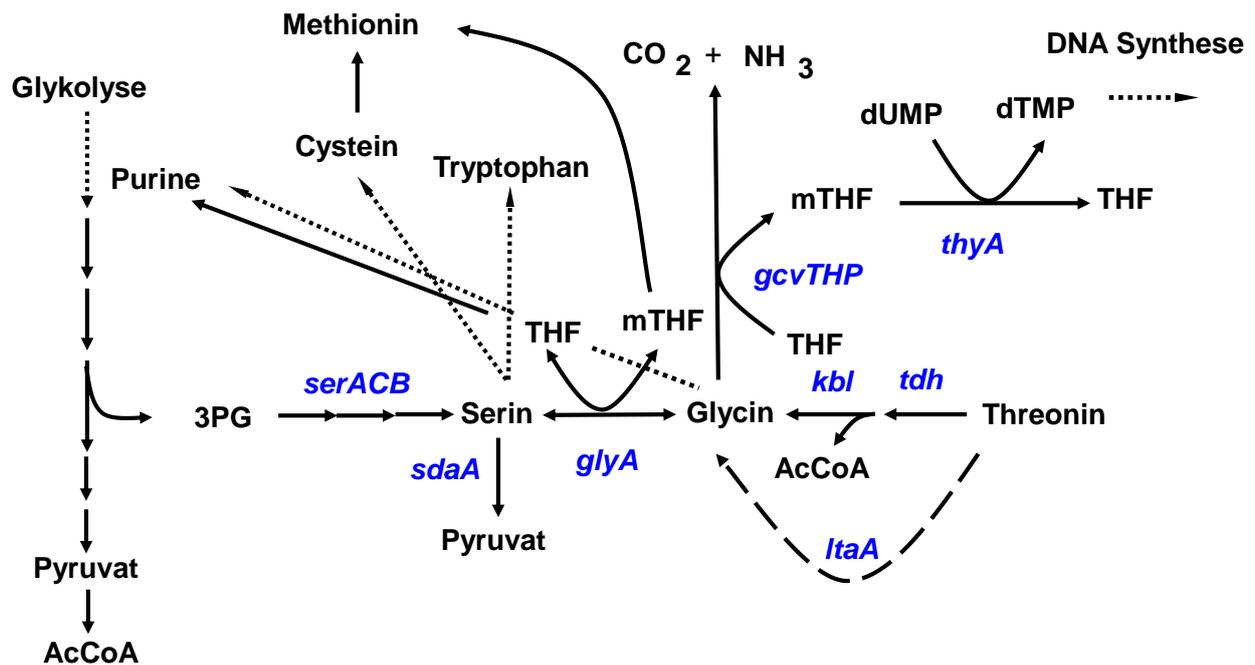
▲ Abb. 1: Histidin-Biosynthese-Schema:

Phosphoribosyl-pyrophosphat (PRPP); Phosphoribosyl-Transferase (*hisG*), bifunktionelles Enzym Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrolase (*hisI*) / Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase (*hisE*). Phosphoribosylformino-5-amino-1-phosphoribosyl-4-imidazolcarboxamid-Isomerase (*hisA*); Cyclase (*hisF*); 5-Aminoimidazol-4-Carboxyamid-Ribotid (AICAR); Glutamin-Amidotranferase (*hisH*); bifunktionelles Enzym: Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase / Histidinol-Phosphatase (*hisB*); Histidinolphosphat-Aminotransferase (*hisC*); Histidinol-Dehydrogenase (*hisD*). (angelehnt und abgewandelt von KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Histidin-Biosyntheseweg 00340)

4.2 C1-Stoffwechsel: Biosynthese von Serin und Glycin

Die Biosynthese von Serin und Glycin und die damit verbundene Synthese von C-1 Einheiten sind von fundamentaler Bedeutung für den Organismus (Stauffer, 1987, 1996; Landgraf *et al.*, 1994). Es gibt zwei Routen, über die Serin und Glycin synthetisiert werden können. Der Hauptweg verläuft über die Glykolyse und das daraus resultierende 3-Phosphoglycerat. Dieser Biosyntheseweg wird im Folgenden näher beschrieben (vgl. Abb. 2). Die zweite Route erfolgt über den Katabolismus von Threonin. Auf diesen Biosyntheseweg wird im Abschnitt 4.2.1 eingegangen.

Serin selbst dient u.a. als Vorläufermolekül für die Synthese von Cystein und Tryptophan, was das Fehlen von Serin auf ein hohes Niveau von Nebeneffekten hebt. Die Beteiligung eines Serinbiosynthese-Intermediats, des 3-Phosphoserins, wurde bei der Biosynthese von Pyridoxin diskutiert (Stauffer, 1987, 1996).



▲ Abb. 2: Serin und Glycin-Biosynthese-Schema mit Nebenreaktionen:

Dargestellt wird die Synthese von Serin und Glycin sowie ein Teil des Threonin-Katabolismus, der zur Synthese von Glycin bzw. Serin genutzt werden kann. Schwarze Pfeile geben die Syntheserichtung an. Gepunktete Pfeile deuten auf Substrate hin, die für die Synthese der in Pfeilrichtung dargestellten Produkte genutzt werden. Gestrichelte Pfeile verweisen auf mögliche biochemische Umlagerung, die in dieser Studie untersucht wurde. 3-Phosphoglycerat (3PG); 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (*serA*), 3-Phosphoserin-Aminotransferase (*serC*); 3-Phosphoserin-Phosphatase (*serB*); L-Serin-Deaminase I (*sdaA*) Serinhydroxymethyl-Transferase (*glyA*), Tetrahydrofolat (THF); Methyl-Tetrahydrofolat (mTHF); Acetyl-Coenzym A (AcCoA); 2-Amino-3-Ketobutyrat-Coenzym A Ligase (*kbl*); L-Threonin-3-Dehydrogenase (*tdh*); Glycin-Spaltungskomplex (*gcvTHP*); Desoxy-Uridinmonophosphat (dUMP); Desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP); Thymidylat-Synthase (*thyA*). (in Anlehnung an Schemaentwurf von Dr. Tedin)

Die C-1 Einheiten werden für die Synthese von Purinen, Thymin, Histidin und Methionin benötigt, ebenso sind sie Bestandteil für die Formyl-Gruppe von fMet-tRNA_f (Stauffer, 1987, 1996). Als Ausgangssubstrat für die Serin-Biosynthese dient 3-Phosphoglycerat (3PG), welches von der 3PG-Dehydrogenase (*serA*) zu 3-Phosphohydroxypyruvat umgelagert wird (Landgraf *et al.*, 1994). Das 3-Phosphohydroxypyruvat Molekül seinerseits wird durch die 3-Phosphoserin-Aminotransferase in 3-Phosphoserin überführt. Der finale Syntheseschritt zu Serin wird durch die 3-Phosphoserin-Phosphatase katalysiert, welche durch *serB* kodiert wird. Anschließend findet die Umlagerung von Serin zu Glycin durch die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (*glyA*) mit Hilfe von Tetrahydrofolat (THF) statt. Die Syntheseregulation der

Serin-Hydroxymethyl-Transferase ist sehr komplex und wird durch verschiedene Parameter gesteuert (Dev & Harvey, 1984).

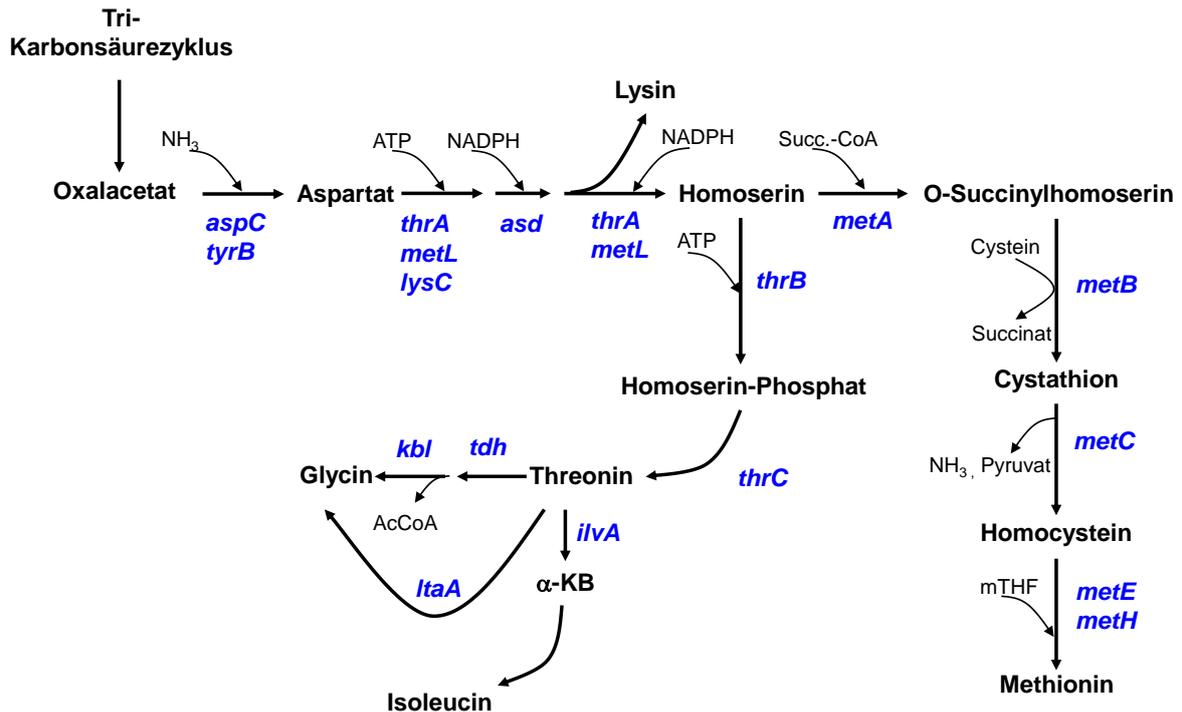
Der durch die Serin-Hydroxymethyl-Transferase vermittelte Reaktionsschritt versorgt den Organismus mit rund 65-80 % der benötigten C1-Einheiten für die anabolen Reaktionen des Organismus (Stauffer, 1987, 1996; Landgraf *et al.*, 1994). Glycin selbst ist Bestandteil von Purinen und Heme-beinhaltenen Verbindungen und kann durch den Glycin-Spaltungskomplex (*gcvTHP*) mittels THF in CO₂ und NH₃ gespalten werden (Stauffer, 1987). All dies hebt die durch die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (*glyA*) katalysierte Reaktion als essentiellen Regulationspunkt im Biosyntheseprozess hervor. Tatsächlich wird das System an diesem Punkt durch verschiedenste regulative Prozesse kontrolliert.

Die Komplexität dieser Mechanismen ist aber so umfangreich, dass sie den Rahmen dieser Arbeit weit übersteigen würde, weswegen für weiterführende Informationen über die aufgeführten biosynthetischen Schritte und die beteiligten Regulationsmechanismen hier auf Stauffer, (1987, 1996); Kredich, (1987, 1996); Cohen & Saint-Girons, (1987); Patte, (1996) und Greene, (1996) verwiesen wird.

4.2.1 C1-Stoffwechsel: Biosynthese von Aspartat, Threonin und Methionin

Die zuvor angesprochene Route, Glycin bzw. Serin zu synthetisieren, verläuft über den Katabolismus von Threonin (vgl. Abb. 2 und 3) (Stauffer, 1987, 1996; Rex *et al.*, 1991; Marcus & Dekker, 1993) und wird auch als „Tut-Weg“ bezeichnet (Ravnikar & Somerville, 1987). Zuvor muss jedoch auf die Synthese von Threonin selbst eingegangen werden, um die angeschlossenen Reaktionen und deren Vernetzung zu verstehen. Der in Abb. 3 dargestellte Biosyntheseweg, mit allen beteiligten Enzymen, orientiert sich an den in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Biosynthesewegen 00250, 00260 und 00270.

Threonin wird aus Aspartat synthetisiert (Ravnikar & Somerville, 1987; Marcus & Dekker, 1993). Aspartat selbst wird durch die Aspartat-Aminotransferase (*AspC* und/oder *TyrB*) gebildet (Van Dyk & LaRossa, 1986), welche die Aminogruppe von Glutamat auf Oxalacetat überträgt, wobei Aspartat und 2-Ketoglutarat entstehen (vgl. Abb. 3). Einzeldelationen von *aspC* oder *tyrB* in *E.coli* bewirken keine Aspartat-Auxotrophie, was darauf schließen lässt, dass beide Aminotransferasen ähnliche intrazelluläre Funktionen ausüben (Reitzer & Magasanik, 1987; Reitzer 1996; Pittard 1987, 1996; Cohen & Saint-Girons, 1987). Eine Verifizierung dieses Phänotyps in *S. Typhimurium* innerhalb der hier vorliegenden Arbeit wird im Ergebnisteil zugehörig zum C1-Metabolismus bzw. zu den aromatischen Aminosäuren erneut vertiefend aufgegriffen.



▲ Abb. 3: Übersichtsschema der Aspartat-, Threonin- und Methionin-Biosynthese:

Durchgängig schwarze Pfeile markieren die Syntheserichtung. Aspartat-Aminotransferase (*aspC*); Tyrosin-Aminotransferase (*tyrB*); bifunktionale Aspartokinase I / Homoserin-Dehydrogenase I (*thrA*, *metL*, *lysC*); Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (*asd*); bifunktionale Aspartokinase I / Homoserin-Dehydrogenase I (*thrA*, *metL*); Homoserin-Kinase (*thrB*); Threonin-Synthase (*thrC*); Threonin-Dehydratase (*ilvA*); Threonin-Aldolase (*itaA*); 2-Amino-3-Ketobutyrat-Coenzym-A-Ligase (*kbl*); L-Threonin-3-Dehydrogenase (*tdh*); Homoserin-O-Succinyltransferase (*metA*); Cystathionin-Gamma-Synthase (*metB*); Cystathionin-Beta-Lyase (*metC*); 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamat / Homocysteine-S-Methyltransferase (*metE*), B12-abhängige Methionin-Synthase (*metH*). (angelehnt und abgewandelt von KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Biosynthesewegen 00250, 00260 und 00270)

Aspartat kann durch drei Aspartat-Kinasen, kodiert durch *thrA* (I), *metL* (II), *lysC* (III), mit ATP phosphoryliert werden (KEGG-Datenbank). Die Aspartat-Kinasen I (*thrA*) und II (*metL*) sind bifunktional und weisen auch die katalytischen Eigenschaften einer Homoserin-Dehydrogenase (I und II) auf. Das entstandene Aspartyl-Phosphat wird danach durch die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (*asd*) und NADPH zu Aspartat-Semialdehyd katalysiert. Dieses dient seinerseits u.a. als Vorläufermolekül für die Synthese von Lysin. Aus Aspartat-Semialdehyd wird zusammen mit NADPH Homoserin synthetisiert. Diese Reaktion kann durch die bifunktionalen Homoserin-Dehydrogenasen I und II (*thrA*, *metL*) katalysiert werden (vgl. Abb.3). Homoserin selbst dient als Vorläufermolekül für die Synthese von Methionin, Isoleucin und Threonin und stellt damit eine Schlüsselverbindung dar.

Für die Synthese von Methionin wird Homoserin mittels der Homoserin-Succinyltransferase (*metA*) und Succinyl-CoA zu O-Succinylhomoserin umgeformt (vgl. Abb. 3). Katalysiert durch die Cystathion- γ -Synthase (*metB*), unter Übertragung der Amino- und Schwefelgruppe von Cystein, wird Cystathion gebildet. Durch die *metC* kodierte Cystathion- β -Lyase wird Cystathion unter Abspaltung der Aminogruppe und Pyruvats in Homocystein umgelagert. Anschließend erfolgt die Synthese von Methionin durch die Katalyse einer der beiden Homocystein-Methylasen (*metE*, *metH*) unter Beteiligung von methyliertem Tetrahydrofolat (mTHF) als Methylgruppenspende.

Für die Threonin-Biosynthese wird Homoserin mittels ATP und die durch *thrB* kodierte Homoserin-Kinase phosphoryliert (vgl. Abb. 3). Das entstandene Homoserin-Phosphat wird im Anschluss durch die Threonin-Synthase (*thrC*) zu Threonin umgelagert. Durch die Deletion von *thrB* und *thrC* wurde in der für diese Arbeit relevanten Mutante die Biosynthese vollständig unterbunden. Für die detaillierte Beschreibung aller aufgeführten biosynthetischen Schritte und der beteiligten Regulationsmechanismen wird hier auf Cohen & Saint-Girons, (1987) bzw. Patte, (1996) für die Threonin-Biosynthese verwiesen.

Threonin kann aufgrund der L-Threonin-3-Dehydrogenase (*tdh*) und der 2-Amino-3-Ketobutyrat-Coenzym-A-Ligase (*kbl*) in Glycin umgeformt werden (vgl. Abb. 3) (Landgraf *et al.*, 1994). Die Synthese von Serin aus Glycin findet über die durch *glyA* kodierte Serin-Hydroxymethyl-Transferase statt. Dabei entsteht kein methyliertes Tetrahydrofolat (mTHF) (vgl. Abb. 3) (Landgraf *et al.*, 1994). Durch die Spaltungsreaktion von Glycin, vermittelt durch den Glycin-Spaltungskomplex (*gcvTHP*) und/oder durch die Synthese von Glycin aus Serin durch die Serinhydroxymethyl-Transferase (*glyA*), kann mTHF synthetisiert werden (Kikuchi, 1973). Ein weiterer interessanter Aspekt des Threonin-Katabolismus ist das Vorhandensein der L-Threonin-Aldolase, kodiert durch das *ItaA*-Gen (vgl. Abb. 3). Die L-Threonin-Aldolase ist ein schwach spezifisches Enzym, welches die Formation von Acetaldehyd und Glycin aus Threonin katalysiert (Lui *et al.*, 1998, Kielkopf & Burley, 2002). Um einen Einblick in die Funktion des Enzyms im SL1344 Hintergrund zu bekommen, wurde das Gen allein und in Kombination deletiert und dessen Auswirkungen auf das intrazelluläre Replikationsverhalten untersucht. Threonin kann aber nicht nur zu Glycin umgeformt werden. Es dient hauptsächlich als Vorläufermolekül für die Synthese von Isoleucin. Auf diesen Zusammenhang wird im Abschnitt 4.3 vertiefend eingegangen.

Für weitere detaillierte Informationen über beteiligte biosynthetische Schritte und die relevante Regulationshierarchie wird hier auf Reitzer & Magasanik, (1987); Reitzer, (1996); Cohen & Saint-Girons, (1987), Patte, (1996) und Umbarger, (1987, 1996) verwiesen.

4.3 Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin

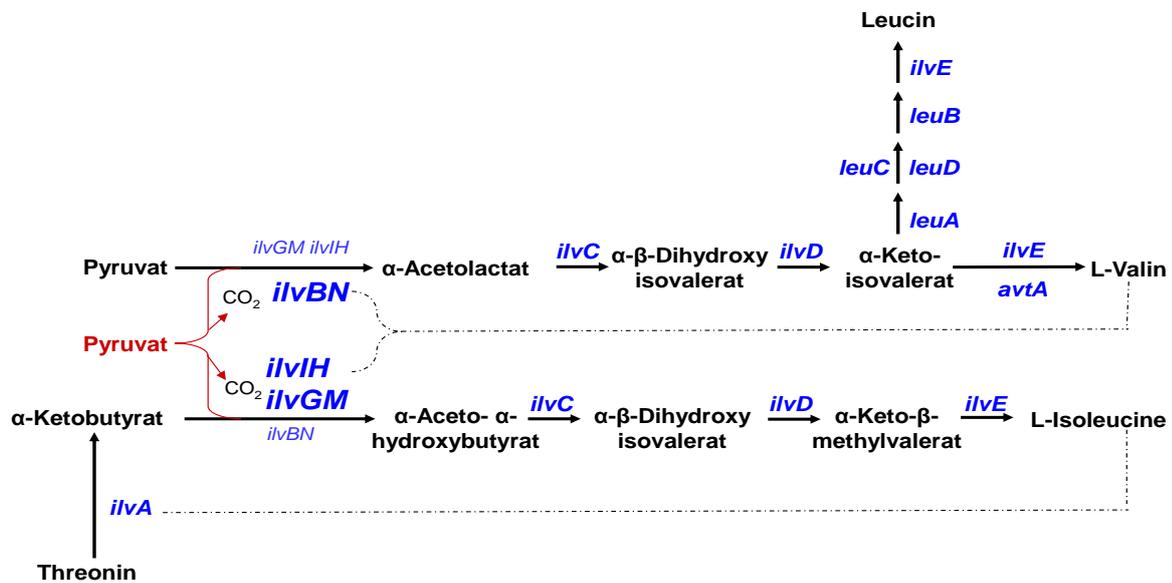
Der in Abb. 4 dargestellte Biosyntheseweg mit allen beteiligten Enzymen orientiert sich neben dem in Umbarger, (1987, 1996) aufgeführten Biosyntheseweg auch an den in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Aminosäure Biosynthesewegen 00280 und 00290.

Die verzweigtkettige Biosynthese der Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin ist aufgrund der beteiligten komplexen Regulation (Clavo & Clavo, 1967; McGinnis & Williams; 1971; Jackson *et al.*, 1974; Quay *et al.*, 1975) sehr vielfältig und wird daher nur in essentiellen Auszügen dargelegt. Für die Synthese sind die Komponenten Pyruvat und α -Ketobutyrat nötig. Das aus dem Threonin-Katabolismus stammende α -Ketobutyrat ist seinerseits für diverse regulative und biosynthetische Prozesse in verschiedenen bakteriellen Gattungen verantwortlich. Dazu zählen die Stimulation des Isoleucin-Katabolismus (Primerano & Burns, 1982), die Inhibierung der Valin- und Aspartat-Synthese (Shaw & Berg, 1980; Danchin *et al.*, 1984; Van Dyk & LaRossa, 1986), die Phantothentat-Synthese (Primerano & Burns, 1982), der Zuckertransport (Danchin *et al.*, 1984) sowie die Unterstützung bei der Synthese von Acetyl-CoA (Danchin *et al.*, 1984). Auch wurde die Rolle als bakterielles Alarmon diskutiert (Daniel *et al.*, 1983; Danchin *et al.*, 1984). Andere Untersuchungen zeigten auch toxische Effekte von α -Ketobutyrat (LaRossa *et al.*, 1984, 1987). Dabei wurde eine toxische Akkumulation von α -Ketobutyrat, hervorgerufen durch die Inhibierung der Acetolaktat-Synthase mittels des Herbizids „Sulfometuron Methyl“, nahegelegt.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Beteiligung bei der Aminoacetylation der tRNAs für Isoleucin und Valin (Primerano & Burns, 1982; Danchin *et al.*, 1984). Somit stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die intrazelluläre Konzentration von α -Ketobutyrat tatsächlich auf persistierende *Salmonella* hat?

Für die Synthese von Leucin, Isoleucin und Valin sind drei Acetyhydroxysäure-Synthasen (AHSI (*ilvBN*), AHSII (*ilvGM*), AHSIII (*ilvIH*)) von entscheidender Bedeutung (Umbarger, (1987, 1996). Diese werden in unterschiedlicher Weise reguliert und sind abhängig vom Produkt in unterschiedlicher Stärke an der Synthese der einzelnen Aminosäuren beteiligt. Dies wird in Abb. 4 durch verschiedene Schriftgrößen der betreffenden Gene verdeutlicht. So ist die durch *ilvBN* kodierte AHSI hauptverantwortlich für die Synthese von Leucin und Valin. Die durch *ilvGM* und *ilvIH* kodierten AHSII und AHSIII sind hingegen hauptsächlich für die Synthese von Isoleucin verantwortlich (Umbarger, (1987, 1996). Bei der AHSI und AHSIII ist zu berücksichtigen, dass diese Valin-Konzentrationsabhängig reguliert werden. Dies ist aber nicht in allen *Salmonella*-Stämmen

gleich. So fehlt z.B. *S. Typhimurium* LT2, im Gegensatz zu SL1344, die durch *ilvIH* kodierte AHSIII (Burns *et al.*, 1995).



▲ Abb. 4: Übersichtsschema der Biosynthese verzweigtkettiger AS Isoleucin, Leucin und Valin:

Die durch vergrößerte Schrift hervorgehobenen Acetylhydroxysäure-Synthasen I,II,III (*ilvBN*, *ilvIH*, *ilvGM*) verdeutlichen die präferierte Endprodukt (*ilvBN*: Richtung Valin/Leucin) (*ilvIH*, *ilvGM*: Richtung Isoleucin). Durchgängig schwarze Pfeile markieren Syntheserichtung, unterbrochene Linien deuten auf reprimierenden regulatorischen Einfluss hin. Threonin-Dehydratase (*ilvA*); Acetylhydroxysäure-Synthase II (*ilvGM*); Acetylhydroxysäure-Synthase III (*ilvIH*); Acetylhydroxysäure-Synthase I (*ilvBN*); Acetylhydroxysäure-Isomerase (*ilvC*); Dihydroxysäure-Dehydrase (*ilvD*); Transaminase B (*ilvE*), Transaminase C (*avtA*); Isopropylmalat-Synthase (*leuA*); α-Isopropyl-Malat-Isomerase (*leuC*, *leuD*); β-Isopropyl-Malat-Dehydrogenase (*leuB*). (angelehnt und abgewandelt aus Umbarger, (1987, 1996) aufgeführten Biosyntheseweg sowie an den in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Aminosäure Biosynthesewegen 00280 und 00290)

Die biosynthetischen Schritte für die Synthese von Leucin und Valin benötigen zwei Mol Pyruvat zur Generierung von α-Acetylactat via AHSI (*ilvBN*). Dies wird anschließend durch die Acetylhydroxysäure-Isomerase (*ilvC*) zu α-β-Dihydroxyisovalerat umgesetzt was im Anschluss durch die Katalyse der Dihydroxysäure-Dehydrase (*ilvD*) zu α-Ketoisovalerat umgewandelt wird Umbarger (1987, 1996). Dies dient seinerseits als Ausgangsmolekül für die Synthese von Leucin, Pantothenensäure und Valin (Umbarger, 1987, 1996; Epelbaum *et al.*, 1998).

In Richtung der Valin-Synthese wird α-Ketoisovalerat mittels der Transaminasen B und C (*ilvE*, *avtA*) zu Valin umgeformt. In Richtung der Leucin-Synthese erfolgt die Umformung von α-Ketoisovalerat mittels der Isopropyl-Malat-Synthase (*leuA*). Das daraus entstehende Produkt α-Isopropylmalat wird im Anschluss durch die Isopropylmalat-

Isomerasen (*leuC* und *leuD*) zu β -Isopropylmalat umgelagert. Danach erfolgt die Generierung von α -Ketoisocaproat über die katalytische Tätigkeit der durch *leuB* kodierten β -Isopropylmalat-Dehydrogenase. Das entstandene α -Ketoisocaproat wird durch die Transaminasen B und C (*ilvE*, *avtA*) zu Leucin umgeformt Umbarger, (1987, 1996). In Richtung der Isoleucin-Synthese setzen die AHSII (*ilvGM*) und AHSIII (*ilvIH*) α -Ketobutyrat zu α -Aceto- α -hydroxybutyrat um. Anschließend wird durch die Aktivität der Acetohydroxysäure-Isomereduktase (*ilvC*) das α -Aceto- α -hydroxybutyrat zu α - β -Dihydroxyisovalerat umgelagert. Dies wird seinerseits durch die Dihydroxysäure-Dehydrase (*ilvD*) zu α -Keto- β -methylvalerat überführt und danach durch die Transaminasen B (*ilvE*) zu Isoleucin umgeformt.

Für weiterführende Informationen bezüglich der Biosynthesewege, der regulativen Mechanismen und der Operonstrukturen wird auf Umbarger, (1987, 1996) verwiesen.

Für die hier vorliegende Promotion spielt die Δ *ilvGM*-Mutante (Acetylhydroxysäure-Synthase II) eine entscheidende Rolle, denn durch die regulative Wirkung von steigender Valin-Konzentration, auf die in der Mutante verbleibende Acetylhydroxysäure-Synthase III (*ilvIH*), kann gezielt durch Valin-Zugabe eine Unterbindung der Isoleucin-Biosynthese induziert werden, was in einer Wachstumsinhibierung der Δ *ilvGM*-Mutante mündet, wenn kein Isoleucin zugänglich ist. Dieser Regulationsmechanismus wurde genutzt, um zu zeigen, dass auch Poly-Valin-Peptid (Tri-Valin-Peptid) selbst inhibitorischen Einfluss auf die Δ *ilvGM*-Mutante ausübt, wenn dieses z.B. auf M9-Minimalmedium-Agar-Platten oder auch in definiertem Zellkulturmedium im Infektionsversuch Anwendung fand.

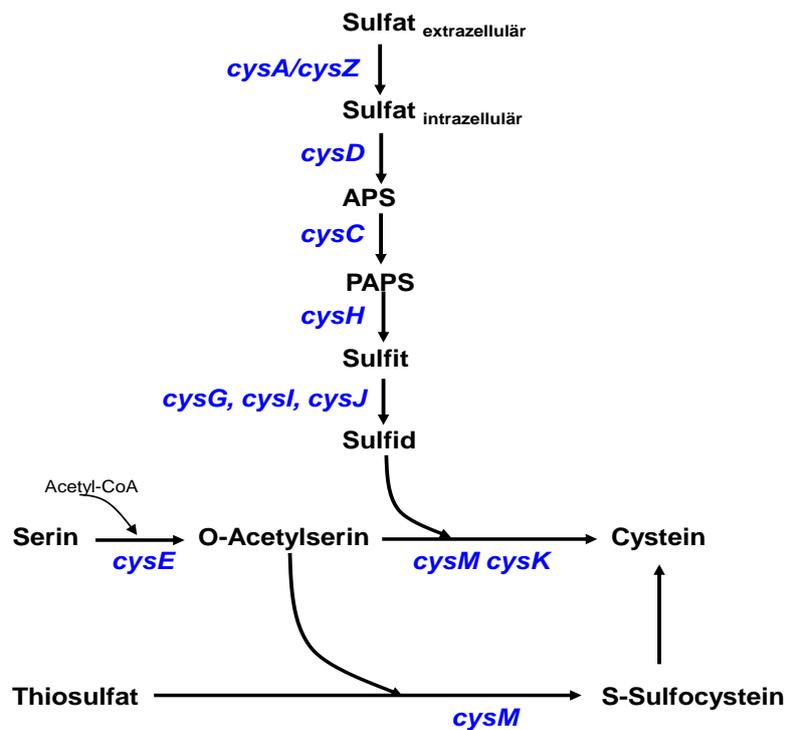
4.4 Biosynthese von Cystein

Die Biosynthese von Cystein ist für *Salmonella* ein relativ einfacher Prozess, unter der Voraussetzung, dass sich das Pathogen in einem Lebensraum befindet in dem Sulfat zugänglich ist. Die Synthese stellt nicht nur die für die Proteinsynthese wichtige Aminosäure zur Verfügung, sondern unterhält auf diesem Weg die Biosyntheserouten von Glutathion, Methionin und anderen schwefelhaltigen Verbindungen (Kredich, 1987; 1996) und stellt die Hauptfixierungsquelle von anorganischem Schwefel für den Organismus dar.

Salmonella verfügt über drei Wege, Sulfat zu fixieren. Dazu zählt die nur über O-Acetylserin und Sulfid verlaufende, die über Thiosulfat und O-Acetylserin und die über die Cystathionin- γ -Synthase bzw. O-Succionylhomoserin und Sulfid verlaufenden Route. Die letztgenannte scheint aber von untergeordneter physiologischer Rolle zu sein (Kredich, 1987; 1996) und wird in Abb. 5 nicht aufgeführt.

Die Aminosäure Serin und die Generierung von O-Acetylserin mittels Acetyl-CoA und der durch *cysE* kodierten Serin-Transacetylase stellen somit neben Thiosulfat die

Haupttrouten für die Synthese von Cystein in *Salmonella* dar. O-Acetylserin wird über die beiden durch *cysM* bzw. *cysK* kodierten O-Acetylserin-Sulphydrolasen A und B mit Sulfid in Cystein umgewandelt. Die O-Acetylserin-Sulphydrolase B (*cysM*) katalysiert ebenso die Umsetzung von O-Acetylserin mit Thiosulfat zu S-Sulfocystein, welches anschließend zu Cystein reduziert. Für weitere Aspekte des Cystein Stoffwechsels und dessen Regulationsmechanismen wird hier auf Kredich, (1987; 1996) verwiesen.



▲ Abb. 5: Übersichtsschema der Cystein Biosynthese:

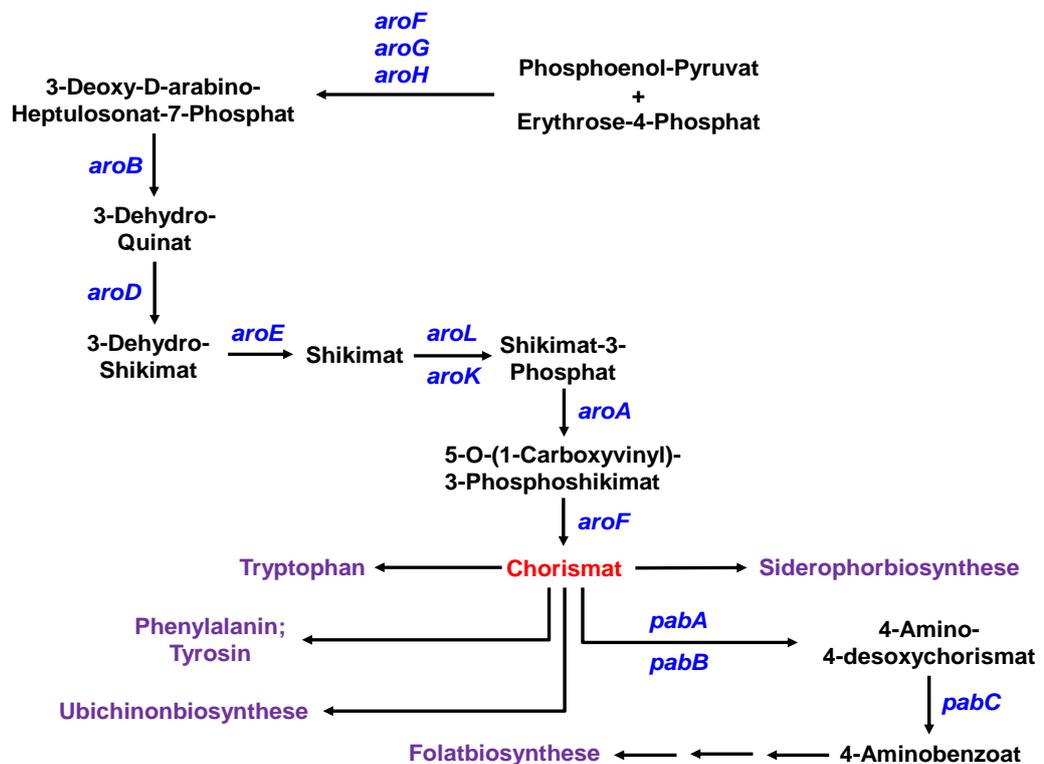
Durchgängig schwarze Pfeile markieren die Syntheserichtung. Sulfat-Permease (*cysA, cysZ*); ATP-Sulfurylase (*cysD*); APS-Kinase (*cysC*); PAPS-Sulfotransferase (*cysH*); Sulfit-Reduktase (*cysG, cysI, cysJ*); Serin-Transacetylase (*cysE*); O-Acetylserin-Sulphydrolase A (*cysK*); bifunktionale O-Acetylserin-Sulphydrolase B (*cysM*). (angelehnt und abgewandelt aus Kredich, (1987; 1996))

4.5 Biosynthese von Chorismat und von *para*-Aminobenzoesäure

Chorismat dient als Vorläufermolekül für vielfältige biosynthetische Prozesse. Somit ist der direkte Einfluss auf Chorismat, bzw. dessen Synthese, von diversen Nebeneffekten begleitet, auf die nur für relevante Aspekte in dieser Arbeit eingegangen werden kann. Der in Abb. 6 dargestellte Biosyntheseweg orientiert sich an den in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Biosynthesewegen 00400 und 00790.

Die Ausgangssubstrate für die Synthese von Chorismat stellten Phosphoenol-Pyruvat und Erythrose-4-Phosphat dar. Diese werden in dem Shikimat-Biosyntheseweg zu Shikimat enzymatisch prozessiert. Beide Substrate können durch die enzymatische Aktivität dreier 3-

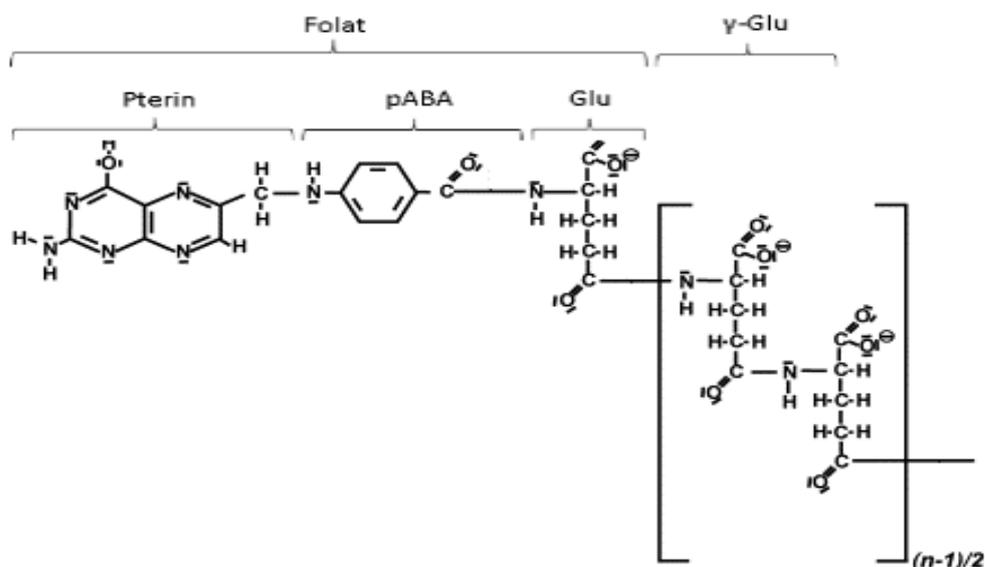
Desoxy-*D-arabino*-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthasen (*aroF*, *aroG*, *aroH*) zu 3-Desoxy-*D-arabino*-Heptulosonat-7-Phosphat, unter P_i -Abspaltung, umgeformt werden. Aus 3-Desoxy-*D-arabino*-Heptulosonat-7-Phosphat wiederum wird durch die durch *aroB* kodierte 3-Dehydroquinat-Synthase im Anschluss 3-Dehydroquinat synthetisiert, welches zu 3-Dehydroshikimat durch die 3-Dehydroquinat-Dehydratase (*aroD*) und der Abspaltung von H_2O umgeformt wird. Das 3-Dehydroshikimat wird mittels NADPH und der Shikimat Dehydrogenase protoniert. Dabei entsteht das für die Synthese von Chorismat essentielle Shikimat. Shikimat wird mittels ATP und der durch *aroL* kodierten Shikimat-Kinase phosphoryliert. Das dabei entstandene Shikimat-3-Phosphat wird im Anschluss durch die durch *aroA* kodierte 5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat Synthase und Phosphoenolpyruvat unter Abspaltung von P_i zu 5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat umgelagert. Die durch *aroC* kodierte Chorismat-Synthase spaltet den verbliebenen Phosphatrest ab und generiert somit Chorismat.



▲ Abb. 6: Übersichtsschema der Chorismat und *para*-Aminobenzoat Biosynthese:

Dargestellt wird die Biosynthese von Chorismat als Vorläufermolekül für die Synthese der aromatischen AS, Ubichinon, Siderophoren und von *para*-Aminobenzoat als Teil der Folat-Synthese. Durchgängig schwarze Pfeile markieren Syntheserichtung. 3-Desoxy-*D-arabino*-heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (*aroF*, *aroG*, *aroH*); 3-Dehydroquinat-Synthase (*aroB*); 3-Dehydroquinat-Ddehydratase (*aroD*); Shikimate-Dehydrogenase (*aroE*); Shikimat-Kinase (*aroL*, *aroK*); 5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat-Synthase (*aroA*); Chorismat-Synthase (*aroC*), *para*-Aminobenzoat-Synthase (*pabA*, *pabB*); 4-Amino-4-Desoxychorismat-Lyase (*pabC*). (angelehnt und abgewandelt aus KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Biosynthesewegen 00400 und 00790)

Ein interessanter Aspekt der Chorisamat-Synthese ist der bereits erwähnte vielfältige Einsatz des Moleküls für die Speisung anderer biosynthetischer Wege. Wie aus Abb. 6 zu entnehmen ist, wird sowohl die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, als auch die des Ubichinons und die Siderophor- und Folat-Biosynthese unterhalten. Chorismat selbst dient als unmittelbares Vorläufermolekül für die Synthese von 4-Amino-4-desoxychorismat. Diese verläuft über die katalytische Funktion der durch zwei Untereinheiten kodierten (*pabA* und *pabB*) *para*-Aminobenzoat-Synthase. Das 4-Amino-4-desoxychorismat wird im Anschluss durch die durch *pabC* kodierte 4-Amino-4-desoxychorismat-Lyase zu *para*-Aminobenzoat umgeformt. Die aus diesem biosynthetischen Prozess resultierenden *para*-Aminobenzoat-Moleküle werden direkt in die Folat-Biosynthese eingespeist und bilden, wie aus Abb. 6a hervorgeht, das Trägersystem für den Aufbau des Folat-Moleküls.



▲ Abb. 6a: Übersichtsschema des Folsäure-Moleküls:

Folsäure (Folat) besteht aus drei Molekülbestandteilen: Pterin, *para*-Aminobenzoat (pABA/PABA) und Glutamat, welches auch selbst als Glutamatrest N-terminal durch Polyglutamierung ergänzt werden kann. Das mono-glutamierte Folat-Molekül ist auch unter dem Begriff Pteroyl-Glutaminsäure bekannt. (Schema übernommen und abgewandelt aus Bollheimer *et al.*, 2005; Copyright Lizenznummer 3037790702247, <http://www.copyright.com/>)

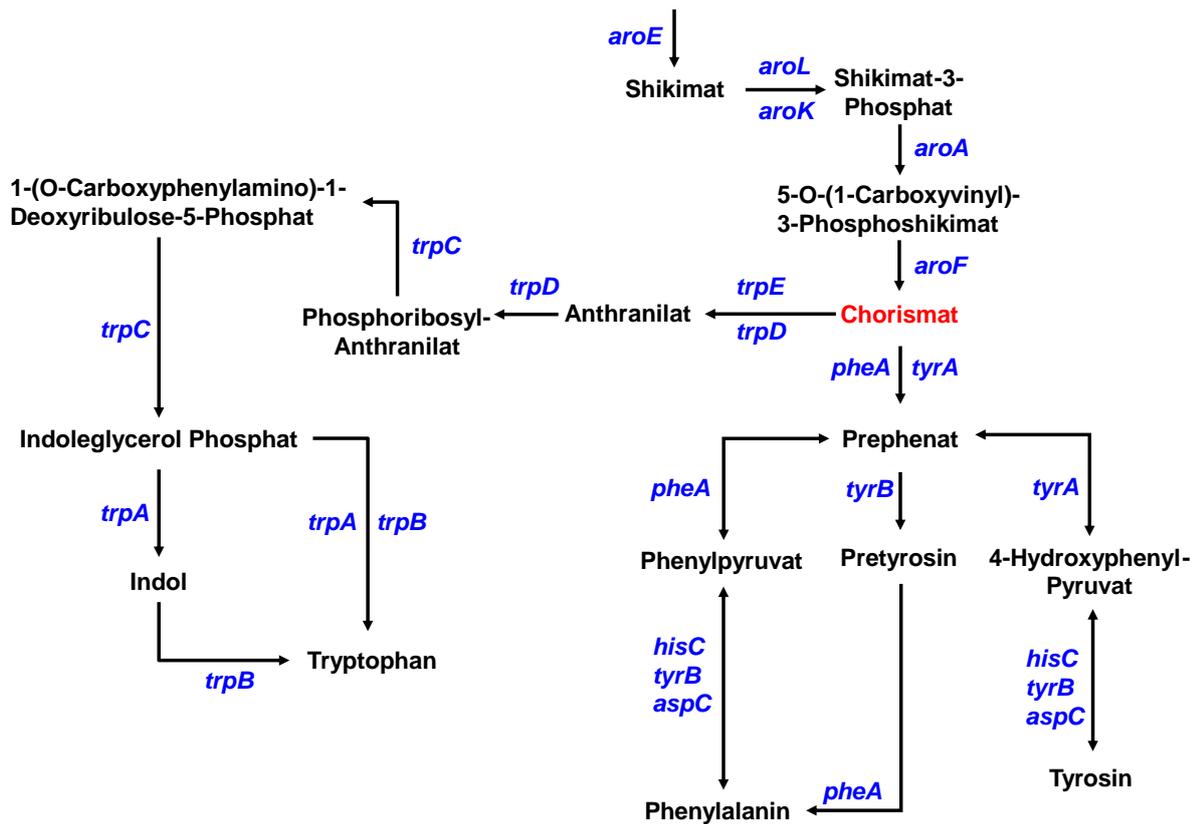
Für einen vertiefenden Einblick in die Regulation sowie in die biosynthetischen Vernetzungen der Chorismat-Synthese wird auf Pittard, (1987; 1996), Brown & Williamson, (1987) und Green *et al.* (1996) hingewiesen.

4.6 Biosynthese aromatischer Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan

Der in Abb. 7 dargestellte Biosyntheseweg orientiert sich an den in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführtem Biosyntheseweg 00400.

Wie aus der Abb. 7 hervorgeht, leiten sich die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bzw. deren Biosynthese aus dem enzymatischen Umbau der gemeinsamen Vorläufermoleküls Chorismat her. Für die Biosynthese von Tryptophan wird Chorismat mittels der aus zwei Untereinheiten bestehende Anthranilat-Synthase (*trpE*, *trpD*) unter Beteiligung von Glutamin zu Anthranilat, Pyruvat und Glutamat umgesetzt. Das entstandene Anthranilat wird im Anschluss durch die Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (*trpD*) mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat phosphoriliert. Dabei entsteht Phosphoribosyl-Antranilat, welches seinerseits durch die bifunktionelle Phosphoribosyl-Antranilat-Isomerase (*trpC*) zu 1-(O-carboxyphenylamino)-1-Deoxyribulose-5-Phosphat und danach durch die Indoleglycerol-Phosphat-Synthase (*trpC*) zu Indoleglycerol-Phosphat unter CO₂-Abspaltung prozessiert wird. Tryptophan selbst wird durch die Umlagerung von Indoleglycerol-Phosphat und der Übertragung der Aminogruppe von Serin durch die enzymatische Aktivität der durch zwei Untereinheiten aufgebauten Tryptophan-Synthase (*trpA*, *trpB*) synthetisiert. Die Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanin verläuft ebenfalls über das Vorläufermolekül Chorismat. Dieses wird über die Chorismat-Mutase (*pheA* und *tyrA*) zu Prephenat umgewandelt. Die bifunktionelle Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase (*tyrA*) lagert Prephenat zu 4-Hydroxyphenyl-Pyruvat unter Abspaltung von CO₂ um. Anschließend wird Tyrosin durch die Übertragung der Aminogruppe von Glutamat auf 4-Hydroxyphenyl-Pyruvat durch eine von drei zu Verfügung stehenden Aminotransferasen (AT) (*hisC* (Histidinol-Phosphat-AT), *tyrB* (Aromatische-Aminosäure-AT), *aspC* (Aromatische-Aminosäure-AT)) synthetisiert. Dabei wird α -Ketoglutarat freigesetzt.

Phenylalanin kann wie folgt synthetisiert werden. Der Hauptsyntheseweg erfolgt über die Umsetzung von Chorismat zu Prephenat, durch die bifunktionelle Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydratase (*pheA*) oder durch die ebenfalls bifunktionelle Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase (*tyrA*). Prephenat wird im Anschluss durch die Tyrosin-Aminotransferase (*tyrB*) zu Phenylalanin umgesetzt.



▲ Abb. 7: Biosyntheschema aromatischer Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan:

Dargestellt wird die vom Vorläufermolekül Chorismat ausgehende Synthese der aromatischen Aminosäuren. Durchgängig schwarze Pfeile markieren die Syntheserichtung. Shikimate-Dehydrogenase (*aroE*); Shikimat-Kinase (*aroL, aroK*); 5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat-Synthase (*aroA*); Chorismat-Synthase (*aroF*); Anthranilat-Synthase (*trpE, trpD*); Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (*trpD*); bifunktionelles Enzym: Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase / Indoleglycerol-Phosphat-Synthase (*trpC*); Tryptophan-Synthase (*trpA, trpB*); bifunktionelles Enzym: Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase (*pheA*), Tyrosin-Aminotransferase (*tyrB*); bifunktionelles Enzym: Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase (*tyrA*); Tyrosin-Aminotransferase (*hisB, tyrB, aspC*). (übernommen und abgewandelt aus KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführtem Biosyntheseweg 00400)

Für detaillierte Informationen der beteiligten Regulation sowie der Kinetik der einzelnen Enzyme wird auf Pittard (1987; 1996) verwiesen.

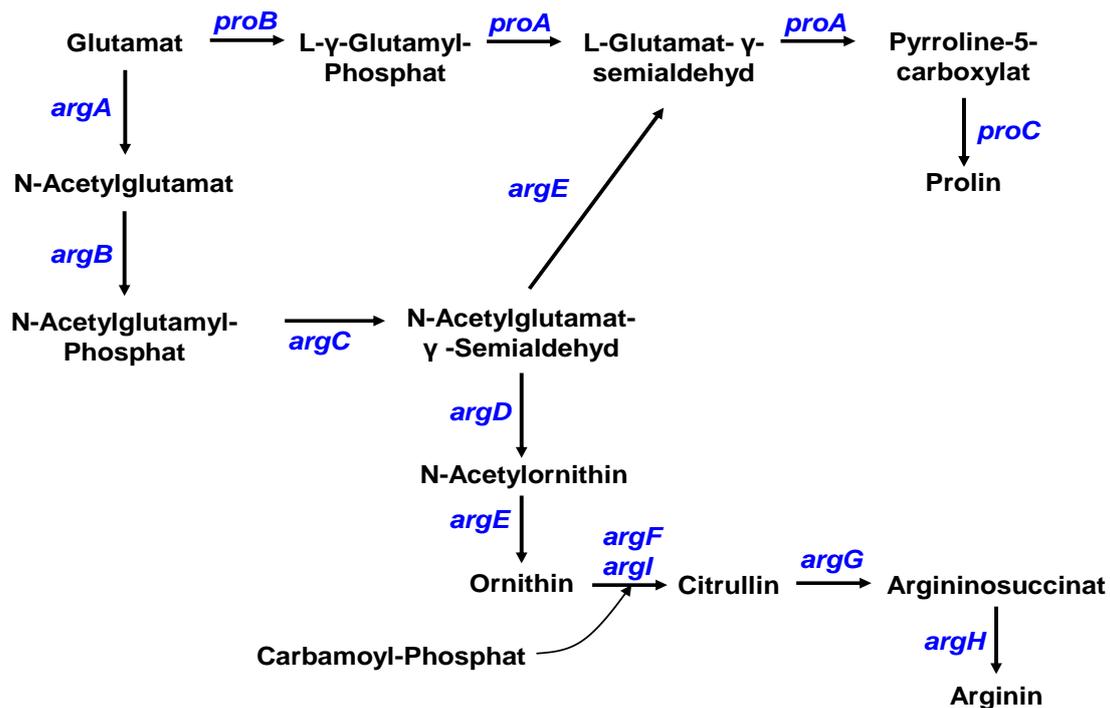
Ein anderer sehr interessanter Teil der Phenylalanin-Biosynthese ist, dass durch die Akkumulation eines bestimmten Biosynthese-Vorläufermoleküls (Prephenat), die durch die Deletion von *pheA* hervorgerufene Auxotrophie, über eine Bypassreaktion überbrückt werden kann. Dies wurde erstmals bei Phenylalanin-auxotrophen *E. coli* Mutanten durch Simmonds (1950) beobachtet und konnte auch von anderen Arbeitsgruppen verifiziert werden (Katagiri & Sato, 1953; Davis, 1953). Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. dem

sinkenden pH-Wert des Wachstumsmediums, können Phenylalanin-auxotrophe Mutanten ihren eigenen Wachstumsfaktor (Prephenat) generieren. Das Wachstum auf alkalischen Medien (pH 7,5-8,0) begünstigt die Akkumulation des Prephenats. Prephenat ist ein Vorläufermolekül sowohl für die Phenylalanin- als auch Tyrosin-Biosynthese und wird von beiden bifunktionalen Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydratase (*pheA*, *tyrA*) aus Chorismat synthetisiert. Prephenat ist relativ stabil in alkalischem Milieu und unter diesen Bedingungen nur ein sehr leichter bzw. kein Wachstumsfaktor für *pheA*-Mutanten (Davis, 1951). Dies ändert sich jedoch wenn man den pH-Wert absenkt (6,5-6,0), da hierbei die spezifische Molekülstruktur Veränderungen erfährt (Davis, 1953). Bei Wachstum auf Medium mit dem pH-Wert 7,0 kommt es im Zuge des Kolonie- oder des Kulturwachstums zur Ansäuerung des umgebenden Mediums auf die kritische Grenze von pH 6,5 und Prephenat wird labil. Die Phenylalanin-auxotrophe Mutante ist nun in der Lage, durch den spontanen Zerfall der labilen Variante von Prephenat zu Phenylpyruvat, die Auxotrophie zu umgehen (Davis, 1953). Auf alkalischen Medien kann nur dann Wachstum generiert werden, wenn ausreichend Zellmaterial vorhanden ist, das aufgrund der geleisteten Stoffwechsellistung den vorherrschenden pH-Wert dennoch senken kann. Ist die Zelldichte zu gering, wirkt das umgebende Medium stabilisierend auf Prephenat und erhält somit die Auxotrophie aufrecht. Um den Mechanismus des Zerfalls von Prephenat zu Phenylpyruvat besser zu beleuchten und den Zerfall zu vermeiden, klonierte Kleeb *et al.* (2007) das Gen der Cyclohexandienyl-Dehydrogenase aus *Zymomonas mobilis* (katalysiert die vollständige Umsetzung von Prephenat zu 4-Hydroxyphenylpyruvat [für Tyrosin Biosyntheseweg]) in eine Δ *pheA*-Mutante von *E. coli*. Dies mündete darin, dass kein Prephenat mehr zur Verfügung stand welches zu Phenylpyruvat zerfallen konnte. Dadurch wurde die Auxotrophie aufrechterhalten.

4.7 Biosynthese von Prolin und Arginin

Der in Abb. 8 dargestellte Biosyntheseweg mit allen beteiligten Enzymen orientiert sich an dem in der KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Biosyntheseweg 00330.

Als Vorläufermolekül für die Synthese von Prolin und Arginin dient Glutamat (Leisinger, 1987, 1996; Glansdorf, 1987, 1996). In Richtung der Prolin-Biosynthese wird Glutamat durch die γ -Glutamyl-Kinase (*proB*) und ATP zu L- γ -Glutamyl-Phosphat phosphoryliert. Dieses wird im Anschluss durch die L-Glutamat- γ -Semialdehyd-Dehydrogenase (*proA*) zunächst in L-Glutamat- γ -Semialdehyd und danach zu Pyrrolin-5-Carboxylat umgewandelt. Dabei wird im ersten Schritt NADPH oxidiert und im zweiten Schritt H₂O abgespalten. Prolin wird anschließend durch die durch *proC* kodierte Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase prozessiert.



▲ Abb. 8: Übersichtsschema Prolin- und Arginin-Biosynthese:

Ausgangssubstrat für die Synthese beider Aminosäuren stellt Glutamat dar. Durchgängig schwarze Pfeile markieren Syntheserichtung. γ -Glytamyl-Synthase (*proB*); γ -Glytamyl-Phosphat-Reduktase (*proA*); Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (*proC*); *N*-Acetylglutamat-Synthase (*argA*); Acetylglutamat-Kinase (*argB*); *N*-Acetyl- γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (*argC*); Acetylornithin-Deacetylase (*argE*); bifunktionelles Enzym: *N*-Succinyl-Diaminopimelat-Aminotransferase / Acetylornithin-Transaminase (*argD*); Ornithine-Carbamoyl-Transferase (*argF*, *argI*); Argininosuccinat-Synthase (*argG*); Argininosuccinat-Lyase (*argH*). (übernommen und abgewandelt aus KEGG-Datenbank für *S. Typhimurium* LT2 (25.02.2013) aufgeführten Biosyntheseweg 00330)

Für die Arginin-Biosynthese wird Glutamat zusammen mit Acetyl-CoA durch die *N*-Acetylglutamat-Synthase (*argA*) zu *N*-Acetylglutamat und CoA umgesetzt. Danach erfolgt eine über *N*-Acetylglutamat-Kinase (*argB*) und ATP vermittelte Phosphorylierung zu *N*-Acetylglutamyl-Phosphat. Diese wird durch NADPH + H⁺ und der *N*-Acetylglutamyl-Phosphat-Reduktase (*argC*) zu *N*-Acetylglutamyl- γ -Semialdehyd reduziert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass *N*-Acetylglutamyl- γ -Semialdehyd enzymatisch durch die *N*-Acetylornithinase (*argE*) zu L-Glutamat- γ -Semialdehyd umgeformt werden kann, das ein Zwischenprodukt der Prolin-Synthese darstellt. Das *N*-Acetylglutamyl- γ -Semialdehyd wird für die Arginin-Biosynthese via Glutamat und der *N*-Acetylornithin-Transaminase (*argD*) in *N*-Acetylornithin umgewandelt. Dieses wird im Anschluss durch die *N*-Acetylornithinase (*argE*) und H₂O weiter zu Ornithin und Acetat katalysiert. Die durch *argF* und *argI* kodierte Ornithin-Carbamoyl-Transferase, wandelt Ornithin und Carbamoyl-Phosphat in Citrullin und P_i um. Das Citrullin selbst wird mittels ATP und Aspartat durch die Katalyse der Argininosuccinat-

Synthase (*argG*) zu Argininosuccinat prozessiert. Dieses dient als Substrat für die durch *argH* kodierte Arginino-Succinase, welche Arginin und Fumarat als Endprodukte entlässt.

Arginin als auch Ornithin spielen bei der Biosynthese von Polyaminen wie Spermidin oder Kadaverin eine essentielle Rolle (Schneider & Wendisch, 2011; Balana-Fouce *et al.*, 2012). Somit ist auch nicht nur der direkte Effekt durch das Fehlen der Aminosäure Arginin für die Proteinsynthese relevant, sondern auch die sekundären Effekte der Deletionen.

Für detaillierte Informationen der beteiligten Regulation sowie der Kinetik der einzelnen Enzyme wird auf (Leisinger, 1987, 1996; Glansdorf, 1987, 1996) verwiesen.

4.8 Aminosäure- und Peptidaufnahmesysteme

Grundsätzlich verfügt *Salmonella* über die Möglichkeit, alle benötigten Aminosäuren biosynthetisch zu erzeugen (Götz *et al.*, 2010). Ausgangspunkt für die Synthese der meisten Aminosäuren sind die Glykolyse bzw. der Tri-Carbonsäurezyklus, aus denen Vorläufermoleküle die einzelnen Biosynthesewege der Aminosäuren versorgen (Eisenreich *et al.*, 2010). Die Synthese von Aminosäuren ist ein aufwändiger und energiezehrender Prozess. Als alternative Möglichkeit der Versorgung der Protein-Biosynthese mit den benötigten Aminosäuren steht *Salmonella* ein breites Spektrum an Aufnahmesystemen zur Verfügung, um den Bedarf zu decken und sich verändernden Umweltbedingungen anpassen zu können (Sanderson & Roth, 1988; McClelland *et al.*, 2001). Freie Aminosäuren ebenso wie kleine Peptide stellen für *Salmonella* also eine weitere mögliche Quelle für die Versorgung mit benötigten Aminosäuren bzw. mit Stickstoff und Schwefel dar (Payne, 1980).

Um die intrazelluläre Verfügbarkeit von Aminosäuren und von Peptiden, sowie deren Einfluss auf die intrazelluläre Replikation von SL1344 Derivaten überprüfen zu können, wurden Mutanten erzeugt, bei denen durch Deletion der betreffenden Gene oder Operonstrukturen die Aminosäure- oder Peptidaufnahmesysteme deletiert vorlagen. Die für diese Arbeit relevanten Transportsysteme von Aminosäuren und Peptiden werden in Tabelle 1 aufgeführt und im Folgenden näher erläutert. Annotationen der entsprechenden Bereiche richten sich nach der *S. Typhimurium* LT2 Genom-Analyse von McClelland *et al.* (2001).

Das durch *argT* (*S. Typhimurium* LT2 Lokusbezeichnung STM2355) kodierte Arginin-Lysin-Ornithin-Transportbindepotein, stellt zusammen mit dem durch *hisMPQ* kodierten Transportsystem eines von zwei Mechanismen dar, das *Salmonella* nutzt, um Arginin aufzunehmen (Kustu & Ames, 1973; Quay & Christensen, 1974). Es werden ein hochspezifisches (*argT*, *hisMPQ*) und ein schwach-spezifisches (*argT*, *hisMPQ*) System unterschieden. Der Grund, warum für die vorliegende Promotion ein Bindeprotein untersucht wurde, begründet sich auf Studien von Das *et al.* (2010), bei denen das Fehlen von *argT* in

S. Typhimurium LT2 zu einem Replikationsdefizit in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen mit aus Knochenmark gewonnenen Makrophagen (BMDM) Zellen bzw. BALB/c Mäusen führte. Somit scheint die Rolle des durch *argT* kodierten Bindeproteins bei der Akquirierung von Arginin während der intrazellulären Replikation innerhalb von Makrophagen, eine Rolle zu spielen. Ob diese Beobachtung auch bei der Replikation innerhalb von Epithelzellen von Bedeutung ist, also zu einem Zeitpunkt vor der systemischen Ausbreitung von *Salmonella*, sollte mit dieser Arbeit überprüft werden.

Für die Aufnahme der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan verfügt *Salmonella* sowohl über spezifisch als auch unspezifisch arbeitende Aufnahmesysteme. Das für diese Arbeit relevante unspezifische System (*aroP*) transportiert neben den genannten Aminosäuren auch Histidin und Aminosäure-Analoga (Ames, 1964; Payne, 1980). Die aromatische Aminosäure-Permease (*aroP*) transportiert auch ein Glutamin-Analoga, Azaserin, was das Wachstum von *Salmonella* inhibiert (Ames & Roth, 1968). Um Mutanten zu generieren, die bestimmte aromatische Aminosäuren nicht aufnehmen können, war die Deletion des *aroP*-Gens erforderlich.

Das spezifische Phenylalanin-Transportsystem (*pheP*, Bezeichnung von *E. coli* für diese Arbeit übernommen) wurde bereits durch Ames (1964) vermutet, aber nicht isoliert (Ames, 1964; Ames & Roth, 1968; Payne, 1980). In *E. coli* K-12 wurden verschiedene Analysen bezüglich des *pheP*-Produkts durchgeführt (Pi *et al.*, 1991). Durch Annotation konnten im SL1344 Genom Gensequenzen *pheP* sowie *tyrP* (kodierte ein spezifisches Transportprotein für Tyrosin) und *mtr* (kodierte ein spezifisches Transportprotein für Tryptophan) abgeleitet werden, welche für diese Arbeit deletiert wurden (vgl. Primerliste 14.3, Anhang).

Die Aufnahmesysteme der verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin wurden zuerst von Cohen & Rickenberg (1956) beschrieben. Ihre Bezeichnung wurde später durch Rahmanian *et al.*, (1973), Payne (1980) und andere variiert, bis die Bezeichnungen LIVI (*livJ*), LIVII (*brnQ*) und LIVIII (*livKHMGF*) abgeändert wurden (Payne, 1980). Die für die hier vorliegende Arbeit verwendete Nomenklatur ist also an die in *E. coli* beschriebenen Transportsysteme angelehnt. Es handelt sich bei dem *livJ*-Produkt um ein hoch affines Substrat-Bindeprotein, welches Leucin, Valin, Isoleucin und Threonin binden kann (Haney *et al.*, 1992). Bei dem *brnQ*-Produkt handelt es sich um ein Transportsystem der LIVCS-Familie. Das Operon, kodiert durch *livKHMGF*, beinhaltet verschiedene annotierte Komponenten. Dazu zählen das Leucin-spezifische Bindeprotein (*livK*), das hoch affine verzweigt-kettige Aminosäure-Transportsystem Permease-Protein (*livH*), das hoch affine Transportsystem Permease-Protein (*livM*), das hoch affine Transportsystem ATP-Bindeprotein (*livG*) sowie das hoch affine Transportsystem ATP-Bindeprotein (*livF*) (Umbarger, 1987, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass der durch *lrp*-kodierte Leucin

Responsive-Regulatory-Protein (Lrp) in *E. coli* anscheinend einen direkten Einfluss auf die Expression von *livJ* und *livK* ausübt (Haney *et al.*, 1992).

Tabelle: 1

Gen/Operonbezeichnung	Bemerkung
<i>argT</i>	ABC-Transportbindeprotein, Arginin, Lysin, Ornithin Aufnahme
<i>aroP</i>	Aromatische-Aminosäure-Transporter
<i>pheP</i>	Phenylalanin-spezifischer-Transporter
<i>tyrP</i>	Tyrosin-spezifisches-Transportprotein
<i>mtr</i>	Tryptophan-spezifisches-Transportsystem
<i>brnQ</i>	Verzweigtkettige-Aminosäure-Ausnahmesystem
<i>livJ</i>	Verzweigtkettige-Aminosäure-Ausnahmesystem
<i>livKHMGF</i>	Verzweigtkettige-Aminosäure-Ausnahmesystem
<i>cycA</i>	Alanin-, Serin-, Glycin-Transport-Protein
<i>sdaC</i>	Serin-Transport-Protein (putativ)
<i>sstT</i>	Serin-, Threonin-Importer (putativ, Dicarboxylat-Permease)
<i>tdcC</i>	Threonin-, Serin-Permease
<i>glpT</i>	Glycerol-3-Phosphat-Transport-Protein
<i>glpF</i>	Glycerol-Transport-Kanal
<i>dppABCDF</i>	Di-Peptidaufnahmesystem
<i>oppABCDF</i>	Oligo-Peptidaufnahmesystem
<i>ydgR (tppB)</i>	Tripeptid-Transport-Permease
<i>yhiP</i>	Peptidtransporter innere Membran
<i>sapABCDF</i>	Peptid-Transport-System
<i>yejABEF</i>	Putativer ABC-Transporter (Di-/Oligo-peptide)

Das durch *cycA* kodierte Transport-Protein für D-Alanin, D-Serin und Glycin wurde durch Annotierung im *S. Typhimurium* LT2 Genom (McCelland *et al.*, 2001) mit 95 % Übereinstimmung abgeleitet und für diese Arbeit deletiert. Das putative Serin Transport-Protein kodiert durch *sdaC*, konnte ebenfalls durch Annotation im *S. Typhimurium* LT2 Genom nachgewiesen werden (McCelland *et al.*, 2001) und wird unter der Lokusbezeichnung STM2970 geführt. In *E. coli* K12 wird dieser Transporter unter EcoGene: (<http://www.ecogene.org/gene/EG12142>; Stand 02.03.2013), als Serin-Protonen-Symporter-Permease kategorisiert. Ein weiterer putativer Serin- bzw. Threonin-Transporter (*sstT*) wird auch unter der Bezeichnung *ygjU* geführt und mit der Lokusbezeichnung STM3225 im *S.*

Typhimurium LT2 Genom annotiert (McClland *et al.*, 2001). Ein Vergleich mit dem in *E. coli* annotierten Bereich mit der Bezeichnung AAC76124.1 ergab eine Übereinstimmung von 93%. Ein anderer putativer Threonin- / Serin-Transporter wurde ebenfalls deletiert. Kodiert wird dieser durch das Gen *tdcC*, das mit der Lokusbezeichnung STM3243 als Bestandteil eines Operons (*tdcABCDEG*) zu finden ist (McClland *et al.*, 2001).

Des Weiteren wurden Gene deletiert, die sich mit der Glycerol-Aufnahme in Verbindung bringen lassen. Dazu zählen das durch *glpT* kodierte Glycerol-3-Phosphat-Transport-Protein und den durch *glpF* kodierten Glycerol-Transport-Kanal. Dabei ist zu berücksichtigen, das *glpT* (Lokusbezeichnung STM2283) Bestandteil eines Operons (*glpCBATQ*) ist. Der mit der Lokusbezeichnung STM4087 aufgeführte Glycerol-Transport-Kanal (*glpF*) ist Bestandteil einer räumlich eng zusammen liegenden Genstruktur (*glpXKF*), die für die Diffusion von Glycerol verantwortlich gemacht wird (McClland *et al.*, 2001). Grund zur Deletion im Hintergrund der vorliegenden Arbeit waren Beobachtungen, die zuvor mit *glp*-Deletionsmutanten von intrazellulär persistierenden *Listeria monocytogenes* gemacht wurden. Dabei war zu beobachten, dass die Inhibierung der Glycerol-Aufnahme in einer attenuierenden Beeinträchtigung der intrazellulären Replikationsleistung mündete (Joseph *et al.*, 2006, 2008; Eisenreich *et al.*, 2010)

Für die vorliegende Arbeit wurden Mutanten erzeugt, bei denen verschiedene Peptid-Aufnahmesysteme deletiert wurden. Dazu zählen die gut untersuchten Aufnahmesysteme für Opp- (Oligopeptid), Tpp- (Tripeptid) und Dpp-Permeasen (Dipeptid). Jedes dieser Systeme zeigt Substratspezifität, da nur bestimmte Substratkonformationen erkannt werden (Payne & Marshall, 2001). Des Weiteren arbeiten diese Systeme physiologisch überlappend miteinander, da jedes System Di- und Tripeptide transportieren kann. So wird erreicht, dass alle kleinen Peptide im Peptid-Spektrum effektiv transportiert werden können (Payne & Marshall, 2001).

Das durch *dppABCDF* in einem Fünf-Gen-Operon kodierte Di-Peptid-Aufnahmesystem stellt einen typischen ABC-Transporter dar (Payne & Marshall, 2001), der durch ATP-Hydrolyse die Transportfunktion gegen einen Konzentrationsgradienten ausführt. Die Expression von *dppABCDF* in *E. coli* ist abhängig von der Wachstumsphase (Abouhamad & Manson, 1994). Das Dpp-System von *E. coli* ist ein Bindeprotein abhängiges Transportsystem. Das Peptid-Bindeprotein dient auch als Chemorezeptor für Peptid-Chemotaxis (Manson *et al.*, 1986, Hiles *et al.*, 1987)

Die Tripeptide-Permease (Tpp) für diese Arbeit als *ydgR* (*tppB*) bezeichnet, arbeitet wie Dpp spezifisch für Di- und Tripeptide, ist aber genetisch als auch in der Substratspezifität unterschiedlich zu Dpp (Payne & Marshall, 2001). Hoch affin ist es gegenüber hydrophoben

Tripeptiden (Hiles *et al.*, 1987). Es ist in *Salmonella* einer komplexen Regulation unterworfen, die die Expression kontrolliert (Hiles *et al.*, 1987). So wird die Expression des Tpp-Systems unter anaeroben Bedingungen induziert und benötigt die OmpR- und EnvZ-Proteine, welche auch für die Expression und Regulation der Haupt-Porine der äußeren Membran zuständig sind (Jamieson & Higgins, 1984, 1986; Gibson *et al.*, 1987, Hiles *et al.*, 1987)

Die Oligopeptid-Permease (Opp) ist die wohl am besten untersuchte Peptid-Permease (Payne & Marshall, 2001). Es stellt ein Musterbeispiel eines ABC-Transporters dar und ist in einem Fünf-Gen-Operon (*oppABCDF*) organisiert (Payne & Marshall, 2001). Die Regulation des Opp-Systems ist sehr komplex und findet auf verschiedenen Ebenen statt sowie unter der Beteiligung des Leucin-Responsiv-Proteins (Lrp) (Payne & Marshall, 2001; Payne & Smith, 1994). Das System weist eine hohe Affinität für Peptide auf die aus 2-6 Aminosäuren aufgebaut sind (Payne & Marshall, 2001). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Aussage von Payne & Marshall (2001), dass aufgrund von Vorselektion der Peptidgröße durch Porine in der äußeren Membran keine genaue Angabe darüber gemacht werden kann, welche Peptid-Größenlimitierung bei der Passage durch das Opp-System tatsächlich vorliegt, wenn die Substrate exogenen Ursprungs sind. So könnten eventuell Peptide transportiert werden, die wesentlich größer sind, aber durch proteolytische Spaltung innerhalb des periplasmatischen Raums entstanden. Arbeiten, die diese These unterstützen, beruhen auf Filter-Bindungs-Assays mit OppA (Substrat-Bindeprotein), bei denen Peptide bestehend aus bis zu 16 Aminosäuren um die Bindung an OppA mit Tri-Peptiden konkurrierten (Payne & Marshall, 2001). Auch zeigten Untersuchungen, dass das Opp-System bei der Rückführung von Muropeptiden, die bei der Zellwandprotein-Wiederverwertung anfallen, eine essentielle Rolle spielt (Goodell & Higgins, 1987).

Ein anderes aus *E. coli* bekanntes Peptidtransportsystem stellt das *yhiP* oder DtpB-System dar (Harder *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich um ein System, welches anscheinlich Di- und Tripeptide mittels protonenmotorischer Kraft transportiert (Harder *et al.*, 2008).

Das durch *sapABCDF* kodierte System wurde erstmals von Para-Lopez *et al.*, 1993 beschrieben. Die Bezeichnung „sap“ leitet sich von der Beobachtung ab, dass Deletionsmutanten jenes *sapABCDF*-Operon sensitiv gegenüber antimikrobiellen Peptiden wie Protamin und Melittin waren (Para-Lopez *et al.*, 1993, 1994). Das System weist in seinen einzelnen Komponenten Ähnlichkeiten zum Opp-System bzw. zum SpoOK-System von *Bacillus spp.* auf (Para-Lopez *et al.*, 1994). Auch wurde vermutet, dass eine Abhängigkeit von Kalium und anderen sap-Komponenten (SapJ und SapG) besteht (Para-Lopez *et al.*, 1993).

Ein weiteres System, welches untersucht wurde, ist das durch *yeyABEF* kodierte System (Novikova *et al.*, 2007; Eswarappa *et al.*, 2008). Bei diesem stellte sich aber im Verlauf der Arbeiten heraus, dass es aufgrund seiner Funktion einen negativen Einfluss auf

das intrazelluläre Replikationsverhalten ausübte. Grund dafür ist, dass das System eine wichtige Rolle bei der Abwehr antimikrobiell wirkender Peptide spielt (Eswarappa *et al.*, 2008), ähnlich zu dem Sap-System.

5. Intrazelluläre Nährstoffakquirierung

5.1 Nährstoffzugänge intrazellulärer Pathogene

Fakultative bzw. obligate intrazelluläre Pathogene nutzen unterschiedliche Möglichkeiten für die Akquirierung von Nährstoffen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass viele Mechanismen nicht vollständig verstanden bzw. aufgeklärt sind. Nur wenige der intrazellulären Pathogene treten, wie *Shigella flexneri* und *Listeria monocytogenes*, in das Zytoplasma der Wirtszelle über (Cossart & Sansonetti, 2004; Eisenreich *et al.*, 2010). Der Hauptanteil repliziert sich membrangebunden innerhalb von vakuolären Kompartimenten (Eisenreich *et al.*, 2010). Untersuchungen zeigten, dass bakterielle Pathogene, die nicht an eine zytosolische Umgebung adaptiert wurden, unfähig waren, im Wirts-Zytosol-Milieu zu proliferieren (Götz *et al.*, 2001; Slaghuis *et al.*, 2004; Garcia-del Portillo *et al.*, 2008). Dies verdeutlicht, dass das Zytosol nicht unbedingt als nährstoffreiches Kultur-Medium angesehen werden kann, welches das effiziente Wachstum von heterotrophen Bakterien unterstützt (Eisenreich *et al.*, 2010). Vielmehr zeigt es, dass diese komplexe Umgebung spezifische physiologische Adaptationen verlangt, um effizientes bakterielles Wachstum zu ermöglichen (Eisenreich *et al.*, 2010)

Eukaryotische Pathogene wie *Toxoplasma gondii* oder Bakterien wie *Legionella pneumophila* und *Mycobacterium tuberculosis* verbleiben ebenso wie *Salmonella* membrangebunden, verwenden aber unterschiedliche Mechanismen, um an Nährstoffe zu gelangen. So scheint *T. gondii* beispielsweise die Membran seiner Vakuole so zu modifizieren, dass dieses wie ein molekulares Sieb (Schwab *et al.*, 1994) wirkt und Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 1300 und 1900 Dalton passieren lässt (Schwab *et al.*, 1994, Garcia-del Portillo & Finlay, 1995 (b)). Das Pathogen *L. pneumophila* rekrutiert verschiedene Organellen um sein vakuoläres Kompartiment, was letztendlich darin mündet, dass es zu einer räumlich engen Assoziation zum endoplasmatischen Retikulum kommt. (Marra *et al.*, 1992; Berger & Isberg, 1993; Garcia-del Portillo & Finlay, 1995 (b)). Ebenso wurde beschrieben, dass es zu einer Einbettung der vakuolären Kompartimente in enger Assoziation zum rauen endoplasmatischem Retikulum kommt (Abu Kwaik, 1996). Letzteres führte zur Vermutung, dass es dort zu direkten Interaktionen beider Kompartimente kommt und dadurch der Zugang zu Peptiden als Nährstoffquelle gesichert ist. Chlamydien beinhaltende Vakuolen scheinen in direktem Kontakt mit Lysosomen zu stehen, und somit den Bedarf an benötigten Aminosäuren zu decken (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995 (b)).

5.2 Mögliche intrazelluläre Nährstoffzugänge für *Salmonella*

Wie bereits zuvor in Abschnitt 3.1 aufgegriffen, ist *Salmonella* ein fakultativ intrazelluläres Pathogen und kann aufgrund seines heterotrophen Metabolismus sowohl intrazellulär als auch autark von möglichen Wirten dank seiner umfassenden Biosyntheseleistungen problemlos unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch den Abbau von kleinen organischen Verbindungen (Zucker bzw. dessen Derivate sowie Fettsäuren) überleben. Die Fähigkeit, alle Aminosäuren selbst synthetisieren zu können, begünstigt indirekt das endemische Auftreten von *Salmonella*, da das Pathogen auch außerhalb des Wirtes überlebens- und replikationsfähig bleibt. Welche Biosynthesewege bzw. welche Substrate *Salmonella* in Wirtzell-unabhängiger Umgebung nutzt, ist gut erforscht und durch verschiedenste Versuche weitläufig dokumentiert (Lin, 1987, 1996; Nunn, 1987; Clark & Cronan, 1996; Newman & McFall, 1996).

In Bezug auf die Biosyntheseleistung bzw. die genutzten Nährstoffe, die für die intrazelluläre Replikation von *Salmonella* verwendet werden, ist weitaus weniger bekannt (Appelberg, 2006). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass es eine Verbindung zwischen der Virulenz des Pathogens und den genutzten Biosynthesewegen bzw. den Substraten/Nährstoffen gibt (Virgilio & Cordano, 1981; Fields *et al.*, 1986; Leung & Finlay, 1991; Klose & Mekalanos, 1997). Es ist gezeigt worden, dass Glukose bzw. die Glukolyse und ein kompletter Tri-Karbonsäure-Zyklus wichtig sind für die Infektion selbst als auch die intrazelluläre Replikation in Makrophagen (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010). In J774A.1 Murin-Makrophagen oder HeLa humane Epithelzellen fand man heraus, dass Gene, welche für Schlüsselenzyme in der Glykolyse und des Entner-Doudoroff-Wegs kodieren, bezüglich ihrer Expression heraufreguliert wurden (Götz *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu wurden Gene für Enzyme des Zitazyklus reprimiert, was C6-Zucker als Hauptquelle für Kohlenstoff favorisiert (Götz *et al.*, 2010). Auch scheint *Salmonella* über mehrere Möglichkeiten zu verfügen und in Ermangelung von Glukose auf alternative Substrate wie C3-Verbindungen (Acetyl-CoA, Fettsäuren) und C6-Verbindungen zu wechseln (Garcia-del Portillo *et al.*, 2008; Mercado-Lubo, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010). Ebenso scheint die Rolle der sogenannten *Salmonella* induzierten Filamente (Sifs) eine wichtige Rolle zu spielen (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995 (a); Beuzón *et al.*, 2002; Bakowski *et al.*, 2008). Diese sind assoziiert mit lysosomalen-Glykoproteinen, was eine Interaktion mit Lysosomen bzw. Trans-Golgi-Netzwerk nahelegt (Beuzón *et al.*, 2000; Beuzón *et al.*, 2002; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993). Wie bei anderen intrazellulären membrangebundenen Pathogenen ist auch bei *Salmonella* eine räumliche Assoziation zum Zellkern, endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat im schrittweisen Verlauf der Infektion zu beobachten (Abrahams & Hensel 2006; Bakowski *et al.*, 2008). Andere Untersuchungen deuten einen direkten Zugang zu Aminosäuren an (Eisenreich *et al.*, 2010).

Studien mit Purin-, Pyrimidin- und Aminosäure-Biosynthesemutanten und deren beobachteter starker bis mäßiger intrazellulären Attenuation legten nahe, dass für diese Nährstoffe eine Limitierung vorherrscht, die den Phänotyp bedingt (Fields *et al.*, 1986; McFarland *et al.*, 1987; Leung & Finlay, 1991; Eisenreich *et al.*, 2010). Auch wurde darauf aufmerksam gemacht, dass der verwendete Zelltyp bei *in vitro*-Versuchen Einfluss darauf haben könnte, wie sich attenuierte und nicht attenuierte Stämme verhalten (Garcia-del Portillo, 2001). In diesem Zusammenhang wurde auf Unterschiede der Nährstoffverfügbarkeit für *Salmonella* in Karzinomen und „normalen“ Zellen hingewiesen, die möglicherweise für die Proliferation in Karzinom-Zelllinien aber nicht in „normalen“ (Fibroblasten) verantwortlich sind (Garcia-del Portillo, 2001). Interessant sind dazu *in vitro*-Untersuchungen mit non-phagozytierenden Zellen, bei denen stark eingeschränkte bzw. keine intrazelluläre Replikation beobachtet werden konnte (Saarinen *et al.*, 1996, 2002; Martinez-Moya *et al.*, 1998). Auch konnte bei *Salmonella*, isoliert aus infizierten Makrophagen bzw. HeLa humanen Epithelzellen, gezeigt werden, dass ein Großteil der Aminosäure-Biosynthesegene auf intrazellulärer Ebene nicht herauf reguliert wurden. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass ein intrazellulärer Zugang zu freien Aminosäuren besteht (Eriksson *et al.*, 2003; Hautefort *et al.*, 2008)

5.3 Virulenz und Biosyntheseleistung pathogener Bakterien

Nicht alle intrazellulär auftretenden Bakterien sind in der Lage, alle benötigten Aminosäuren aufgrund ihrer evolutionären Adaptation an ihr Wirtsspektrum selbst zu synthetisieren. Einigen Spezies wie z.B. Chlamydien oder Legionellen fehlen sogar entscheidende Biosynthesegene für essentielle Aminosäuren (Mintz *et al.*, 1988; Hatch, 1975; Stephens *et al.*, 1998). Dennoch sind die letzt genannten Vertreter sehr erfolgreiche Pathogene, was in Kombination mit verschiedenen anderen Studien (Jules & Buchrieser, 2007; Saka & Valdivia 2010) zeigt, dass die benötigten Nährstoffe vom Wirt aquiriert werden und dadurch die Proliferation trotz eingeschränkter Biosyntheseleistung auf intrazellulärem Niveau ermöglicht wird. Salmonellen verfügen im Gegensatz dazu über ein breites Biosynthesespektrum, das es dem Pathogen ermöglicht, alle benötigten Aminosäuren selbst zu synthetisieren und dies aus einfachsten Kohlenwasserstoffverbindungen (Lin, 1987, 1996; Nunn, 1987; Clark & Cronan, 1996; Newman & McFall, 1996).

Im Zuge der Jahrzehnte langen Forschung an/mit *Salmonella* wurden verschiedene Mutanten isoliert, von denen man annahm, dass diese aufgrund des Fehlens von essentiellen Biosynthesegenen avirulent sind. Einige dieser Mutanten wiesen Mutationen in essentiellen Aminosäure-Biosynthesewegen auf, waren aber dennoch virulent. Eine interessante Beobachtung diesbezüglich sind beispielsweise verschiedene Isolate von *S. Typhi*, die Auxotrophien für Tryptophan und Glutamin aufweisen (Virgilio & Cordan, 1981).

Ein anderes Serovar ist das bereits unter Abschnitt 3.1.1 erwähnte *S. Typhimurium* SL1344, welches eine Histidin-Auxotrophie aufweist. Der Stamm SL1344 wurde bereits in vielen unterschiedlichen Studien verwendet (Leung & Finlay, 1991; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Miold *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2010; Kroger *et al.*, 2012), was eine Fülle von Informationen bereithält. Dies ist auch ein Grund dafür, warum dieser Stamm als Experimentalorganismus für die vorliegende Promotion herangezogen wurde. Eine weitere äußerst interessante Beobachtung, die mit diesem Stamm gemacht wurde, war, dass Mutanten, bei denen die Biosynthese von Chorismat durch die Deletion des *aroA*-Gens unterbunden wurde, eine scheinbar zuverlässige Avirulenz bzw. Attenuation zu Vakzinierungszwecken hervorrief (Leung & Finlay, 1981). In näherer Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass die Zugabe von *para*-Hydroxybenzoat (PABA) bzw. Dihydroxy-Benzoat (DHB) zur Diät der mit dem betreffenden Δ *aroA*-Stamm vakzinierten Versuchstiere eine erneute vollständige Virulenz generierte. Bemerkenswert hierbei ist, dass Chorismat zwar essentiell nötig für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan ist, diese aber nicht supplementiert wurden und trotzdem der Δ *aroA*-Stamm eine Virulenz ausbildete. Dies ist ein Indiz dafür, dass die benötigten Aminosäuren entweder durch das Futter im Darmtrakt des Wirts selbst oder durch die biosynthetischen Prozesse der Wirtszellen, der unterschiedlichen Organe, die während der systemischen Phase der Infektion intrazellulär vorliegen bzw. bereitgestellt werden.

Zusammengefasst deuten all diese Ergebnisse darauf hin, dass es auf intrazellulärer Ebene Mechanismen gibt, die es auxotrophen Salmonellen ermöglichen, die benötigten Nährstoffe zu aquirieren und somit den Wachstumsnachteil auszugleichen.

6. Relevante Wirtszell Aspekte

6.1 Wirtseigene Erkennung von *Salmonella*

Das angeborene Immunsystem erkennt *Salmonella* im Gewebe durch verschiedene Mechanismen, welche auf eine große Anzahl von Rezeptoren zurückgreifen (Thiennimitr *et al.*, 2011). Ein Mechanismus beispielsweise ermöglicht dem Wirt, sich selbst vom Bakterium zu unterscheiden. Dies beruht auf der Erkennung von konservierten mikrobiellen/pathogenen Strukturen, dem sogenannten „Mikroben/Pathogen assoziierten molekularem Muster“ (*pathogen associated molecular patterns* [PAMPs] (Kumar *et al.*, 2011; Schenten & Medzhitov, 2011). Dies wird durch humorale Proteine des Komplementsystems bzw. durch wirtseigene Rezeptoren wie z.B. Toll-ähnliche Rezeptoren (*Toll-like receptors* [TLRs]) vermittelt (Thiennimitr *et al.*, 2011).

Ein anderer Mechanismus erlaubt dem Wirt eine wesentlich genauere Unterscheidung zwischen nicht- bzw. schwach-pathogenen und aktiv-pathogenen

Mikroorganismen (Vance *et al.*, 2009) durch die Erkennung von Pathogen-induzierten Prozessen (*pathogen induced processes*). Hierbei werden gezielt Proteine bzw. deren assemblierte Strukturen detektiert wie z.B. Typ III Sekretionssysteme oder Effektorproteine. Auch kommen intrazelluläre Sensorsysteme zur Detektion von bakteriellen Zellwandbestandteilen zum Einsatz (Thiennimitr *et al.*, 2011).

6.2 Abwehrmechanismen des Wirts bzw. der Wirtszellen

Salmonella, die durch die Nahrung aufgenommen werden, verfügen über Mechanismen, die helfen, das saure Milieu des Magens zu passieren (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993). Nach der Passage des Magens und vor dem Eindringen in die unter dem intestinalen Mucus befindliche Epithelzellschicht, ist *Salmonella* mit der natürlichen Mikrobiota konfrontiert sowie mit degradierenden Enzymen, antimikrobiellen Peptiden, Gallen-Salze und sekretorischem Immunglobulin A (IgA) (Haraga *et al.*, 2008). Abhängig vom verwendeten Wirtszelltyp konnten für *Salmonella* Serotypen sowohl vakuoläre als auch zytosolische Replikation nachgewiesen werden (Radtke *et al.*, 2007; Thurston *et al.*, 2009). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass der Mechanismus der Autophagie bei der zellulären Verteidigungsantwort auf ins Zytosol übergetretenen *Salmonella* eine Rolle zu spielen scheint (Birmingham & Brumell, 2006; Birmingham *et al.*, 2006).

Salmonella, die membrangebunden in einer/einem „*Salmonella* containing vacuole“ (SCV)/Phagosom verbleiben, werden durch diverse zelluläre Abwehrmechanismen bekämpft. Diese sind, abhängig vom Zelltyp, unterschiedlich stark ausgeprägt. So reagieren Makrophagen aktiv mit verschiedensten Mechanismen auf das eingeschlossene Pathogen. Zum Beispiel durch die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen, die ein umfangreiches Sortiment von Enzymen in das Zielkompartiment entlassen. Dazu zählen u.a. Lipasen, DNase und Proteasen (Haas, 2007). In Bezug auf die Fusion von Lysosomen mit Phagosomen wurde ein Ca^{2+} abhängiger Prozess (Jaconi *et al.*, 1990; Malik *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2004) analysiert, der als Membran-Reparaturmechanismus möglicherweise auch Abwehrfunktionen übernimmt (Reddy *et al.*, 2001). Eine Perforation der SCV durch das von *Salmonella* genutzte T3SSII führt zum Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma der Wirtszelle. Dies aktiviert Synaptotagmin Syt VII, welches als Koordinator für die lysosomale Exocytose angesehen wird (Martinez *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2001), was die Fusion von Lysosomen mit dem Phagosom verstärkt.

Ein anderer Mechanismus ist die Etablierung von vakuolären ATPasen (vATPasen) in der Membran des Phagosoms, um den im Kompartiment herrschenden pH-Wert gezielt zu senken und so das eingeschlossene Pathogen zu schädigen. Reduzierende Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase-Komplexe produzieren große Mengen an Superoxidradikalen aus molekularem Sauerstoff (Haas, 2007). Ebenso werden Nitritoxid

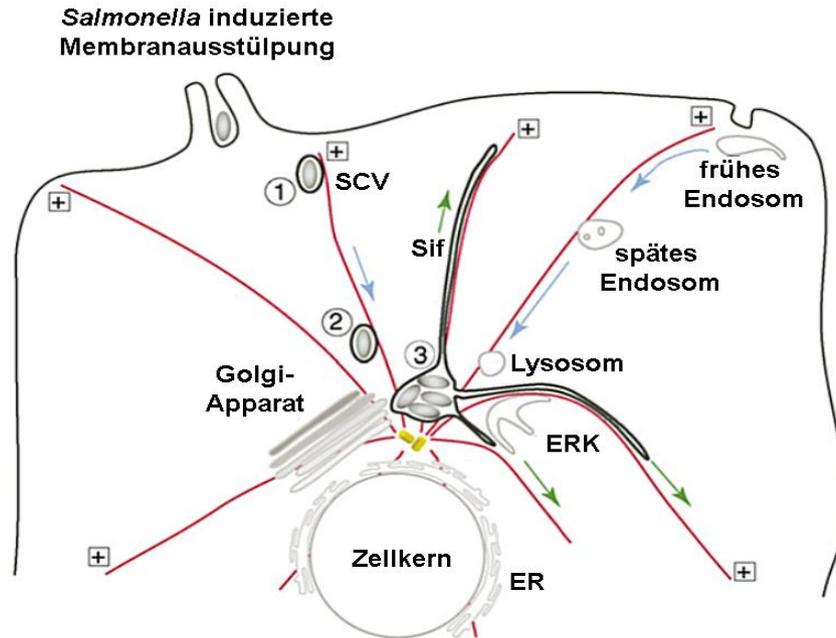
(NO) Radikale durch die Nitritoxid-Synthase generiert, die an der zytosolischen Seite der Vakuole Arginin in Citrulin umformt (Haas, 2007) und in das Pathogen enthaltene Kompartiment entlässt. Ein anderer interessanter Übersichtsartikel bezieht sich auf die Abwehr des eingedrungenen Pathogens über Nährstoffentzug (Appelberg, 2006). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die Nährstoff-Zugänglichkeit, bedingt durch Auxotrophien, entscheidenden Einfluss auf das Replikationsverhalten des intrazellulär membrangebundenen Pathogens hat (Virgilio & Cordano, 1981; Fields *et al.*, 1986; Leung & Finlay, 1991; Klose & Mekalanos, 1997; Appelberg, 2006), was den Schluss nahelegt, dass Wirtszellen (Makrophagen) eventuell über Mechanismen verfügen, um Nährstoffzugänge gezielt zu minimieren. Ein Beispiel dafür sind die in Makrophagen gemachten Beobachtungen mit einer *sifA*-Mutante von *Salmonella*, bei der die Replikation anscheinlich an die Etablierung der durch *Salmonella* induzierten Filamente (Sifs) gekoppelt ist (Beuzon *et al.*, 2000). Eine andere Studie mit *sifA*-Mutanten in intestinalen Epithelzellen (Brummel *et al.*, 2002) zeigt, dass dem Pathogen durch die gezielte Desruption der Vakuolenmembran und dem daraus resultierende Zugang zum Zytosol der Wirtszelle eine deutlich verbesserte Replikationsrate ermöglicht wird. Zusammengenommen deutet dies auf die Wichtigkeit des Zugangs zum endosomalen System der Wirtszelle hin und die damit zur Verfügung stehende Nährstoffversorgung. Es ist aber auch darauf hinzuweisen, dass der verwendete Wirtszelltyp Einfluss auf das „freie“ intrazelluläre Replikationsverhalten hat. So zum Beispiel in Fibroblasten, Makrophagen oder Dentritischen Zellen (Aiastui *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2012; Linehan & Holden, 2003).

Intestinale Epithelzellen reagieren mit einer ganzen Bandbreite an zytoplasmatischen und nukleären Antworten auf das internalisierte Pathogen (Ohl & Miller, 2001). Beispielsweise wurde beschrieben, dass intestinale Epithelzellen, die mit *Salmonella* Enteriditis infiziert wurden, NO-Radikale in erhöhtem Maß produzierten (Saarinen *et al.*, 1996). In näherer Untersuchung wurde aber eine direkte Beteiligung der NO-Radikale an der Eliminierung von *Salmonella* Enteriditis in Henle-407 Zellen in Frage gestellt (Saarinen *et al.*, 2002). Andere Veränderungen betreffen das Zytoskelett, welche durch die Aufnahme des Pathogens induziert wurden. Dabei kommt es zu Veränderungen des Elektronenflusses und der Synthese von proinflammatorischen Cytokinen bzw. Prostaglandinen (Pace *et al.*, 1993; Hobbie *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1998; Ohl & Miller, 2001). Diese Reaktionen können unter Umständen zu der durch *Salmonella* verursachten Gastroenteritis führen. *Salmonella* und eventuell auch andere Pathogene profitieren von einer induzierten Inflammation des mukosalen Gewebes, da die Veränderungen die schützende Mikrobiota im Wachstum benachteiligen und so ein Wachstumsvorteil für das Pathogen entsteht (Stecher *et al.*, 2007, 2008, 2010; Raffatellu *et al.*, 2009; Winter *et al.*, 2010; Kaiser & Hardt, 2011).

6.3 Infektionsmechanismus (intestinale Epithelzellen)

Für *Salmonella* konnten verschiedene Gen-Loci beschrieben werden, die für die Infektion von non-phagozytischen Zellen nötig sind (Finlay *et al.*, 1988; Elsinghorst *et al.*, 1989; Galan & Crutiss, 1989; Lee *et al.*, 1992; Ginocchio *et al.*, 1992; Altmeyer *et al.*, 1993; Saarinen *et al.*, 1996).

Salmonella induziert die eigene Aufnahme in intestinale Epithelzellen durch eine gezielte Injektion von Effektorproteinen. Zu diesen zählen in der ersten Phase der Infektion SipA, SipC, SigD, SopE und SopE2 (Haraga *et al.*, 2008), die einen komplex strukturierten und relativ gut erforschten Mechanismus in Gang setzen, der zur Aufnahme des Pathogens in die Wirtszelle führt. Dieser Mechanismus wird deswegen auch als „Trigger Mechanismus“ (Cossart & Sansonetti, 2004) bezeichnet. Dazu adhäriert *Salmonella* an Mannose- und anderen Kohlenhydratrezeptoren an der Oberfläche (Sharon *et al.*, 1981) der Wirtszelle und bildet eines von zwei Typ III Sekretionssystemen (T3SS) aus (*Salmonella pathogenic island I* (SPI-1), Hueck, 1998; Hensel, 2004; Drecktrah *et al.*, 2007). Dieser molekulare Nadelapparat dient der Injektion der zuvor aufgeführten Effektoren, die unterschiedliche Ziele in der Wirtszelle ansteuern. Die Effektoren SipA und SipC wirken auf die Aktin-Polymerisation und Filamentbildung ein. Die Destabilisierung der Aktin-Anheftung an der Zytoplasmamembran wird durch SigD verursacht. Die Aktivierung der für die u.a. endozytosen Prozesse verantwortlichen GTPasen CDC42 und RAC1 werden durch SopE und SopE2 vorangetrieben. Dies setzt eine Signaltransduktion innerhalb der Zelle in Gang, die dazu führt, dass sich der sogenannte Arp2/3 Komplex bildet (Goley & Welch, 2006), von dem aus die Aktinpolymerisation zur Aufnahme von *Salmonella* organisiert wird (Haraga *et al.*, 2008, Bakowski *et al.*, 2008; Reis & Horn, 2010). Es kommt innerhalb der Wirtszelle zu einer Veränderung der Zytoskelettstruktur im Bereich der Injektionsstelle. Diese auf den Eintrittsbereich beschränkte Aktin-Polymerisation mündet schließlich in der Ausbildung von Membranausstülpungen die in einem macropinozytotischen Prozess zur Aufnahme des Pathogens in die Zelle führt. Das entstandene Makropinosom wird im weiteren Verlauf von *Salmonella* modifiziert (Knodler & Steel-Mortimer, 2003; Rajashekar & Hensel, 2011) und weitläufig als *Salmonella* beinhaltende Vakuole („*Salmonella* containing vacuole“(SCV)) bezeichnet. Die beschriebene Modifizierung wird über ein zweites Typ III Sekretionssystem (SPI-2) vermittelt, mit dem das Pathogen erneut die Membran des Makropinosoms/SCV durchdringt und Effektoren in das Zytoplasma der Wirtszelle entlässt (Rajashekar & Hensel, 2011). Die SCV wird mit Motorproteinen verbunden und entlang des Zytoskeletts in Richtung Zellkern transportiert (vgl. Abb. 9).



▲ Abb. 9: Übersichtsschema der extra-/intrazellulären Infektions-/Replikationsschritte von *Salmonella*: Das Schema vereinfacht den Infektion-/Replikationsablauf innerhalb einer nicht phagozytierenden Wirtszelle. Dargestellt wird der Transport (1) der "Salmonella containing vacuole" (SCV) auf den Zytoskelett und die Eingliederung in das endozytotische System. Die Maturation der SCV wird in den Schritten 2 und 3 dargestellt. Diese beziehen sich auf die Wanderung (2) der SCV in Richtung Zellkern und die Einbettung (3) nahe des Zellkerns mit der Ausbildung von "Salmonella induced filaments" Sif. Das Übersichtsschema zeigt auch die intrazelluläre Prozessierung von Endosomen sowie Zellbestandteile (frühes Endosom, spätes Endosom, Lysosom, ER (endoplasmatisches Retikulum) ERK (endoplasmatisches Recycling Kompartiment). (übernommen und abgewandelt aus Steele-Mortimer, 2008, Copyright Lizenznummer 3037231330965, <http://www.copyright.com/>)

Die SCV gliedert sich in den endozytostischen Weg ein, was auch anhand von verschiedenen Oberflächenmarkern auf der Membran der SCV nachgewiesen werden konnte (Knodler & Steel-Mortimer, 2003; Haraga *et al.*, 2008) (vgl. dazu Abb. 12). In der Nähe des Zellkerns kommt es zur Ausbildung eines Netzwerkes von Zytoskelettbestandteilen (Bakowski *et al.*, 2008), hauptsächlich Aktin und Mikrotubuli, um die SCV und in Abhängigkeit der Wirtszelle auch zur Ausbildung von *Salmonella* induzierten Filamenten (*Salmonella* induced filaments [Sifs]), deren Funktion immer noch kontrovers diskutiert wird (Brumell *et al.*, 2001, Beuzon *et al.*, 2002). *Salmonella* repliziert sich innerhalb der SCV, benötigt dafür aber Zugang zu Nährstoffen wie Glukose, Aminosäuren oder Peptiden. Wie diese Nährstoffe in das vakuoläre Kompartiment von *Salmonella* gelangen, ist jedoch unklar. Es gibt verschiedene Fakten, die es erschweren, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Dazu zählen die Schwierigkeiten, *Salmonella* beinhaltende

Kompartimente (SCV) sauber zu isolieren, bzw. eventuell bestehende Transportsysteme in direkten Zusammenhang mit dem Transport bestimmter Nährstoffe in die SCV zu bringen.

6.4 Aufnahme-, Abbau- und Prozessierungsmechnismen der Wirtszelle

Eukaryotische Zellen weisen in Abhängigkeit vom Zelltyp verschiedene endozytische Prozesse auf (Soldati & Shliwa, 2006; Mayor & Pagano, 2007). Der als Endozytose bezeichnete Prozess dient der Aufnahme verschiedenster Moleküle oder Partikel in die Zelle und vereint verschiedene Aufnahmeformen (Soldati & Shliwa, 2006). Die ablaufenden Prozesse umfassen einen breiten Bereich an regulativen Mechanismen, proteinogenen Maschinerien und weitgefächerten Interaktionen mit den Zytoskelettstrukturen der Zelle. Einerseits werden darüber Nährstoffe aufgenommen, andererseits dient es auch der Informationsverarbeitung und dem Austausch mit der Umwelt.

Zur Vereinfachung des sehr komplexen Themas wird auf die Kategorisierung der Artikelzusammenfassung (Mayor & Pagano, 2007) zurückgegriffen und auf Übersichtsartikel (Gruenberg & Maxfield, 1995; Niles & Malik, 1999; Soldati & Shliwa, 2006; Doherty & McMahon, 2009) verwiesen.

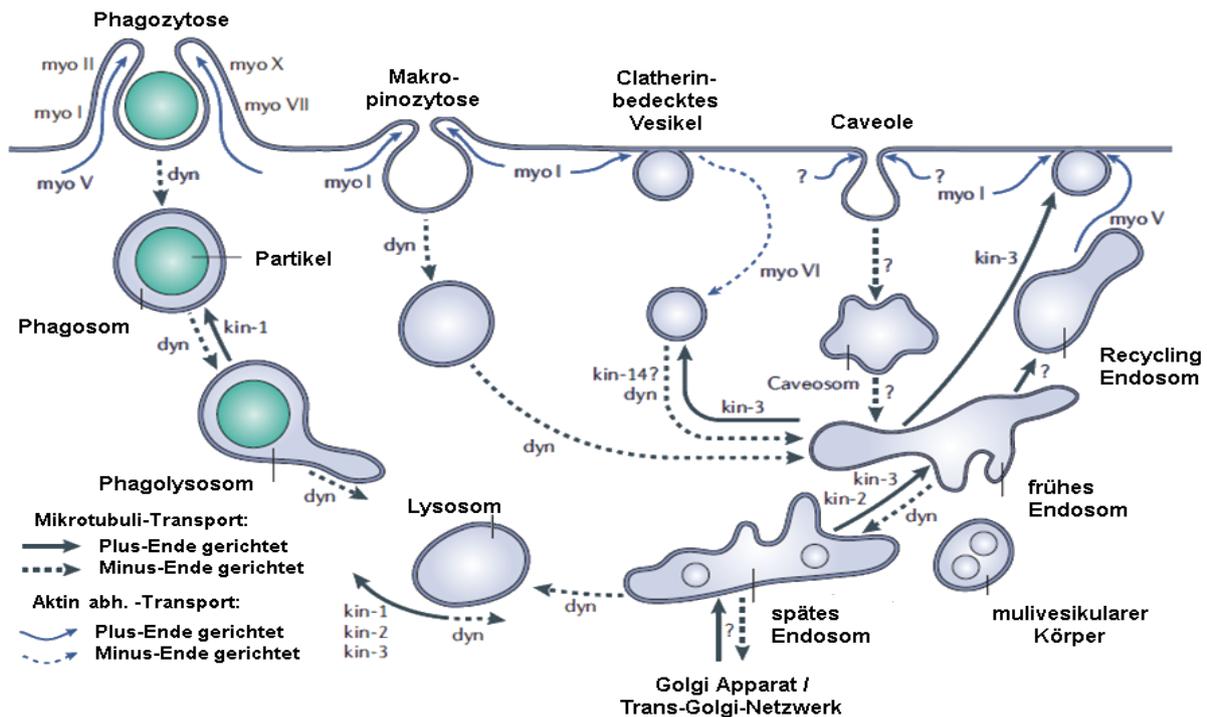
Es werden grundlegend zwei Haupttypen der Endozytose unterschieden: Jene Mechanismen, bei denen die entstehenden Kompartimente nicht mit Clathrin bzw. Caveolin bedeckt sind und jene, die mit diesen abgeschirmt werden (Mayor & Pagano, 2007). Die Erklärung der Prozesse der Clathrin und Calveolin vermittelten Endozytose sind so umfangreich, dass sie hier nur in kurzen Auszügen zum Verständnis beschrieben werden.

Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist eine Form der Pinozytose, also eine Aufnahme von extrazellulären Flüssigkeiten bzw. Stoffen, die auch als rezeptorvermittelt bezeichnet werden kann und bei der die Einstülpung durch Clathrin selbst vorangetrieben wird (Soldati & Shliwa, 2006; Doherty & McMahon, 2009).

Die Calveolin-vermittelte Endozytose stellt ebenfalls eine Form der Pinozytose dar, bei der die Einstülpung durch Calveolin prozessiert wird (Soldati & Shliwa, 2006). Die übrigen Endozytoseformen beinhalten andere Mechnismen und kommen ohne Caveolin bzw. Clathrin aus (Soldati & Shliwa, 2006; Doherty & McMahon, 2009).

Die Clathrin-/Calveolin-unabhängigen endozytotischen Prozesse (für diese Arbeit als Cues-Prozesse bezeichnet) wie die Phagozytose und die Makropinozytose, die für die Aufnahme von großen Stoffmengen bzw. Partikeln verantwortlich sind, kommen auch bei der Internalisation von Bakterien wie z.B. *Salmonella* in Makrophagen bzw. Epithelzellen zum tragen (Swanson, 2008).

Für den Transport der entstandenen vakuolären Kompartimente (Vesikel) werden Interaktionen zwischen verschiedenen Motorproteinen hergestellt, die im Anschluss die Kompartimente entlang des Zytoskeletts in das Zellinnere bzw. in die Zellperipherie tragen. Zu diesen Motorproteinen zählen Dynein (Marsman *et al.*, 2003), Kinesin und verschiedene Typen von Myosin (Soldati & Shliwa, 2006). Dynein ist zusammen mit Myosin VI für den Transport in das Zellinnere verantwortlich, während Kinesin 1, 2, 3 und Myosin I, II, V, VII und X in entgegengesetzter Richtung arbeiten (vgl. Abb. 10).



▲ Abb. 10: Übersichtsschema endozytotische Routen:

Das Schema fasst Erkenntnisse aus Studien an verschiedensten Organismen zusammen, diese reichen von Amöben bis hin zu Tieren. Dargestellt sind Transportrouten auf Aktin-Filamenten (dünne helle Pfeile) und Mikrotubuli (dicke dunkle Pfeile) des endozytotischen Systems bei dem zu transportierende Kompartimente an verschiedene Motorproteine geknüpft werden. Dazu zählen Dynein (dyn), Kinesin (kin-1-3, 14) und Myosin (myo I, II, V, VI, VII, X). Dargestellt werden Phagozytose, Makropinozytose sowie von Clathrin- und Calveolin-abhängige Routen, die auch bidirektional verlaufen können (bidirektional Pfeilrichtung). Additionell wird die intrazelluläre Prozessierung der durch die endozytotischen Prozesse entstandenen Kompartimente (Phagosom mit Partikel, Phagolysosom, Lysosom, Caveosom, frühes Endosom, spätes Endosom, Recycling Endosom und multivesikulärer Körper) schematisch vereinfacht dargestellt. Die durch ein Fragezeichen (?) markierten Routen/Bereiche stellen unzureichende Informationen über die beteiligten Motoproteine/Interaktionen dar. (übernommen und abgeändert aus Soldati & Schliwa, 2006; Copyright Lizenznummer 3037240521437, <http://www.copyright.com/>)

Die Prozesse und Mechanismen, die zur Verteilung innerhalb der Zelle führen, sind äußerst komplex und in allen Einzelheiten bei weitem nicht aufgeklärt, weshalb auf die

Übersichtsartikel von Gruenberg & Maxfield (1995); Niles & Malik (1999); Soldati & Shliwa (2006) und Doherty & McMahon (2009) verwiesen wird. Auch würde eine Zusammenfassung aller relevanten und bekannten Fakten den Umfang dieser Arbeit sprengen, weshalb auf ein Schemata zur stark vereinfachten Darstellung zurückgegriffen wird (vgl. Abb. 10).

Durch Fusionsereignisse mit Kompartimenten, die als frühe Endosomen bezeichnet werden, kommt es zur Maturation. Die Maturation des frühen Endosoms richtet sich nach dem beinhaltenden Stoff oder Partikel und führt über die Reifung des als spätes Endosom bezeichneten Kompartiments hin zum Austausch mit dem Trans-Golgi-Netzwerk, der Fusion mit Lysosomen und dem damit verbundenen enzymatischen Abbau der darin befindlichen Stoffe oder Partikel (Doherty & McMahon, 2009). Die Membran und einige Rezeptorkomponenten werden durch einen Wiederaufbereitungsmechanismus (Membran-Recycling) in die Zytoplasmamembran der Zelle zurückgeführt (vgl. Abb. 10).

Für *Salmonella*, die sich membrangebunden innerhalb von Epithelzellen repliziert, ist die Interaktion des eigenen Kompartiments, der SCV, mit den Bestandteilen des endozytotischen Transports bzw. die Maturation der SCV von entscheidender Bedeutung (Salcedo & Holden, 2003, 2005). Gelingt es *Salmonella* nicht, die Interaktion der SCV mit Endosomen/Lysosomen gezielt zu steuern oder die Transportrichtung zu kontrollieren, kommt es zur Degradierung bzw. dem Unvermögen der Replikation (Marsman *et al.*, 2004; Madan *et al.*, 2011).

Neben den Aufnahmeprozessen die durch endozytotische Prozesse vermittelt werden, greifen die verschiedenen intestinalen Epithelzelltypen auch auf Transportmechanismen zurück, die durch Aminosäure- und Peptidaufnahmesysteme unterhalten werden. Die enzymatische Spaltung von Proteinen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, findet bereits im Magen statt (Erickson, 1995). Dort kommen die Enzyme Pepsin I und II zum tragen und beginnen mit der Hydrolyse des Polypeptid-Rückgrats (Gray, 1986; Alpers, 1987; Van Dyke, 1989; Erickson & Kim, 1990; Erickson, 1995). Die weitere hydrolytische Spaltung findet im Anschluss im Dünndarm statt, wo durch den Pankreas zusätzliche Enzyme bereitgestellt werden (Erickson, 1995). Dazu zählen Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxyidpeptidase A und B (Erickson, 1995). Diese zerlegen die Proteine und großen Polypeptide weiter in eine Mischung aus freien Aminosäuren und Oligopeptiden bestehend aus 2-8 Aminosäuren (Erickson, 1995). Die Hydrolyseprodukte werden anschließend direkt durch Transportsysteme ins Zellinnere transportiert wo sie weiter metabolisiert werden. Hierbei werden zytosolische von membranständigen bzw. mit der sogenannten Bürstensaum-Membran (*brush-border membrane*) assoziierten Peptidasen unterschieden (Adibi & Kim, 1981). Zu diesen membranständigen Peptidasen zählen u.a. Amino-peptidase N, Carboxypeptidase P oder Endopeptidase 24.11 (Bai & Amidon, 1992;

Matthews, 1991). Für vertiefende Informationen zum Themenbereich wird hier auf Williamson & Oxender (1995); Erickson (1995) und Lee (1995) verwiesen.

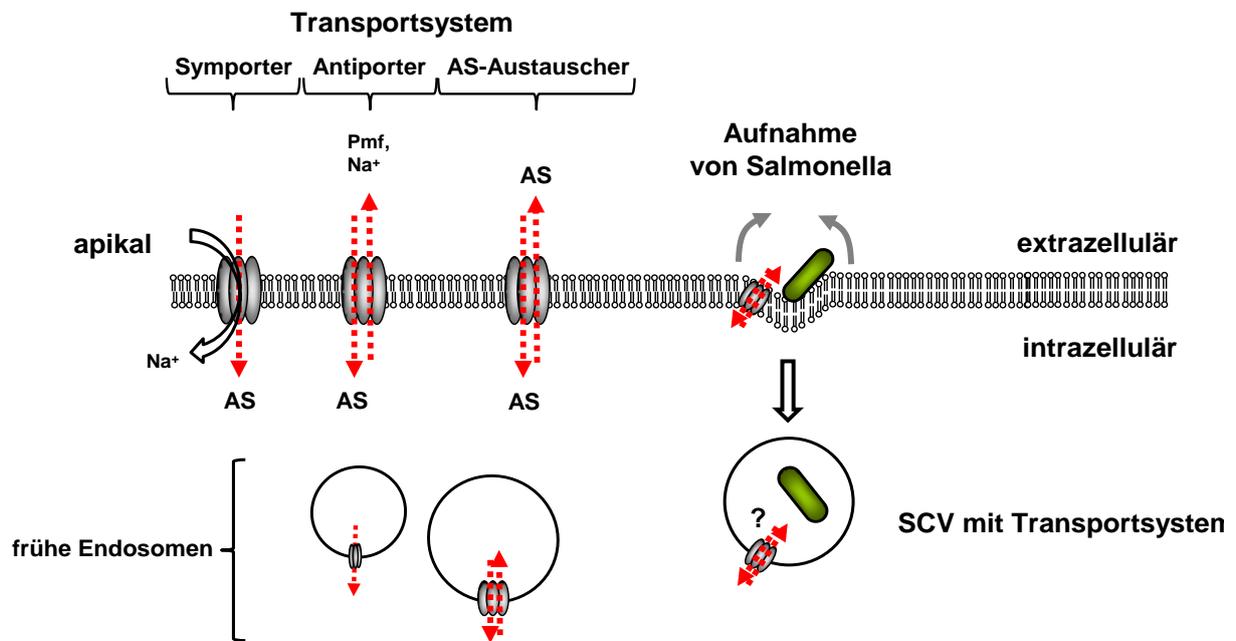
Durch Versuche mit Bürstensaum-Membran Vesikeln (brush-border membrane vesicles) konnte auch gezeigt werden, dass es an der apikalen Membran von intestinalen Bürstensaum-Epithelzellen, isoliert aus Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), Transportsysteme für Oligopeptide gibt (Kramer *et al.*, 1995). Diese weisen auch Transportaktivität für verschiedene oral verabreichte β -Lactam Antibiotika auf (Kramer *et al.*, 1995). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Transportprozess Protonen-abhängig, stereospezifisch und Substrat-spezifisch verläuft (Kramer *et al.*, 1995). Der apikal befindliche PepT1-Transporter stellt ein System dar, das über einen Protonen elektrochemischen Gradienten Di- und Tri-Peptide in das Zellinnere transportiert (Daniel, 2004; Pieri *et al.*, 2010).

6.5 Orientierung von wirtseigener membranständiger Transportsysteme

Für *Salmonella*, die sich membrangebunden innerhalb von Epithelzellen repliziert, ist die Interaktion des eigenen Kompartments, der SCV, mit den Bestandteilen des endozytotischen Transports bzw. die Maturation der SCV von entscheidender Bedeutung (Salcedo & Holden, 2003, 2005). Gelingt es *Salmonella* nicht, die Interaktion der SCV mit Endosomen/Lysosomen gezielt zu steuern oder die Transportrichtung zu kontrollieren, kommt es zur Degradierung bzw. dem Unvermögen der Replikation (Marsman *et al.*, 2004; Madan *et al.*, 2011). Der durch *Salmonella* selbst induzierte makropinozytische Prozess (Garcia-del Portillo & Finlay, 1994, 1995), der zur Aufnahme des Pathogens in die Epithelwirtszelle führt, mündet aufgrund der mitgeführten Zellmembran (SCV) und deren Physiologie dazu, dass vorhandene wirtseigene Transportsysteme wahrscheinlich ihre Orientierung beibehalten. Abhängig von der Art des Transporters würde dies zu einer für *Salmonella* negativ verlaufenden Transportrichtung führen. Verdeutlicht wird dieser Prozess durch die in Abb. 11 dargestellte Schematik eines solchen Vorgangs.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die intestinale Aufnahme von Aminosäuren ein sehr umfassendes Forschungsfeld darstellt und die daran beteiligten Transporter, seien sie apikal oder basal membranpositioniert, über verschiedene Eigenschaften verfügen, die die Komplexität dieser Mechanismen verdeutlichen. Es ist auch zu berücksichtigen, dass es Spezies übergreifende Unterschiede in der Ausprägung/Häufigkeit der Transporter gibt (Broer, 2008). Grundsätzlich kommen Transportsysteme für neutral geladene Aminosäuren, für kationische Aminosäuren und anionische Aminosäuren vor (Broer, 2008). Viele sind nicht nur unidirektional aufgebaut, sondern betreiben bidirektionalen Transport. Dabei werden Aminosäuren mittels einer protonenmotorischen Kraft oder in einem Symport von Kationen ins Zytoplasma transportiert. Beispiele für solche Transporter sind die Systeme A,

B^0 und B^{0+} (Broer, 2008). Eine Besonderheit und etwaig relevant für diese Arbeit bilden b^{0+} -Systeme, die ungeladene Aminosäuren gegen kationische Aminosäuren im Antiportverfahren transportieren (Torras-Llort *et al.*, 2001; Broer, 2008). Diese Systeme transportieren aber nur bestimmte Aminosäuren (Arginin, Lysin, Ornithin und Cystin) (Broer, 2008).



▲ Abb. 11: Übersichtsschema über die Mitführung von Transportsystemen in der SCV-Membran: Dargestellt ist die apikale Membran einer intestinalen Epithelzelle mit etwaig vorhandenen Transportsystemen für Aminosäuren (Symporter, Antiporter, Aminosäure-Austauscher) und einem durch *Salmonella* induzierten Aufnahmeprozess bei dem ein beispielhaftes Transportsystem mitgeführt wird. Die Orientierung des mitgeführten Transportsystems wird nicht verändert, was im Fall von Symportern und Antiportern in einer für *Salmonella* nachteiligen Transportrichtung mündet. Eventuelle Ausnahmen bilden Aminosäure-Austauschsysteme, die aber voraussetzen, dass *Salmonella* bestimmte Aminosäuren in das SCV Lumen sezerniert, um so ein geringes Spektrum an bestimmten Aminosäuren vom Zytosol des Wirtes in die SCV transportieren zu lassen. Na^+ (Natrium-Ion), Pmf (Proton motor force [Protonen motorische Kraft]) (übernommen und abgeändert von Entwurf Dr. Tedin)

Hypothetisch betrachtet bedeutet dies für das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella*, dass bestimmte ungeladene Aminosäuren erst innerhalb der SCV synthetisiert und in das Lumen der SCV sezerniert werden müssen, um die in der SCV-Membran befindlichen $b^{(0,+)}$ Systeme die Aufnahme von bestimmten Aminosäuren aus dem Zytosol durchführen zu lassen. Da nur zwei (Arginin, Lysin) der 20 benötigten Aminosäuren über eine solch hypothetische Versorgungsroute zugänglich sind, stellt sich

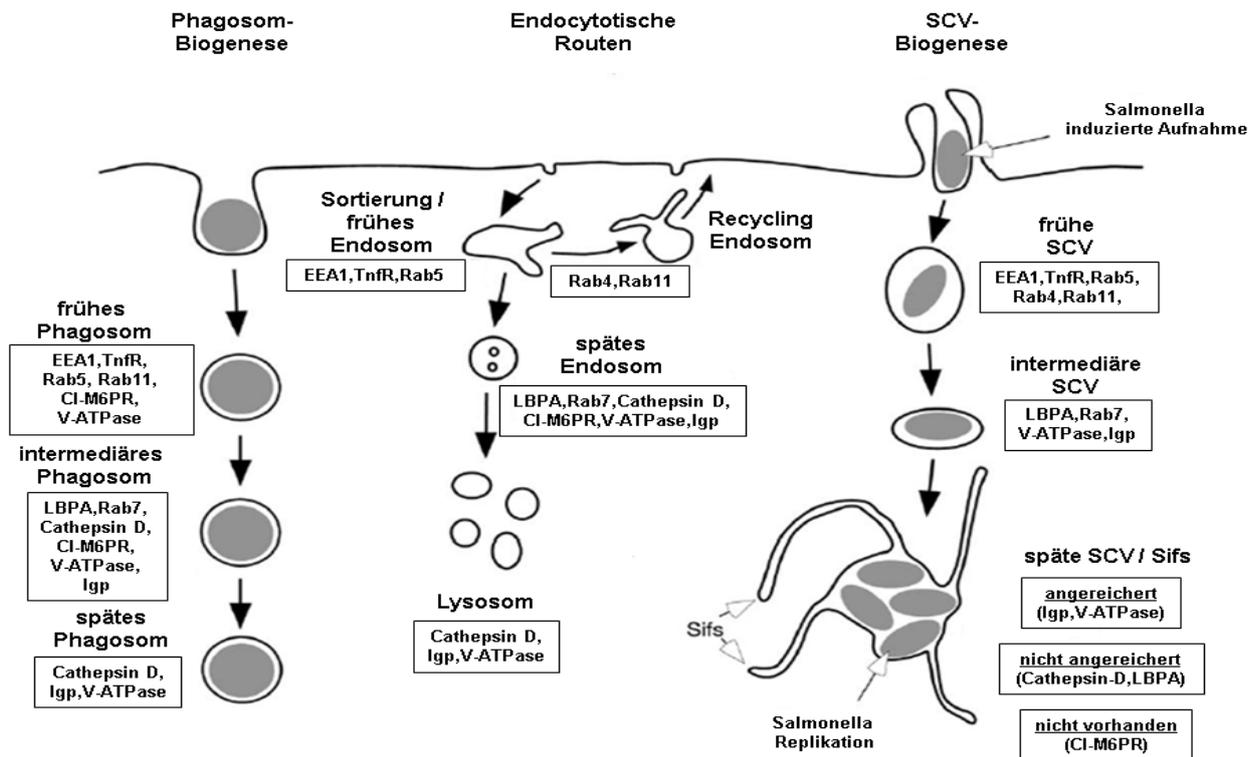
wieder die Frage, wie die übrigen Aminosäuren akquiriert werden bzw. wie Glukose als Ausgangspunkt für die Aminosäure-Synthese in die SCV gelangt. Letztlich können nur gezielte und kontaminationsfreie Isolationsmethoden für *Salmonella* beinhaltende Vakuolen (SCV) Klarheit darüber schaffen, ob und welche Transportsysteme vorhanden sind oder etabliert wurden.

Grundsätzlich bleibt jedoch zu klären, welche Nährstoffe bzw. Nährstoffgruppen intrazellulären *Salmonella* zugänglich sind. Ein Ansatz besteht in der Analyse von Stoffwechselmutanten bzw. deren intrazellulärer Replikationsfähigkeit, um nachvollziehen zu können, an welchen metabolischen Prozessen intrazelluläre Engpässe entstehen, die die Replikationsleistung einschränken.

6.6 SCV-Interaktion mit dem endolysosomalen System

Aus Untersuchungen, die die Unterschiede zwischen der schrittweisen Differenzierung von Phagosomen und Endosomen mit der Maturation der *Salmonella* beinhaltende Vakuole (SCV) verglichen weiß man, dass bestimmte Oberflächenmarker aus beiden endozytotischen Prozessen vorhanden sind. Dazu zählen frühe endosomale Marker wie Rab7, Transferrin Rezeptor (TfnR), früher endosomaler Marker Antigen (EEA1), spät endosomal/lysosomale Marker wie Rab7, lysosomale membranständige Glykoproteine „Igps“ (LAMP1, LAMP2 und LAMP3), vATPasen sowie das am Membran-Recycling beteiligte Rab11 (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995; Steele-Mortimer *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 2000; Gorvel & Méresse, 2001; Holden, 2002; Brumell & Grinstein 2004; Smith *et al.*, 2005; Drecktrah *et al.*, 2006; Kumar & Valdivia, 2009). Auch konnte gezeigt werden, dass bestimmte Marker wie z.B. CI-M6PR (Kation-unabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren) an der Oberfläche der SCV nicht nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 12) (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Garcia-del Portillo & Finlay, 1995). Kation-unabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren sind typische Marker für die Vesikel-Interaktion zwischen Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Lysosom, da sie neu synthetisierte/prozessierte Hydrolasen vom TGN binden und zum Lysosom transportieren (Coutinho *et al.*, 2011). Es gibt aber Indizien dafür, dass die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren nur kurzzeitig an der Lysosomen-Membran verweilen und danach zurückkehren zum Transportvesikelkreislauf (Ghosh *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2006).

Zusammengefasst legen diese Beobachtung nahe, dass es zu gezielten Modulationen bzw. weitflächigen Interaktionen zwischen den endozytotischen Kompartimentsystem und der SCV kommen muss. Einen Überblick über beteiligten Oberflächenmarker gibt Abb. 12.



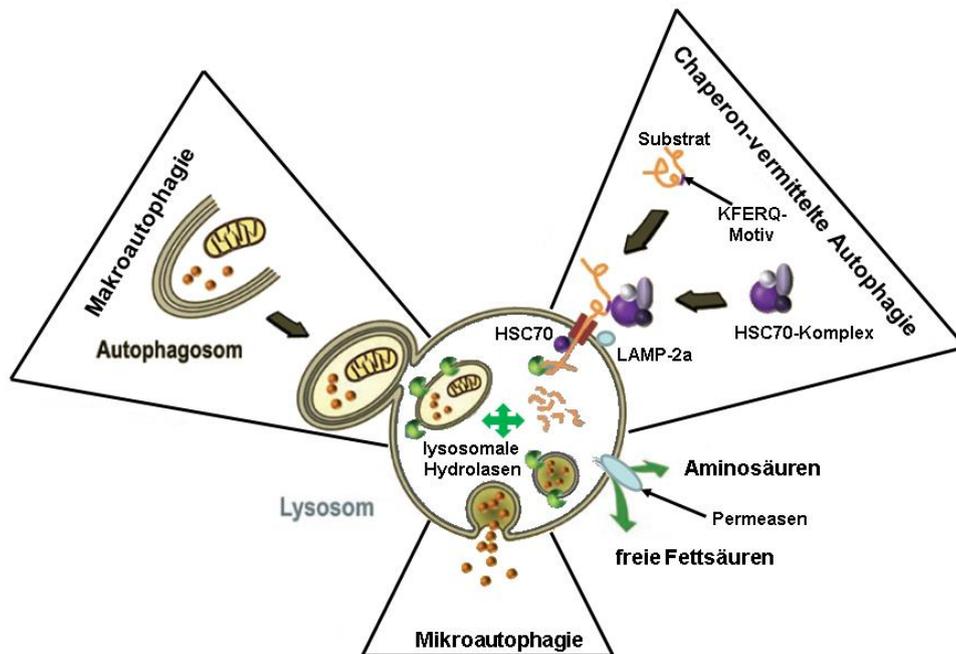
▲ Abb. 12: Übersichtsschema zwischen beteiligten Oberflächenmarker:

Gegenübergestellt werden die Prozesse der Phagozytose (frühes, intermediäres, spätes Phagosom), der Endozytose (frühes, spätes und Recycling Endosom, Lysosom) und der durch *Salmonella* induzierten Macropinozytose mit der danach entstandenen "Salmonella containing vacuole" (frühe, intermediäre, späte SCV), Sifs (*Salmonella* induzierte Filamente) und der an den jeweiligen Prozessen nachgewiesenen und beteiligten Oberflächenmarker: EEA1 (früher endosomaler Marker A1), TnfR (Transferrin-Rezeptor), Rab4, 5, 7, 11 (Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen), CI-M6PR (Cation unabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor), V-ATPase (vakuoläre Protonenpumpe), LBPA (Lysobisphosphat-Säure), Cathepsin-D (saure pH induzierte Peptidase), Igp (lysosomale Glykoproteine). (übernommen und abgeändert aus Drecktrah *et al.*, 2006; Copyright Lizenznummer 3037241049515, <http://www.copyright.com/>)

6.7 Autophagie und Lysosomen

Ein anderer Mechanismus für den intrazellulären Abbau von größeren Proteinkomplexen bzw. Organellen, stellen die Prozesse der Autophagie dar (Wirawan *et al.*, 2011). Im Gegensatz zum Proteasom, dass theoretisch Proteine bis zu einer Größe von rund 70 kDa degradiert (Baumeister *et al.*, 1998), verfügen die Mechanismen der Autophagie über nahezu unbegrenzte Abbau-Kapazitäten (Wirawan *et al.*, 2011). Die Autophagie (vgl. Abb. 13) spielt in allen eukaryotischen Organismen eine wichtige Rolle bei dem Abbau von fehlerhaft arbeitenden Protein und Organellen (Yang & Klionsky, 2009) sowie bei der zellulären

Entwicklung und Differenzierung (Levine & Klionsky 2004; Yang & Klionsky, 2009). Ebenso ist die Autophagie an einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt (Yang & Klionsky, 2009, Huang & Klionsky 2007; Mizushima *et al.*, 2008; Shintani & Klionsky, 2004). Die verschiedenen Autophagieformen stellen permanent neue intrazelluläre Reservoirs an Fettsäuren, Aminosäuren und Nukleotiden bereit, die dem Metabolismus der Zelle durch Permeasen in der Lysosomenmembran wieder dem Zytoplasma zugeführt werden (Yang & Klionsky, 2009).



▲ Abb. 13: Übersichtsschema der Hauptformen der Autophagie:

Dargestellt sind die Mikroautophagie (1), die Makroautophagie (2) und die Chaperon-vermittelte Autophagie (3). Alle Prozesse führen zur hydrolytischen Zerlegung innerhalb des Lysosoms durch die dort vorherrschende Enzymmaschinerie. Mikroautophagie: Aufnahme von kleinen lysosomal nahen zyttoplasmatischen Bestandteilen; Makroautophagie: Aufnahme von großen Peptidkomplexen und Organellen innerhalb einer Doppelmembran; Chaperon-vermittelte Autophagie: über KFERQ-Motiv, HSC70-Komplex und LAMP-2a Protein vermittelte Translokation von entfaltenen Proteinstrukturen aus dem Zytoplasma in das Lumen des Lysosoms. Durch Permeasen in der lysosomalen Membran können Aminosäuren und/oder Fettsäuren dem Zytosol wieder zugänglich gemacht werden. (übernommen und abgeändert aus Wiranwa *et al.*, 2011; Copyright Lizenznummer 3037241376706, <http://www.copyright.com/>)

Es können in grober Unterteilung drei Hauptformen der Autophagie differenziert werden, dazu zählen die Mikroautophagie, die Makroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CvA) (Yang & Klionsky, 2009; Wiranwa *et al.*, 2011) (vgl. Abb. 13). Eine weitere Unterteilung kann hinsichtlich der Selektivität gemacht werden, da sowohl

selektive als auch nicht-selektive Routen unterschieden werden (Yang & Klionsky, 2009; Wiranwa *et al.*, 2011).

Bei der Makro- und Mikroautophagie kommt es zu dynamischen Membran Um- und Aufbauprozessen innerhalb der Zelle. Diese münden in der Umhüllung von zytoplasmatischen Bereichen (Yang & Klionsky, 2009) (vgl. Abb. 13). Mikroautophagie beinhaltet die direkte Umhüllung von Zytoplasma an der Lysosomenoberfläche durch Einstülpung, Abschnürung und Separation. Die gebildeten Vakuolen werden im Lysosom degradiert (Wiranwa *et al.*, 2011) (vgl. Abb. 13). Im Gegensatz dazu werden die durch Makroautophagie gebildeten Autophagosomen durch Bildung einer Doppelmembran innerhalb des Cytoplasmas prozessiert und anschließend Richtung Lysosom navigiert. Dort fusioniert die äußere Membran des Autophagosoms mit der des Lysosoms und entlässt die innere Vakuole des Autophagosoms in das Lumen des Lysosoms (Wiranwa *et al.*, 2011) (vgl. Abb. 13). Dort findet der enzymatische Abbau der kompletten Struktur statt.

Die Chaperon-vermittelte Autophagie (CvA) ist im Gegensatz zu Mikro- und Makroautophagie unabhängig von Membran Um- oder Aufbauprozessen. Die CvA beruht darauf, dass zu degradierende Proteinstrukturen mittels bestimmter Chaperone und Translokatoren innerhalb der Lysosomenmembran in das Lumen des Lysosoms verbracht werden. Die meisten durch CvA degradierten Proteine beinhalten eine KFERQ-Aminosäuresequenz (Dice & Chiang 1989; Dice, 1990; Majeski & Dice, 2004) (vgl. Abb. 13). Diese Sequenz wird durch einen HSC70-Komplex, bestehend aus verschiedenen Chaperonen und Proteinen (hip, hop, hsp40, hsp90 und bag-1), erkannt und gebunden (Dice, 2007). Im Anschluss daran kommt es zur Translokation des entfalteten Proteins in das Lumen des Lysosoms. Als Vermittler zwischen HSC70-Komplex, dem Substratprotein und dem Translokator wird ein Lysosom assoziiertes Membranprotein (LAMP-2a; (auch als LAMP-2 bezeichnet)) angesehen (Dice, 2007). Dies begründet sich auf Untersuchungen, die zeigten, dass Substrat-Proteine von HSC70 mit isolierten Lysosomen gesättigte Bindungen eingingen (Terlecky & Dice, 1993) und dass eine milde Protease-Vorbehandlung der Lysosomen die Bindung unterband (Terlecky & Dice, 1993). Durch die Isolierung und anschließende Bindungsstudien sowie Überexpressionsanalysen (Cuervo & Dice, 1996) und Knock-out Tierversuch (Tanaka *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, dass LAMP-2a (auch als LAMP-2 bezeichnet) in direktem Zusammenhang mit Chaperon-vermittelter Autophagie zu bringen ist (Majeski & Dice, 2004). Interessant in diesem Zusammenhang sind Beobachtungen, die zeigen, dass Lysosom-Membran-assoziierte-Proteine (LAMP-1 und LAMP-2) auch an der Membran der SCV bzw. an den von dieser ausgehenden *Salmonella* induzierten Filamenten (Sifs) nachgewiesen werden konnten (Mills & Finlay, 1994; Roark & Haldar, 2008). Des Weiteren können beide Lysosom-Membran-assoziierte-Proteine als Marker für die SCV verwendet werden (Roark & Haldar, 2008). Auch konnte gezeigt werden,

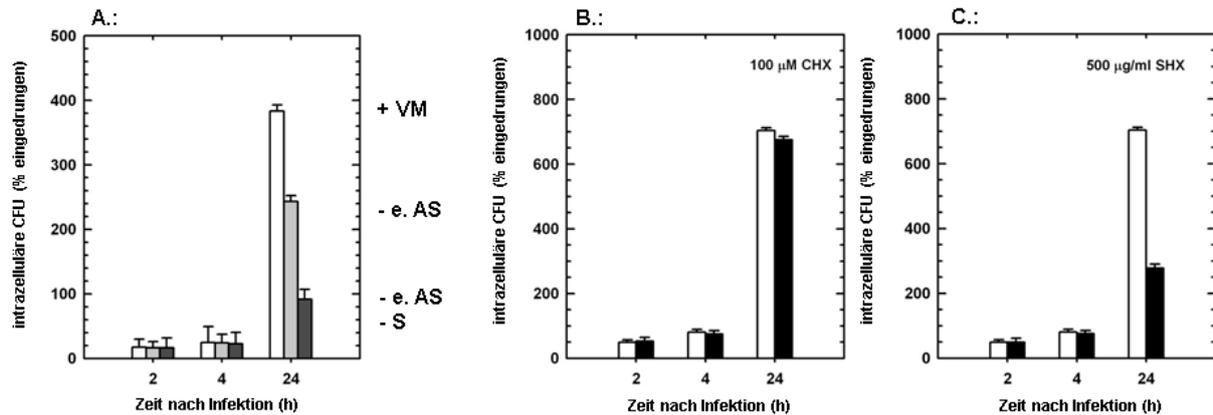
dass die Rekrutierung von LAMP-2 an die SCV-Membran abhängig ist von einem durch *Salmonella* ins Wirtszytosol injizierten Effektors (SifA) (Roark & Haldar, 2008). Andere Studien zeigten, dass beide Proteine (LAMP-1 und LAMP-2) zur Stabilisierung des Lysosoms beitragen indem sie die Lysosomen-Membran gegen hydrolytische Beschädigung abschirmen (Eskelinen *et al.*, 2003; Eskelinen, 2006; Roark & Haldar, 2008). Ermöglicht wird dies durch ihren in das Lumen des Lysosoms ragenden N-terminalen Bereich, der eine hohe Glykosylierung aufweist und dadurch Hydrolasen von der Membran fernhält (Kornfeld & Mellman, 1989; Kundra & Kornfeld, 1999; Eskelinen *et al.*, 2003).

7. Beobachtungen und Aufgabenstellung

Seit Langem bestehen Bemühungen, mittels der Deletion von *aroA*, zuverlässige Vakzinierungsstämme zu generieren (Hoiseth & Stocker, 1981; Stocker *et al.*, 1983; Dougan *et al.*, 1988; Griffin & Barrow, 1993, Tan *et al.*, 1997; Alam *et al.*, 2009).

Wenig Beachtung fand jedoch die bereits von Hoiseth & Stocker (1981) gemachte Beobachtung, dass *Salmonella aroA*-Vakzinierungsstämme durch die Zugabe von *para*-Aminobenzoat (PABA) und 2,3-Dihydroxybenzoat (DHB) zur Diät der mit dem *aroA*-Vakzinierungsstämme infizierten Versuchstiere eine erneute Virulenz des Stammes hervorriefen. Wie bereits in Abschnitt 4.5 beschrieben, dient Chorismat für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren als Vorläufermolekül. Weder PABA noch DHB spielt eine Rolle in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren. Somit sollten die aromatischen Aminosäuren keine Rolle spielen bei der Attenuierung bzw. Avirulenz des *aroA*-Mutanten. Dies bedeutet wiederum, daß aromatische Aminosäure auxotrophe Mutanten von *Salmonella* zumindest für Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin einen Zugang zu den genannten Aminosäuren im Wirt haben mussten.

Um die Auswirkungen des Nährstoffentzugs auf intrazelluläre *S. Typhimurium* untersuchen zu können, wurden in Voruntersuchungen dieser Arbeit humane intestinalen Epithelzellen in unterschiedlichen Nährstoffsupplementierungen kultiviert und diese mit *S. Typhimurium* infiziert. Dabei wurde dem Wachstumsmedium der Zellkultur die Supplementierung mit essentiellen Aminosäuren bzw. mit Serum und essentiellen Aminosäuren vorenthalten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung verdeutlichten, dass intrazelluläre *S. Typhimurium* eine bis zu 70%ige Beeinträchtigung der Replikationsleistung erfuhren (vgl. Abb. 14; A). Aufgrund der Limitierung an Nährstoffen könnte es sich bei dem beobachteten Phänomen um einen sekundären Effekt handeln, der auf ein Konkurrenzverhalten zwischen Wirt und Pathogen zurückzuführen ist. Unter Annahme einer solchen Situation würde der Wirt die zu Verfügung stehenden Nährstoffe für die eigene Proteinsynthese in einem wesentlich stärkeren Maß akquirieren als es das intrazelluläre Pathogen vermag.



▲ Abb. 14: Mediumabhängigkeit von *Salmonella* intrazellulärem Wachstum:

Gezeigt wird in prozentualer Darstellung die intrazelluläre CFU nach der Infektion der Zellkultur mit SL1344 Stamm 2958 in den Zeitabständen von 2, 4 und 24 h post Infektion. In **A.:** ist die intrazelluläre Replikation bei Supplementierung mit Vollmedium mit essentiellen AS und Serum (+VM; weiße Balken), in Medium ohne essentielle AS aber mit Serum (-e. AS; hellgraue Balken) und Medium ohne essentielle AS und ohne Serum (-e. AS, -S; dunkelgraue Balken) gegenübergestellt. Deutlich zu sehen ist der schrittweise Rückgang ~30% (-e. AS) und ~70% (-e. AS, -S) des intrazellulären Wachstums zum Zeitpunkt 24 h post Infektion. In **B.:** ist dem Zellkulturmedium (Vollmedium) post Infektion Cyclohexamid (CHX) [100 µM] zugegeben worden (weiße Balken = unbehandelt; schwarze Balken = behandelt). Wie zu entnehmen ist, bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelter und behandelter Kultur, was die Deutung zulässt, dass die intrazelluläre Replikation von SL1344 nicht an die Peptidbiosynthese des Wirtes gekoppelt ist. In **C.:** ist dem Zellkulturmedium (Vollmedium) post Infektion Serin-Hydroxamat (SHX) [500 µg/ml] zugegeben worden (weiße Balken = unbehandelt; schwarze Balken = behandelt). Wie zu entnehmen ist, bestehen signifikante Unterschiede zwischen unbehandelter und behandelter Kultur (~60% Replikationsreduktion), was die Deutung zulässt, dass SL1344 Zugang zum extrazellulären Milieu des Wirtes hat. (übernommen und abgeändert aus Vorarbeiten von Dr. Tedin)

Um der Frage nachzugehen in wie weit eine Abhängigkeit zur wirtseigenen Proteinsynthese besteht, wurden in weiteren Voruntersuchungen dem Vollmedium der Zellkultur Cyclohexamid (CHX, [100 µM] zugegeben. Cyclohexamid inhibiert die eukaryotische Proteinsynthese durch Ribosomenbindung und Blockierung des Peptid-Elongationsschrittes. Im Falle der Einschränkung der intrazellulären Replikation von *S. Typhimurium* würde dies bedeuten, dass es eine direkte Interaktion mit der Proteinsynthesemaschinerie des Wirtes und somit Ähnlichkeiten zur intrazellulären Nährstoffakquirierung von *L. pneumophila* gibt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten jedoch, dass die Behandlung mit Cyclohexamid keinen Einfluss auf die Replikationsleistung des Pathogens hat und somit unabhängig von der Wirtsproteinsynthese stattfindet (vgl. Abb. 14; B).

Ein anderes Experiment untersuchte den bakteriellen Zugang zu Aminosäuren im Kulturmedium des Wirtes. Dazu wurde ein Analog der Aminosäure Serin (Serin-Hydroxamat, SHX) dem Kulturmedium in einer Konzentration von 500 µg/ml zugegeben. Serin-Hydroxamat inhibiert die Bildung der Seryl-Transfer-Ribonukleinsäure (Seryl-tRNA) durch eigene Bindung an die tRNA. Somit erschöpft sich der Anteil an funktioneller Seryl-tRNA und die bakterielle Proteinsynthese wird unterbunden. Dabei wurde beobachtet, dass es zu einer rund 60%igen Reduktion der intrazellulären Replikationsleistung von *S. Typhimurium* kam (vgl. Abb. 14; C). Dies legt nahe, dass das Pathogen entweder Zugang zum endozytotischen System oder zum Zytoplasma der Wirtszelle hat.

Als prototropher, fakultativ anaerober Mikroorganismus kann *S. Typhimurium* diverse Substrate für den eigenen Stoffwechsel nutzen. Verschiedenste metabolische und katabolische Stoffwechselwege stehen dem Pathogen zur Verfügung und ermöglichen somit die Nutzung eines breiten Substratspektrums (Eisenreich *et al.*, 2010). Trotz der Kenntnis über die umfassende Stoffwechselleistung von *Salmonella* ist nur sehr wenig über die intrazelluläre Nährstoffversorgung des Pathogens bekannt (Appelberg, 2006). Wie in der Einleitung bereits dargestellt wurde, existieren unterschiedlichste Vermutungen zu möglichen Nährstoffquellen (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010; Götz *et al.*, 2010) als auch einer etwaigen Verbindung zwischen Virulenz und Aminosäure-Auxotrophien (Virgilio & Cordano, 1981; Fields *et al.*, 1986; Leung & Finlay, 1991; Klose & Mekalanos, 1997; Appelberg, 2006). Gegen eine Verallgemeinerung einer Verbindung zwischen Virulenz und Aminosäure-Auxotrophien sprechen eine Vielzahl von Untersuchungen, die mit virulenten auxotrophen Stämmen von *Salmonella*, wie SL1344 (Virgilio & Cordano, 1981; O'Callaghan *et al.*, 1988; Leung & Finlay, 1991) oder SL3201 (Duguid *et al.*, 1975; Nevola *et al.*, 1985), gemacht wurden. Diese Untersuchungen zeigten, dass Histidin (Stamm SL1344) bzw. Histidin-, Cystein- und Leucin-Auxotrophien, aber auch Inositol- und Rhamnose-Auxotrophien (Stamm SL3201) nicht zu Avirulenz führen. Weitere Indizien, die eine Verbindung von Auxotrophien und Virulenzmechanismen in Frage stellen, sind Beobachtungen, die an Isolaten von *S. Typhi* gemacht wurden. Dabei wurde gezeigt, dass viele Isolate Auxotrophien für Glutamin und/oder Tryptophan aufweisen (Virgilio & Cordano, 1981; Klose & Mekalanos, 1997; Appelberg, 2006). Auch zeigen andere intrazelluläre Pathogene wie *Legionella pneumophilla* oder *Chlamydia* spp, dass diese trotz des Fehlens von ganzen Aminosäure-Biosynthesewegen noch virulent sind (Mintz *et al.*, 1988; Hatch, 1975; Stephens *et al.*, 1998; Jules & Buchrieser, 2007; Saka & Valdivia 2010).

Durch die gezielte Störung der Aminosäure-Biosynthese bzw. von Aufnahmeprozessen, vermittelt durch Deletionen in relevanten Gen- und Operonstrukturen sollte untersucht werden, ob *S. Typhimurium* SL1344 Derivate in der intrazellulären Nische (SCV) Zugang zu Aminosäuren haben, die entweder als freie Aminosäuren und/oder in

Peptidform vorliegen. Vermutet wurden in diesem Zusammenhang auch Faktoren, die eine Nährstoffaufnahme in die SCV vermitteln (Leung & Finlay, 1991).

Grundsätzlich eignen sich für das Studium intrazellulärer Nährstoffvorkommen gezielt erzeugte Auxotrophien durch Manipulation an den verschiedenen Aminosäure-Biosynthesewegen. Der Fokus auf die verschiedenen Biosynthesewege ergibt sich aus folgenden Gründen. Aminosäuren wie Serin, Glycin oder Threonin spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese von Methylgruppen, die ihrerseits wieder essentielle Funktionen bei der Nucleosid- bzw. Nucleotidsynthese einnehmen. Andere Aminosäuren wie Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin, die aus dem Tri-Carbonsäure Zyklus gespeist werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Produktion von Stickstoff für einen Großteil der bakteriellen Makromoleküle. Dabei wären die Amidogruppe des Glutamins, die Aminogruppe des Glutamats oder Ammoniak selbst zu nennen. Auch ist bei der Spaltung von Glycin durch das GCV-System die Freisetzung von Ammoniak zu verzeichnen (Stauffer, 1987). Die Aminogruppe des Glutamats fließt hauptsächlich in andere Aminosäuren, die des Glutamins wird für die Synthese von Purinen, Pyrimidinen, NAD, PABA, Histidin, Tryptophan und Asparagin genutzt. Ein anderer Punkt, warum Aminosäure-Biosynthesewege indirekt Rückschlüsse auf das intrazelluläre Wachstum des Pathogen zulassen, ist, dass Aminosäuren indirekt verantwortlich für die Regulation der Replikationsraten sind, da deren Konzentration die Beladung der tRNAs bestimmt. Dies bedeutet, dass das Verhältnis von beladenen zu unbeladenen tRNAs somit die basale intrazelluläre Konzentration des Signalmoleküls Guanosin-Tetraphosphat (ppGpp) beeinflusst, was wiederum die Menge bzw. die Synthese von ribosomaler RNA und tRNA reguliert (Pizzaro-Cerdá & Tedin, 2004; Thompson *et al.*, 2006 (a); Jain *et al.*, 2006; Potrykus & Cashel, 2008). Ein weiterer Punkt, der Aminosäure-Biosynthesewege interessant macht, ist, dass nach wie vor in verschiedenen aktuellen Publikationen die Behauptung Einzug findet, dass Aminosäure-Auxotrophien Attenuationen hervorrufen, die für die Generierung von Vaccinierungs-Stämmen eingesetzt werden könnten (Eisenreich *et al.*, 2010).

Mittels der hier vorliegenden Untersuchung sollte die Rolle verschiedener Aminosäure-Biosynthesewege sowie des Peptidmetabolismus bei der intrazellulären Replikation von *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serovar Typhimurium in humanen intestinalen Epithelzellen (LoVo) analysiert werden. Durch gezielte Deletion essentieller bakterieller Gene der verschiedenen Aminosäure-Biosynthesewege wurden Rückschlüsse auf die Verfügbarkeit von Aminosäuren, intrazellulär und indirekt, mittels Invasions- / Replikations-Assays gezogen. Der intrazelluläre Peptidmetabolismus wurde durch die Deletions-Kombination von Genen sowohl in den Aminosäure-Biosynthesewegen als auch der relevanten Aufnahmesysteme für freie Aminosäuren analysiert.

Die Zusammenfassung aller gesammelten Daten ergab einen wesentlich genaueren Überblick darüber, welche Aminosäuren innerhalb der SCV vorhanden sind bzw. erbrachte weitere Indizien dafür, dass ein Zugang zu Peptiden besteht. Die intrazelluläre Zugänglichkeit von *S. Typhimurium* auf wirtseigene Peptide (endozytotisch / zytosolisch) wurde durch die Zugabe von artifiziellen Peptiden zum Kulturmedium der infizierten Wirtszellen untersucht.

8. Materialien und Methoden

8.1 Materialien

8.1.1 Mutagenese und Testoligonukleotidprimer

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer, die für die Mutagenisierung sowie für die Überprüfung der erzeugten Mutanten Anwendung fanden, werden tabellarisch und nach Soffwechsel bezogen geordnet / zusammengefasst und aufgrund des Umfangs separat im Anhang unter 14.3 in Tabelle 14 dieser Arbeit aufgeführt.

8.1.2 Plasmide

Tab.2: In dieser Arbeit verwendete und erzeugte Plasmide.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pKD4	pANTS _γ , <i>kan</i> FRT-flankiert, Kan ^r , Cam ^r	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	hitzeinduzierbare FLP-Synthese (Amp) ^r	Cherepanov & Wackernagel, 1995
pKD46	pINT-ts, <i>araC</i> , <i>bla</i> , <i>oriR101</i> , <i>repA101(ts)</i> , <i>λ red</i> Rekombinase (<i>gam</i> ⁺ , <i>bet</i> ⁺ , <i>exo</i> ⁺), (amp) ^r	Datsenko & Wanner, 2000
pWSK29	Amp ^r , pSC101- <i>ori</i>	Wang & Kushner, 1991
pWSJFaroP1	Amp ^r , pSC101- <i>ori</i> , <i>aroA</i> ⁺	Diese Arbeit
pET45	HisTag (N-terminal), (Amp) ^r , Peptid-Überexpression durch T7- Expressionssystem	Novagen™

Abkürzungen: Amp^r, Ampicillin-resistenz; Cam^r, Chloramphenicol-resistenz;

Die Verifizierung der für diese Arbeit erzeugten Plasmide wurde mittels Testrestriktionen als auch Sequenzierung durchgeführt.

8.1.3 Bakterienstämme

Wegen des Umfangs der Bakterienstammliste wird hier auf Tabelle 15 im Anhang unter 13.4 verwiesen.

8.1.4 Zelllinie

LoVo

Die Zelllinie mit der Bezeichnung LoVo wurde ursprünglich aus einem Adenokarzinom des Kolons isoliert (Drewinko *et al.*, 1976). Als Kolonzelllinie aus dem Darmepithel wird sie bei der ATCC-Datenbank mit der Nummer CCL-229 geführt, wo auch weiterführende Referenzen und Charakteristika zu finden sind.

8.2 Chemikalien

8.2.1 Chemikalien/Enzyme

Die verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen: Carl-Roth GmbH, 76185 Karlsruhe; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim; Merck, 64271 Darmstadt, SERVA Feinchemica, 17524 Heidelberg/NewYork; BiochromAG, 612247 Berlin; PAN-Biotech GmbH, 94501 Aidenbach; PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching Austria. Die verwendeten Enzyme stammten von der Firma Promega Corporation (USA) und Invitrogen, Karlsruhe.

8.2.2 Generelle Stock-Lösungen

Tab.3: Konzentrationsübersicht verwendeter Stock-Lösungen:

Chemikalie	End-Konz.	Bemerkung
NaOAc	3,0 M	pH 4-5
MgSO ₄	1,0 M	autoklaviert
CaCl ₂	0,5 M	steril filtriert
EDTA	0,5 M	autoklaviert
EGTA	0,2 M	steril filtriert
Glukose	1,0 M	steril filtriert
TRIS-HCl	1,0 M	pH 7
SDS	10%-20%	steril filtriert
NaOH	5,0 M	-
Glycerin	80%	autoklaviert
PBS 10 fach	1 fach	autoklaviert

(Alle Lösungen wurden, wenn nicht anderes angegeben, in destilliertem/deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt.)

Fest- / Flüssig-Medien

8.3.1 undefinierte/semidefinierte Medien

Alle *Escherichia coli* bzw. *S. Typhimurium* Stämme wurden, wenn nicht anderes angegeben, in L-Broth–Flüssigmedium (LB: 10 g/l Tryptophan; 5 g/l NaCl; 5g/l Hefeextrakt; Lennox, 1955) oder auf LB-Agar-Platten -1,5 % (w/v) Agar-Agar kultiviert.

8.3.1.1 P22-Infektion/Lysogenie Unterscheidung

Für die Unterscheidung von transduzierten *S. Typhimurium* mit P22-Phagen, die anstelle von Phagen-DNA Wirts-DNA (Pseudolysogenie) transduziert haben, fand eine Unterscheidung auf sogenannten „Green Plates“ statt. Infizierte bzw. lysogene Bakterien werden dadurch unterschieden, dass infizierte Kolonien sich durch Absterben von infizierten Bakterien bzw. deren Lyse und der damit verbundenen Ansäuerung des umgebenden Mediums dunkelblau verfärben. Transfektanten erscheinen dagegen hellgrün auf dem umgebenden Wachstumsmedium. Das Medium wurde wie folgt angesetzt: Für das Medium wurden 8 g/l Tryptophan; 10 g/l NaCl; 5g/l Hefeextrakt mit 15g/l Agar-Agar in ddH₂O gemischt und autoklaviert. Danach wurden zum heißen Medium 0,625g/l Alizarin yellow GG; 0,067g/l Aniline blue (Wasserblau) und 16,8 ml einer 40% sterilen Glukose-Lsg. hinzugegeben und durchmischt. Im Anschluss wurden die Platten gegossen.

8.3.2 Definierte Medien

Bei der Anzucht bzw. Überprüfung auxotropher Stoffwechsellmutanten von *S. Typhimurium* wurde M9-Minimalmedium (Davis *et al.*, 1980) verwendet. Die M9-Salz-Lösung (vgl. Tab. 4) als auch die in Tabelle 5 aufgeführten Komponenten wurden steril filtiert.

M9-Minimalmedium wurde in Flüssig- oder in Festmedium (1,5% Agar-Agar-Platten) für die Kultivierung eingesetzt. Dazu wurde 445 ml ddH₂O mit 7,5 g Agar-Agar versetzt und autoklaviert und anschließend auf 50°C abgekühlt. Danach wurde die in Tabelle 5 aufgeführte 10-fach konzentrierte M9-Salz-Lösung anteilig mit den in Tabelle 5 aufgeführten Komponenten dazugegeben.

Tab.4: Komponenten für definiertes M9-Minimalmedium

Chemikalie/Komponente	Menge	End-Konz.
Na ₂ HPO ₄	70,0 g	42,0 mM
KH ₂ PO ₄	30,0 g	22,0 mM
NaCl	5,0 g	9,0 mM
NH ₄ Cl	10,0 g	19,0 mM
ddH ₂ O	ad 1 L	

Tab.5: Komponenten für definiertes M9-Minimalmedium

Komponente	Stock-Konz.	End-Konz.
M9-Salz-Lösung	10-fach	1-fach
Glukose	40%	0,2 %
MgSO ₄	1 M	1 mM
Ca ²⁺ -Panthothensäure	1 mg/ml	2µg/ml
Thiamin	1 mg/ml	2µg/ml
CaCl ₂	0,5 M	0,1 mM

8.3.2.1 Definierte Medien Zusätze

8.3.2.2 *para*-Aminobenzoat

Für Wachstumsversuche wurde *para*-Aminobenzoat (PABA) in einer 1 mg/ml ddH₂O Lösung hergestellt, aus der nach erfolgter Sterilfiltration Endkonzentrationen von 10 µg/ml eingestellt wurden. Lösungen wurden gekühlt (4°C) und unter Lichtabschluss gehalten.

8.3.2.3 Aminosäure-, Purin- und Pyrimidin- und Peptidlösungen

Alle Lösungen, mit Ausnahme der Peptid-Lösungen, wurden in ddH₂O angesetzt und sterilfiltriert (vgl. Tab. 6). Die Cystein-Lsg. wurde stets frisch angesetzt, die L-Glutamat-Lsg. wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Desweiteren wurden die Phenylalanin-Lösung in 1 mM NaOH und die Tyrosin-Lsg. in 10 mM NaOH angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Die restlichen Aminosäure-Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Alle Aminosäure-Lösungen (vgl. Tab. 6) wurden durch die Zugabe von 100 µl Chloroform steril gehalten. Die Adenosinlösung wurde in 30 mM HCl, die Uracillsg. desweiteren in 100 mM KOH angesetzt. Hier erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss. Die Peptid-Lösungen wurden in definiertem Medium angesetzt. Unter Selektionsbedingungen wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen verwendet.

Tab.6: Verwendete Aminosäuren, Purine/Pyrimidine und Peptide und Antibiotika

Aminosäure	Stock-Konz. [mg/ml]	End-Konz. [µg/ml]	Aminosäure	Stock-Konz. [mg/ml]	End-Konz. [µg/ml]
D-Alanin (Roth, 2793151)	10	50	L-Leucin (Roth, 04037558)	10	50
L-Arginin (Reanal, 87040638)	10	50	L-Lysin (Reanal, 82051320)	10	50
L-Asparagin (Merck, K27903565)	10	50	L-Methionin (Roth, 20939655)	10	50
L-Aspartat (Reanal, 7008626)	50	500	L-Phenylalanin (Reanal, 7504272)	10	50
L-Cystein (Merck, 30663239)	4	40	L-Prolin (Merck, K15412034730)	10	50
L-Glutamat (Serva, 23097)	50	500	L-Serin (Roth, 03042275)	10	50
L-Glutamin (Reanal, 7005067)	10	50	L-Threonin (Roth, 3591689)	10	50
L-Glycin	10	50	L-Tryptophan (Roth, 23149659)	2	20
L-Histidin (Roth, 41934245)	10	50	L-Tyrosin (Merck, 3680762)	2	20
L-Isoleucin (Roth, 50941688)	10	50	L-Valin (Roth, 50940255)	10	50
Purine/Pyrimidine			Stock-Konz. [mg/ml]	End-Konz. [µg/ml]	
Adenin/Adenosin (SIGMA, 091K15445)			2	20	
Cytosin (SIGMA, 052K1590)			5	50	
Guanin/Guanosin (SIGMA, 033K5008)			2	20	
Thymin/Thyminidin (SIGMA, 080M0191V)			5	50	
Uracil (SIGMA, 032K3443)			4	40	
Peptid		Stock	End-Konz. [mg/ml]		
Tri-Valin (GenScript USA Inc.)		lyophilisiert 12 mg Peptid (90-95% Reinheit)	1,5		
Antibiotika		Stock-Konz.[mg/ml]	End-Konz. [µg/ml]		
Kanamycin (Roth)		10	50		
Carbenicillin (Roth)		10	100		
Penicillin (PAA)		100	100		
Gentamycin (BioChrom AG)		10	10 & 50		
Neomycin/G418 (BioChrom AG)		50	250 & 500		

8.3.3 eukaryotisches Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der humanen intestinalen Epithelzelllinie LoVo`s wurde DMEM/Hams F-12 (1:1) (BioChrom AG) mit 10% fötalem Kälber Serum (FKS) verwendet. Für Versuche mit Tri-Valin-Peptid (GenScript) wurde IMDM mit stabilem Glutamin verwendet. Darin wurde 10% FKS und 1-fach konzentrierte nicht essentielle Aminosäurelösung (PAN) eingestellt. Anschließend wurden dem Medium die in Tabelle 7 aufgeführten sterilen Aminosäurelösungen zugegeben und das Endvolumen mit IMDM Medium eingestellt. Die Aminosäuren Valin und Isoleucin wurden dem Medium bewusst nicht zugegeben, da sie sonst aufgrund ihrer Funktion für das regulatorische System, welches für den Versuch genutzt wurde, die Ergebnisse verfälscht hätten.

Tab.7: Verwendete Aminosäuren Stock-Lösungen:

Aminosäure	Stock-Konz.	End-Konz.
Arginin	20 mg/ml	0,15 mg / 50 ml
Cystein	10 mg/ml	0,02 mg / 50 ml
Glycin	10 mg/ml	0,02 mg / 50 ml
Histidin	10 mg/ml	0,03 mg / 50 ml
Leucin	20 mg/ml	0,06 mg / 50 ml
Lysin	20 mg/ml	0,17 mg / 50 ml
Methionin	20 mg/ml	0,02 mg / 50 ml
Phenylalanin	10 mg/ml	0,03 mg / 50 ml
Threonin	20 mg/ml	0,05 mg / 50 ml
Tryptophan	10 mg/ml	0,01 mg / 50 ml
Tyrosin	2 mg/ml	0,04 mg / 50 ml

8.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab.8: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Materialien	Beschreibung/Herkunft
Absauger	Vacuboy, neolab, Heidelberg
Absaugpumpe	N735 AN18, KNF Neuberger, Freiburg
Agarosegelelektrophoresekammer	B1A und GE-B2, AGS, Heidelberg
Analysenwaage	BP210S, Sartorius, Göttingen
Autoklav	GTA 16, Gössner, Hamburg
Blotkammer	Mini Trans Blot, Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	EasyjecT Prima, peqLab, Erlangen
Elektrophoresekammer	AGS GE-B2, AGS B1A
Elektroporationsküvetten	2 mm, peqLab, Erlangen
Feinwaage	Sartorius BP 210S-OCE, Göttingen
Fluorometer	Synergy HT, BioTek, Bad Friedrichshall

Tab.8: (Fortführung Tab. 8) Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Materialien	Beschreibung/Herkunft
Geldokumentation	UV-Transilluminator, UVT 28 MP, Kamera E.A.S.Y. 429 K, Dokumentationssystem RM6, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Gel Dokumentationssystem	Herodoc plus CCD-Kamera E.A.S.Y. B-768-1U5N, Transilluminator UVT 28 ME-HC, Touch-Screen Monitor, E.A.S.Y. Win32 Software, Dongle, Drucker Mitsubishi P-95 DE, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Grobwaage	BL3100, Sartorius, Göttingen
Inkubationsschränke	CB150, Binder, Tuttlingen VT 5042 EK/N2, Heraeus, Hanau
Koloniezählgerät	Novodirect, Kehl/Rhein
Kompaktwaage	EW 47 2000g, A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Magnetrührer	IKAMAG RET, Theodor Karow, Berlin
Mikrowelle	LG, Berlin
Multilochplatten	12-, 24- und 96-Loch-Zellkulturplatten CellBIND, Corning, Schiphol- Rijk, Niederlande
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Peqlab, Erlangen
Netzgerät Elektrophorese	PS 250, Hybaid, Lexington, USA
Photometer	Ultraspec 3000 pro, UV -Spektrometer Amersham pharmacia (GE health care), München
Puls-Feld-Gel-Elektrophorese	Steuergerät, Chiller, Pumpe, Kammer, Giesrahmen, BioRad, München
Pipettierhilfe	Pipetus-akku, Hirschmann, Eberstadt
Reinstwassersystem	Millipore Simplicity, Millipore GmbH, Schwalbach
Schüttelinkubator	GFL3031, GFL, Burgwedel
SDS-Page-Apparatur	Amersham, Freiburg
serologische Pipetten	10 ml, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Sterilfilter	Rotilabo-Spritzenfilter (Porengröße: 0,22 µm bzw. 0,45 µm) Roth, Karlsruhe
Spektrophotometer	Ultraspec 3000 pro, Amersham, Freiburg
Speed Vac / Vacuum-Conzentration	Saur Ba-VC -300H, Kühlfalle, Edwards Vakuumpumpe H.Saur Laborbedarf, Reutlingen
Thermoblock	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Vortexer	Gene 2, neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Wasserbäder	Grant OLS 200, CLF Laborgeräte, Burgwedel, GLF 1001, Th Karow

Tab.8: (Fortführung Tab. 8) Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Materialien	Beschreibung/Herkunft
Werkbank	LaminAir HB 2448 und LB-48-C, Heraeus, Hanau; Wippe Roto-Shake Genie, Scientific Industrys, Bohemia, USA
Zellkulturflaschen	Schräghalsflaschen mit Belüftungskappe 25 cm ² - und 75 cm ²) Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Zentrifugen	Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen 3K30, Sigma Laborzentrifugen, Osterode 5415D, Eppendorf Zentrifugen, Engelsdorf

8.5 Methoden

8.5.1 Bakterielle Wachstumsbedingungen

Je nach Zielsetzung des Experiments wurden die Temperaturen von 28°C, 32°C und 37°C für die Kultivierung unter aeroben Bedingungen gewählt. In Flüssigmedium wurde bei 28°C bzw. 37°C und 200 rpm Schüttelagitation inkubiert.

8.5.2 Wachstumsbedingungen für eukaryotische Zellkultur

Zur Kultivierung wurden Zellkulturflaschen (Corning) (25 cm² bzw. 75 cm²) als auch 12, 24, und 96-Loch-Platten verwendet. Die Kulturgefäße wurden in automatisierten Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

8.5.3 Kryogene bakterielle Stammverwahrung

Alle Bakterienstämme wurden in einer permanent gefrorenen Kultur (Kryostock) verwahrt und bei Bedarf neu ausgestrichen und angezogen. Diese gefrorene Kultur stammte aus einer mit einer Einzelkolonie angeimpften 5 ml L-Broth bzw. M9- Kultur. Diese wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~ 2-3 angezogen, daraus wurde 1 ml abgenommen und mit 300 µl einer sterilen 80%igen Glycerinlösung versetzt und bei -80°C gelagert.

8.5.4 Kryogene eukaryotische Kulturverwahrung

Für die kryogene Verwahrung von eukaryotischen Zelllinien wurde 1 ml einer in Suspension vorliegenden Kultur in Medium mit 50 µl DMSO versetzt, sofort auf Eis verbracht und über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Kryokulturen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

8.5.5 Mycoplasmen-Kontrolle

Zur Sicherung einer *Mycoplasma spec.* freien Zellkultur wurden eukaryotische Zellen als auch Medium der verwendeten Zelllinien in der Diagnostischen Abteilung des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen in regelmäßigen Abständen (i.d.R. einmal jährlich) analysiert.

8.6 Genetische Methoden

8.6.1 Transformation von *E. coli* bzw. *S. Typhimurium*

Die Transformation elektroporationskompetenter Zellen erfolgte mit Plasmid-DNA oder gefällten Ligationsprodukten (vgl. dazu Abschnitt 8.7.5). Elektroporationen erfolgten unter Standardbedingungen (25 μ F, 400 Ω , 2500 kV) in Einmal-Elektroporationsküvetten (PeqLab). Die eingesetzte DNA-Konzentration schwankte in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials (Ligationsprodukt/Plasmid) zwischen 100-3000 ng. Elektroporationskompetente Zellen wurden innerhalb der Küvette mit Ligationsprodukt- bzw. Plasmid-DNA gemischt und elektroporiert. Anschließend wurde der Elektroporationsansatz mit 1 ml L-Broth-Medium gemischt und dieser für 30-60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Ausplattierung auf Selektiv-Agar-Platten, gegebenenfalls in Verdünnung, zur Etablierung der phänotypischen Expression, gefolgt von einer Inkubation bei 28°C bzw. 32°C über Nacht. Die erzeugten Transformanten wurden vereinzelt und erneut kultiviert, um die Phänotypsierung als auch die kryogene Stammverwahrung durchzuführen.

8.6.2 Herstellung elektroporationskompetenter *E. coli* und *S. Typhimurium* Zellen (Schnellverfahren)

Für kleinere Chargen von elektroporationskompetenter Zellen wurde bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} 2-3 angezogen. 5 ml wurden in 4 sterile Eppendorfreaktionsgefäße zu je 1,2 ml verteilt und bei 8000 g für 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellsedimente wurden in 1 ml sterilem 10% Glycerin aufgenommen und erneut bei 8000 x g für 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellsedimente von vier auf zwei Reaktionsgefäße eingeeengt und erneut in jeweils 1 ml 10% Glycerin aufgenommen und bei 6000 x g für 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Das Resuspendieren der Zellsedimente wurde zwei weitere Male wiederholt, unterbrochen durch Zentrifugationsschritte bei 3000 x g und 1500 x g jeweils für 5 min. bei 4°C, danach wurden die Zellsedimente mit jeweils 100 μ l 10% Glycerin versetzt. Beide Ansätze wurden vereint und in Aliquots von 70 μ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße bei -80°C überführt und gelagert.

8.6.3 Herstellung elektoporationskompetenter *S. Typhimurium* Zellen für Wanner-Mutagenese

Aus einer 5 ml L-Broth-Carbenicillin (100 µg/ml) Übernacht-Kultur des *S. Typhimurium* Stammes 4200, angezogen bei 28°C und 200 rpm, wurde ein mit 90 ml L-Broth-Carbenicillin versehener 500ml Schüttelkolben mit einer 1:10 Verdünnung inokuliert. Die Kultur wurde bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen und mit Arabinose (5 mM) induziert und bei 28°C inkubiert. Arabinose induziert hierbei die Expression der λ-Red-Rekombinase. Nach dem Erreichen der OD₆₀₀ von 2,0 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 x g für 10 min bei 4°C vom Medium getrennt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Zellsedimente wurden in 40 ml sterile 10 % Glycerin-ddH₂O-Lsg. resuspendiert und erneut bei 8000 x g für 10 min und 4°C sedimentiert. Anschließend wurden die Zellsedimente in gestaffelten Waschschritten bei 6000, 3000 und 1500 x g für 10 min bei 4°C durch jeweiligen Austausch der 10 % Glycerin-Lösung im Volumen von 40 ml gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 1,5 ml 10 % Glycerin-Lösung aufgenommen und in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße zu Aliquots von 100 µl bei -80°C eingefroren.

8.6.4 Herstellung von Deletionsmutanten in Stamm 4200 (*S. Typhimurium* LT2A)

Für das Deletieren von Genen im Chromosom von *S. Typhimurium* SL1344 Stamm 2958 wurde zuvor im Stamm 4200 die betreffende Deletion gesetzt. Durch abgeleitete Oligonukleotidprimer (vgl. Tab.14; Anhang), die Sequenzen von flankierenden Bereichen des zu deletierenden Zielgens trugen, wurde mittels PCR und dem Plasmid pKD4 (Template) ein PCR-Produkt erzeugt welches eine Resistenzkassette für Kanamycin, flankiert von Flp-Rekombinase Stellen (FRT-sites) und homologen Bereichen des Zielgens trugen, erzeugt. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Anschließend wurde das aufgereinigte Amplifikat in elektoporationskompetente 4200 Zellen durch Elektroporation unter Standardbedingungen eingebracht.

Die in den elektoporationskompetenten 4200 Zellen enthaltene λ-Red Rekombinase bewirkt einen Austausch des artifiziellen Amplifikats mit dem Zielgen durch die homologen Bereiche in 5'- und 3'-Richtung, die mitgeführte Kanamycinresistenzkassette erlaubt anschließend eine Selektion auf Kanamycin-L-Broth-Platten.

Nach der Wahl von zwei resistenten Stämmen, der Herstellung von Kochlysaten aus diesen und einer Überprüfung mittels PCR mit entsprechenden Test-Oligonukleotidstartern (*testingprimer*) erfolgte die Herstellung von Phagenlysaten um die Deletion im Zielstamm SL1344 einzubringen.

8.6.5 Herstellung von Phagenlysat

Der zuvor unter 8.6.4 erzeugte Mutantenstamm von 4200 wurde erneut in einer 6 ml L-Broth-Kultur angezogen. Diese wurde mit 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$ versetzt. Die Anzucht erfolgte bis zu einer OD_{600} von 0,1-0,3 bei 37°C / 200 rpm. Ein in L-Broth hergestellter 0,7% steriler Agar wurde aufgeschmolzen und à 6 ml in ein vorgewärmtes steriles Reagenzglas überführt. Dazu wurden 10 mM $MgSO_4$, 5mM $CaCl_2$ und zwischen 25µl-100µl (abhängig von der OD_{600}) gegeben und sofort auf eine raumtemperierte Agar-Platte gleichmäßig verteilt. Aus einer L-Broth-Lösung mit 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$ wurde eine 1:20 Verdünnung mit einer Phagenlösung aus P22 HT105/1 *int-201* (Schmieger, 1972) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 100 µl der Phagensuspension auf die erkaltete Topagar-Platte kreisförmig aufgetropft. Durch Rollbewegung der Platte wurde die Phagesuspension weiter verteilt. Der Rand der Agar-Platte wurde ausgespart. Die Platte wurde bei 37°C getrocknet und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nach Lyse (Plaques-Bildung) wurde der Topagar mittels eines sterilen Spatels abgenommen und in eine 15 ml Reaktionsgefäß überführen. Dieser wurde mit 1-2 ml einer L-Broth-Lösung, mit 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$ versetzt und 50 µl/ml Chloroform hinzu gegeben. Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Das 15 ml Reaktionsgefäß wurde bei 4°C für 15 min und 5850 x g zentrifugiert. Der Überstand = Phagenlysat wurde in 1 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Zugabe von 50 µl Chloroform steril gehalten sowie bei 4°C gelagert.

8.6.6 Herstellung von Deletionsmutanten in Stamm 2958 (SL1344)

Für die Transduktion des Stammes 2958 oder dessen Derivate, wurde in einer L-Broth-Lösung mit 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$ der entsprechende Stamm bis zu einer OD_{600} von > 2,0 bei 37°C / 200 rpm angezogen. Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension abgenommen und mit 2 µl Phagenlysat vermischt. Der Ansatz wurde für 15 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 12 µl einer 200 mM EGTA-Lösung. hinzu gegeben. Darauf folgend wurde das Gemisch mit 900 µl einer L-Broth / EGTA- [20 mM] Lösung versetzt. Aus dieser Suspension wurden zu je 100 µl auf fünf Kanamycin L-Broth-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei > 30°C inkubiert. Am Folgetag wurden zwei Kolonien (runde Kolonieform ohne Eindellung) gewählt und auf Grün-Agar-Platten mit einem Verdünnungsausstrich vereinzelt. Diese wurden über Nacht bei > 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils eine Kolonie ohne Blaufärbung gewählt und auf Kanamycin L-Broth-Flüssigmedium bei 37°C / 200 rpm angezogen und bei einer OD_{600} von > 2,0 Kryokulturen angelegt, die bei -80°C gelagert wurden. Aus Kochlysaten der betreffenden Stämme wurden die Deletionen mittels Testoligonukleotiden in einer PCR geprüft.

8.6.7 Transduktion

Diese Mutagenisierung von *Salmonella* funktioniert aufgrund von Sequenzabschnitten, verteilt auf das *Salmonella* Chromosom, die zur *pac*-site des Phagen homolog sind. Bei der Infektion der Wirtszelle und der Erzeugung neuer Phagen über den headfull-Mechanismus werden ebenfalls die homologen Bereiche der *pac*-site im Wirtschromosom durch Nukleaseaktivität in 45 kb große Fragmente zerschnitten und in Phagenköpfe verpackt. Diese chromosomale DNA kann über den Phagenapparat wieder in einen neuen Wirt eingebracht werden und dort homolog rekombinieren, was letztendlich die gezielte genetische Manipulation erlaubt. Der für die hier beschriebene Arbeit verwendete Phagenstamm P22 HT105/1 *int*-201 weist einige Besonderheiten auf, die ihn für die genetische Manipulation von *Salmonella* prädestinieren. Der Phage verfügt über eine Nuklease die weniger spezifisch für wirtseigenen *pac*-Sequenzen ist und somit rund 50% aller fertig prozessierten Phagenköpfe chromosomale DNA tragen (Schmieger, 1972). Die *int*-Mutation sorgt dafür, dass sich kein stabiler lysogener Phage etablieren kann. Auch ist der Phagentiter mit 10^{10} - 10^{11} "plaque forming units" (pfu) sehr hoch, was die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Rekombination mit dem gewünschten genetischen Material deutlich erhöht.

8.6.7 Mutantanalyse mittels Reinigungsausstrichen auf definierten Medien

Zur Überprüfung ob eine Deletionsmutation in einem Aminosäurebiosyntheseweg eine Auxotrophie für die betreffende Aminosäure selbst oder Vorläufermoleküle bedingte, wurden Reinigungsausstriche auf M9-(Minimalmedium)-Platten mit bzw. ohne die betreffende(n) Aminosäure(n) angelegt. Hierfür wurde eine L-Broth-Kultur mit dem zu untersuchende Stamm beimpft und diese bis zu einer OD_{600} von ~ 2 bei 37°C / 200 rpm Schüttelagitation angezogen. Je 1 ml wurde abgenommen und die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 x g vom Medium getrennt. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils 1 ml 150 mM NaCl gewaschen und durch Zentrifugation bei 8000 x g vom Waschüberstand getrennt. Das Zellsediment wurde erneut in 1 ml 150 mM NaCl aufgenommen und durch einen Verdünnungsausstrich auf ein M9-Platten-Set, bestehend aus einer Negativkontrolle (M9/Histidin/Glukose) und Testplatten mit entsprechenden Aminosäuren, ausgestrichen. Die Testplatten enthielten abhängig von der/den gesetzten Deletion(en) eine oder mehrere Aminosäuren in einer Konzentration von 25 µg/ml. Die Inkubation der Platten erfolgte in der Regel bei 32°C über Nacht.

8.7 Molekularbiologische Methoden

8.7.1 Polymerase-Kettreaktion (*polymerase chain reaction (PCR)*)

Polymerase-Kettreaktionen wurden genutzt, um DNA-Amplifikate herzustellen. Dies diente sowohl präparativen als auch für Kontroll-Zwecke(n). Folgende Materialien wurden verwendet: 10fach PCR-Puffer (Promega), MgCl₂ (Promega), dNTPs (Promega), Oligonukleotidstarter (Primer), Polymerasen (Promega), ddH₂O, Amplifikationsvorlage (Templat). Um die Polymerase-Kettreaktion durchführen zu können, wurde auf den Thermocycler Biometra 3000 zurückgegriffen und entsprechende PCR-Programme zweckbezogen generiert.

Repräsentativer PCR-Ansatz

Lösung:	Menge in µl pro Probe
ddH ₂ O	32,3
MgCl ₂ 50mM	1,5
10x PCR-Puffer	5
DNTP's	5
Primer 1	2
Primer 2	2
Taq-Polymerase	0,2
Proben-DNA	2

Repräsentatives PCR-Programm

Abfolge:	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen:
Prädenaturierung	94°C	180 Sec.	1
Denaturierung	94°C	60 Sec.	34
Annealing	50°C	60 Sec	34
Elongation	72°C	60 Sec.	34
Endelongation	72°C	600 Sec.	1

8.7.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *S. Typhimurium* für PCR-Analysen wurde das Zellsediment aus 1 ml einer Flüssigkultur bei einer OD₆₀₀ von 2,8-3,4 durch Zentrifugation bei 13500 rpm für 5 min gesammelt. Das Zellsediment wurde in 1 ml 150 mM NaCl resuspendiert. Es wurden 100 µl der Zellsuspension für 10 min bei 99°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 sek des Zelllysats. Davon wurden 90 µl abgenommen und bei -20°C gelagert. Um bei allen Ansätzen annähernd die gleiche DNA-Menge in der Stamm-Lösung zu haben, wurde die optische Dichte jeder Kultur von Zelllyse zueinander nivelliert.

8.7.3 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* Kulturen erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben oder durch Phenol-Chloroform Extraktionsverfahren. Dazu wurden der Plasmidträgerstamm im Kulturvolumen von 5 ml L-Broth-Medium bei 37°C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 2,5 bei 600 nm angezogen. Anschließend wurde die Zellen der 5 ml Zellsuspension à 1,25 ml, in einem 1,5 ml fassenden Eppendorfgefäße, in vier Zentrifugationsschritten bei 16100 x g sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl von Lösung 1 (50 mM Glukose, 2 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 7,0-7,5) aufgenommen. Dazu wurden 200 µl frisch angesetzter Lösung 2 (Lysepuffer: 40 µl 5M NaOH, 100 µl SDS (10% (w/v), 860 µl ddH₂O) zupipettiert und durch kräftiges Schütteln (Vortex) gemischt. Nach einer Inkubation von 20-30 min bei Raumtemperatur 150 µl von Lösung 3 (Kaliumacetat 58,9 g, 50 ml Eisessig, aufzufüllen auf 150 ml mit ddH₂O, pH 5,0) zugegeben, gemischt und auf Eis 10 min inkubiert. Durch Zentrifugation für 3 min bei 16100 x g wurden die Zellreste sedimentiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden 500 µl Phenol gegeben und kräftig geschüttelt (Vortex). Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei 16100 x g. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt (Vortex), nach Zentrifugation bei 16100 x g wurde die wässrige Phase erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und in gleicher Weise mit Chloroform versetzt. Nach wiederholter Zentrifugation wurden der abgenommenen wässrigen Phase 33 µl einer 3 M Natriumacetat Lösung zugesetzt. Durch Zugabe von 900 µl absoluten Ethanol und einer über Nacht Inkubation bei -20°C wurde das Plasmid aus der Lösung gefällt. Am Folgetag wurde durch Zentrifugation bei 31500 x g für 1 h bei 4°C das Plasmid sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plasmidsediment mit Ethanol (70% (v/v)) gewaschen. Dieser wurde dekantiert und das Plasmidsediment von Resten des Ethanol bei 37°C für 10 min befreit. Anschließend wurde das Plasmidsediment in 50-100 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

8.7.4 Restriktion von DNA

Restriktionen von chromosomaler DNA, Plasmiden, DNA-Fragmenten oder für Zwecke der Überprüfung auf Klonierungserfolge (Testrestriktion) wurden unter im präparativen 100 µl Ansatz bzw. für Testrestriktionen im 50 µl Ansatz durchgeführt. Dafür wurden abhängig von der eingesetzten DNA-Menge die restrigiert werden sollte, zwischen 2 und 10 Units Restriktionsenzym, 1 fach konzentrierter zugehöriger Restriktionspuffer (auf Gesamtvolumen gerechnet) und ddH₂O anteilig zum Gesamtvolumen eingesetzt. Die Restriktion erfolgte bei vom Restriktionsenzym-Hersteller empfohlenen Temperatur und Inkubationszeit.

8.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsansätze wurden vor dem Einsatz für die Elektroporation gefällt. Dazu wurden die Ligationsansätze mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und mit 10 Volumen n-Butanol gemischt. Der Ansatz wurde für 40 min bei 16100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 500 µl eiskaltem Ethanol (80%tig (v/v)) gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz erneut 5 min bei 16100 x g zentrifugiert und das Sediment unter Vakuum getrocknet und danach in 6 µl ddH₂O gelöst.

8.7.6 Sequenzanalyse

Alle Sequenzanalyse wurden durch die Firma Agowa, Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Ostendstr.25, D-12459 Berlin, durchgeführt. Dazu wurde aufgereinigte DNA und entsprechende Oligonukleotidprimer in vorgeschriebener Konzentration eingesendet.

8.8 Elektrophoretische Methoden

8.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA bzw. RNA

Um DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe nach unterscheiden zu können, wurden 1% Agarosegele aus 1-fach konzentriertem TBE-Puffer (w/v) (Tab. 11) und Agarose (Roth) hergestellt. Der Gellösung wurden 0.005% Ethidiumbromid beigefügt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1-fach konzentrierter TBE-Puffer. Die DNA-Fragmente wurden mit einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 500 mA im Gel aufgetrennt.

Zur Auftrennung von isolierter RNA wurden 1,2 bis 2% Agarosegele verwendet. Auch diese wurden mit 1-fach konzentriertem TBE-Puffer (w/v) (Tab. 11) und Agarose (Roth) angesetzt. Der Gellösung wurden 0.005% Ethidiumbromid beigefügt. Als Laufpuffer diente ebenfalls frischer 1-fach konzentrierter TBE-Puffer. Um eine Degradierung der RNA zu verhindern, wurden nur frisch angesetzte Gele verwendet. Die RNA-Fragmente wurden mit einer Spannung zwischen 100 und 120 V und einer Stromstärke von 500 mA im Gel aufgetrennt. Die Visualisierung als auch die Dokumentation der DNA- bzw. RNA-Fragmente erfolgte mittels Fotodokumentationsanlage.

8.8.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Um ausschließen zu können, dass es zu Rekombinationen innerhalb des Chromosoms verschiedener *S. Typhimurium* Mutanten über die durch die P22 Transduktionen eingefügten FRT-Sequenzen gekommen ist, wurden Pulsfeld-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurden die in Tab. 11 aufgeführten Lösungen verwendet.

Als Vorbereitung für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGL) wurden jeweils über Nacht Kulturen von allen zu untersuchenden Mutanten als auch vom Wildtyp sowie alle benötigten Lösungen hergestellt. Von den Übernacht-Kulturen wurde die optische Dichte von 1 bei OD₆₀₀ eingestellt. Daraus wurden 1,5 ml Zellsuspension separiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 14000 rpm sedimentiert und jeweils mit 1 ml 0,9%ige NaCl gewaschen. Die Zellsedimente wurden danach in 0,5 ml 0,9%ige NaCl aufgenommen und bei 37°C im Thermoblock (Eppendorf) erwärmt. Es wurde eine 1,2%ige Agarose-Lösung (0,14 g Agarose + 12 ml 1 fach TBE) aufgekocht und auf 50°C abgekühlt. Eine Gießschablone wurde vorbereitet und jeweils 750 µl der Agarose zu den 500 µl Zellsuspensionen gegeben und gemischt. Daraus wurden jeweils 2 Blöcke pro Stamm à 100 µl Aliquots gegossen. Nach dem Erkalten der Gießblöcke auf Eis wurde eine Proteinase K Lösung hergestellt (8 mg Proteinase K in 10 ml ESP-Lösung). Jeweils ein Gießblock wurde mit 0,5 ml Proteinase K Lösung überschichtet und für 24 h bei 56°C im Wasserbad inkubiert.

Am Folgetag wurden alle zusammengehörigen Blöcke jeweils viermal mit 14 ml TE-Puffer bei 4°C für 45 min gewaschen. Es wurde mit nur einem der zwei Blöcke (pro Stamm) weitergearbeitet. Die Lagerung des zweiten Blocks erfolgte bei 4°C in TE-Puffer. Die für die weiteren Arbeiten vorgesehenen Blöcke wurden halbiert und jeweils in 600 µl Restriktionsenzym Puffer-Lösung für 30 min äquilibriert. Anschließend wurde ein Restriktionsansatz aus 150 µl Restriktionspuffer und 20 Units AvRII-Restriktionsenzym über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag nach Abnahme der Restriktionsansätze und Zugabe von 500 µl TE-Puffer (pro Block) wurden die Blöcke bei 4°C gelagert. Danach wurde ein 1,2%iges Agarosegel (Pulsed Field Certified Agarose, Biorad) mit 0,5 fachem TBE-Puffer gegossen (100 ml, 90ml Gel, Rest warm halten zum abdichten). Nach Aushärten des Gels wurde vorgekühlter 0,5 facher TBE-Puffer (2,2 L) in eine austarierte Gelkammer gegeben und diese auf 14°C Kühlung eingestellt. Die Blöcke wurden luftblasenfrei in entsprechende Platzhaltertaschen im Agarosegel eingeschoben und mit noch warmer bzw. flüssiger Agarose fixiert. In selber Vorgehensweise wurde Lambda Ladder, PFG-Marker (1 mm Stücke) in Platzhaltetaschen fixiert. Das fertige Gel wurde mitsamt dem Gelträger in die Kammer überführt und dort durch einen Halterahmen stabilisiert. Danach erfolgte die gepulste elektrophoretische Auftrennung bei 6V (140-160mA) für 22 h bei 14°C.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Markierung der chromosomalen als auch der Marker-DNA mittels Lagerung für 3 min im Ethidiumbromid-Bad. Anschließend erfolgte die Photodokumentation.

8.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Auftrennen von Proteinen erfolgte in denaturierenden, diskontinuierlichen 12%iges und 15%iges SDS (Natrium-Dodecylsulfat)-Polyacrylamid nach Laemmli *et al.* (1970) (vgl. Tabellen 9, 10, 11). Die Gele wurden in einem Amersham-System gegossen und auch elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab.9: Lösungszusammensetzungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese.

Lösung	Bestandteile	Bemerkung
ESP-Lsg.	500 mM EDTA 1% Sarcosyl pH 9,5 + Proteinase K (vor Gebrauch)	<u>100 ml-Ansatz:</u> 18.615 g EDTA in 80 ml ddH ₂ O lösen, pH 9.5 eingestellt (NaOH / HCl) danach 1 g Sarcosyl lösen und add. 100 ml Lsg. sterilfiltriert und erst vor Gebrauch Proteinase K (0,9 mg mg/Block hinzugegeben)
TE-Puffer	10 mM Tris 10 mM EDTA pH 7,5	<u>2 L Ansatz:</u> 2,42 g Tris base, 7,45 g EDTA, pH 7,5 eingestellt (NaOH / HCl) add. 2 L ddH ₂ O, Lsg. autoklaviert
EDTA	500 mM pH 8,0	<u>100 ml Ansatz:</u> 18.6 g EDTA in 80 ml ddH ₂ O erwärmt bis zur Lösung, nach Abkühlung pH 8,0 eingestellt (NaOH / HCl), add. 100 ml
10 fach TBE-Puffer	890 mM Tris base 890 mM Borsäure 500 mM EDTA	<u>1 L-Ansatz:</u> 107,8 g Tris und 55 g Borsäure in 800 ml ddH ₂ O gelöst, 40 ml von 500 mM EDTA Lsg. hinzu (pH- Wert wurde nicht mehr verändert)
TBE-Puffer (1 fach) für Agaroseblöckchen		10 ml (10 fach TBE) add. 90 ml ddH ₂ O, autoklaviert
TBE-Puffer (0,5 fach) für Elektrophorese		115 ml (10 fach TBE) add. 2,3 L ddH ₂ O
0,9% NaCl	0,9 g NaCl	0,9 g in 90 ml ddH ₂ O gelöst, add. 100 ml, autoklaviert

Tab.10: Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gele.

Lösung	Zusammensetzung
Lower Tris	1 M Tris (pH 6,8)
Upper Tris	1,5 M Tris (pH 8,8)
10x Laemmli-Laufpuffer	Tris: 250 mM (30,28 g), Glycin: 1,92 M (144,13 g), SDS: 1% (10 g), add. ddH ₂ O 1 L
2x Probenauftragspuffer	1,25 ml 1 M Tris (pH 6,8), 4 ml 10% SDS, 2,0 ml Glycerol, 2,0 mg Bromphenol Blau, 0,31 g Dithiothreitol (DTT) add. ddH ₂ O 10 ml

Tab.11: Bestandteil- und Mengenangaben für SDS-Polyacrylamid-Gele.

Lösung	5% Sammelgel (3 ml)	15% Trenngel (10 ml)	20% Trenngel (10 ml)
ddH ₂ O	2,1 ml	2,3 ml	0,6 ml
30% Acrylamid Mix	0,5 ml	5,0 ml	6,7 ml
10% SDS	0,03 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,03 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,003ml	0,004 ml	0,004 ml
Lower Tris	0,38 ml	-	-
Upper Tris	-	2,5 ml	2,5 ml

Zur Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen kamen *Salmonella*-Zellrohextrakte als auch mittels Amicon Ultra-15-Filter System (Merck, Millipore) bzw. Protino Ni-TED Polyhistidin-Tag Purification Kit (Machery-Nagel) aufgereinigte Ansätze. Das Zellkulturvolumen schwankte je nach Zielsetzung der Experimente zwischen 5 ml und 500 ml. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 4000 x g) vom Medium getrennt. Für analytische SDS-Polyacrylamidgele wurde ein Aliquot der Kultur zusammen mit Probenauftragspuffer bei 99°C für 10 min gekocht und anschließend auf ein Gel aufgetragen. Nach dem Auftrag der Proben erfolgte der Gellauf bei 30 mA (Sammelgel 15 mA und konstanter Stromstärke). Die Färbung der Proteine erfolgte wie unter Abschnitt 6.9.1 angegeben. Anschließend wurden die Gele mittels Epson-Scanner digitalisiert.

8.9 Proteinchemische Arbeiten

8.9.1 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Detektierung von Proteinen in den Gelen wurden diese entweder mit Coomassie-Färbeverfahren oder mit einem Silber-Färbe Kit nach Herstellerangaben der Firma BIO-RAD (Silver Stain Plus Cat. Nr. 161-0449) sichtbar gemacht.

Aufgrund der hohen Polyacrylamidkonzentration von 15% wurden die Gele für das Coomassie-Färbeverfahren für 40 bis 60 min. in der Coomassie-Färbelösung inkubiert (vgl. Tab. 12). Mit Entfärbe-Lösung (vgl. Tab. 12) wurde nicht-proteingebundener Farbstoff aus dem Gel entfernt.

Tab.12: Coomassie-Färbe- und Entfärbe-Lösung.

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelsg.	50% Methanol (technisch), 10% Essigsäure (technisch) 0.05% Brilliant Blue R (Serva)
Entfärbelsg.	30% Methanol (technisch), 10% Essigsäure (technisch)

8.9.2 Peptidsynthese- und Aufreinigungsmethoden

Der Stamm 5722 ($\Delta ilvGM$) ist gegenüber steigender Valin-Konzentration sensibel, vorausgesetzt es ist kein Isoleucin (siehe 4.3) vorhanden. Über Poly-Valin-Peptid bzw. Tri-Valin-Peptid Zugabe sollte versucht werden, die $\Delta ilvGM$ -Mutante am intrazellulärem Wachstum zu hindern bzw. die Replikationsfähigkeit signifikant einzuschränken. Um sich der Aufgabenstellung zu nähern, wurden Überexpressionsplasmide erzeugt, Poly-Valin-Peptide aufgereinigt und in Anwendung auf inhibitorische Effekte untersucht.

8.9.3 Synthese His-Tag markierter Polypeptide (Poly-Valin)

Es wurden vier verschiedene kommerziell synthetisierte Polypeptide (Poly-Prolin, -Glycin, -Tryptophan und -Valin), (Sigma) getestet. Da sich im weiteren Arbeitsverlauf herausstellte, dass drei der vier Polypeptide, darunter auch Poly-Valin, sich als unlöslich in verschiedensten Lösungsmitteln (DMSO, Triton X-100 0,1%, EtOH, CH_3COOH , ddH_2O basisch/saurem pH) erwiesen, wurde der Entschluss gefasst, die benötigten Polypeptide über einen geeigneten Vektor induzierbar in einem Trägerstamm (*E. coli*, 445) synthetisieren zu lassen. Dazu wurden DNA-Sequenzen abgeleitet, die für die His-Tag markierten Polypeptide kodieren. Diese wurden durch die Firma GenScript, (Piscataway, NJ, USA) synthetisiert und in den Vektor pUC57 kloniert. Zur eigenen Verwendung musste eine

Umklonierung in einen anderen Vektor und eine Transformation in einen geeigneten Trägerstamm (*E. coli* BL21λDE3-Stamm 445) stattfinden. Dazu wurden die Gensequenzen der artifiziellen Peptide, auf den gelieferten Plasmiden, mittels einer PCR amplifiziert. Bei der Synthese der Gensequenzen wurden sowohl Restriktionsschnittstellen als auch die für die Umklonierung nötigen Ligationsstellen definiert. Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsendonukleasen in *Bam*HI (5´) und *Hind*III (3´) geschnitten. Nach der Aufreinigung der betreffenden DNA-Fragmente wurden diese in zuvor ebenfalls restrigierte Trägerplasmiden (pET45b) durch Ligation eingefügt. Mit den resultierenden Ligationsprodukten wurden Transformationen elektroporations-kompetenter *E. coli* Zellen Stamm 445 durchgeführt. Nach erfolgreicher Transformation und Sequenzierung der betreffenden Plasmidsequenzen konnte mit den Überexpressionsversuchen begonnen werden.

8.9.4 Überexpression His-Tag markierter Polypeptide

Für die Induktion der Überexpression und somit der Synthese der gewünschten Polypeptide wurde eine Vorkultur der Trägerstämme angelegt. Dazu wurde 5 ml L-Broth-Medium mit zusätzlichen Aminosäuren (die im Polypeptid vorhanden waren) als auch mit allen fünf Nukleobasen und 100 µg/ml Carbenicillin supplementiert. Dieses wurde mit dem Trägerstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C / 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur fand am Folgetag eine Überimpfung in 100 ml, wie oben beschrieben, vorsupplementiertes L-Broth-Medium in einer 1:100 Verdünnung statt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde IPTG in einer Konzentration von 1,6 mM hinzu gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 2,5-3 weiter inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gestellt und die Bakterien durch Zentrifugation in 50 ml Reaktions-Röhrchen (Greiner) bei 4000 x g und 4°C für 10 min sedimentiert. Die Zellsedimente wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

8.9.5 Polypeptidisolierung mittels Ni-TED Kit (Machery-Nagel) und Amicon-Filtration

Für präparative Zwecke wurde das Zellsediment mittels im Ni-TED Kit (Machery-Nagel) enthaltenem LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) und frisch zugegebenem Lysozym [1mg/ml] 30 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend folgende eine Ultraschallbehandlung (10 x 15 sek Impulsstöße, jeweils unterbrochen durch 15 Sekunden Abkühlphasen). Um eine bessere Aufreinigung über die Ni-TED- Säulen zu gewährleisten wurde eine Vorfiltration mittels Amicon-Ultra 15 (Millipore, USA), mit einer Porengröße für Proteine mit einem nominalen molekularem Gewicht von 10000 bzw. 5000 Dalton durchgeführt. Das resultierende Filtrat wurde im Anschluss nach Herstellerangaben mittels Ni-TED Kit (Machery-Nagel) auf Ni-TED Säulen aufgetragen, gewaschen und in

verschiedenen Fraktionen eluiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mittels NanoDrop durchgeführt. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden auf analytischen SDS Polyacrylamid-Gelen aufgetragen und durch Coomassie bzw. Silberfärbung sichtbar gemacht.

8.10 Zellbiologische Methoden

8.10.1 Passagen adhärenter Zelllinien und von Suspensionszellen

Konfluent angewachsene adhärenente Zellkultur wurde nach Abnahme des Mediums mit 5 ml bei 25 cm³ Flaschen bzw. 15 ml bei 75 cm³ mit PBS überschichtet. Nach Abnahme des PBS erfolgte die Zugabe von 5 ml bzw. 10 ml Trypsin/EDTA (1x aus 100x konz. Stocklösung). Eine Inkubation von 10-15 min bei 37°C bewirkte das Ablösen der adhärenenten Zellen. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, wonach das gleiche Volumen Zellkulturmedium dazu gegeben wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 155 x g (1000 rpm, Sigma RK30 Zentrifuge) für 5 min. sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Einsaat der Zellen in neue, mit Medium supplementierte, Kulturflaschen. Das Einsaat-Volumen variierte bezogen auf den nächsten Passagetermin. Suspensionskulturen wurden durch Überimpfen auf frisches Medium in einer neuen Flasche bzw. durch Abnahme verbrauchten Mediums und erneutes Auffüllen mit frischem Medium passagiert.

8.10.2 Invasions- / Replikations-Assay

Der Zeitraum der Vorbereitungen/Durchführung für ein solches Assay beträgt drei Tage. Für die Infektionen wurden 24-Loch-Platten mit konfluent angewachsenen, adhärenenten Wirtszellen unterteilt. Waagrecht, von oben nach unten, wurden die Wirtszellen mit dem Wildtyp bzw. den Mutanten-Stämmen versehen. So standen jeweils zwei Löcher für den 2 h, 4 h und 24 h Wert zur Verfügung.

Am ersten Tag wurden die zu untersuchenden drei Stämme zusammen mit dem Wildtyp-Stamm auf L-Broth-Festmedium ausgestrichen. Die Inkubation dieser Platten erfolgte über Nacht bei 32°C. Die 24-Loch-Platte wurde auf konfluentes Wachstum überprüft, ggf. wurde das Medium erneuert. Am zweiten Tag wurde von den Salmonellen-Stämmen mit einer Einzelkolonie L-Broth-Flüssigmedium innokuliert und bis zu einer optischen Dichte zwischen 2,5 und 3,0 bei 37°C/200 rpm angezogen. Eine Stunde vor der Infektion wurde das Medium der 24-Loch-Platte erneuert.

Die Salmonellen-Stämme wurden durch Verdünnungsschritte auf eine Zellzahl pro Milliliter von 10⁶ (photometrisch/rechnerisch) eingestellt. Anschließend erfolgte die Infektion

durch Zugabe von 50 μl der Bakteriensuspension. Dadurch wurden ca. 100.000 Salmonellen-Zellen pro Loch der Platte zugegeben. Bei einem konfluenten eukaryotischen Zellrasen entspricht dies einem relativen Infektionsverhältnis von 1:1 (MOI = *Multiplicity of Infection* 1:1). Um die tatsächliche bakterielle Zellzahl zu ermitteln, wurde die Verdünnungsreihe bis 10^3 Zellen pro Milliliter weitergeführt und daraus jeweils 100 μl auf fünf L-Broth-Agar-Platten ausplattiert. Daraus wurde später die CFU (*Colony Forming Units*) zum Zeitpunkt der Infektion ermittelt. Durch Zentrifugation der Loch-Platte für 10 min. bei 250 rpm wurden die Salmonellen auf den adhären Wirtszellen aufgebracht. Anschließend wurde die 24-Loch-Platte bei 37°C für 1 h inkubiert. In dieser Zeit fand die Infektion der Wirtszellen statt. Folgend wurde die Infektion durch die Zugabe von 50 $\mu\text{g/ml}$ Getamycin enthaltendes Zellkulturmedium kontrolliert abgebrochen. Alle nicht in die Wirtszellen eingedrungenen Salmonellen wurden abgetötet. Hierfür wurde erneut 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die erste Probennahme. Dazu wurde bei der gesamten Lochplatte, dass 50 $\mu\text{g/ml}$ Getamycin Zellkulturmedium gegen 10 $\mu\text{g/ml}$ Getamycin Zellkulturmedium ausgetauscht. Die für den 2 h Wert vorgesehenen acht Löcher wurden zweimal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Wirtszellen lysiert, dies wurde durch Zugabe von 500 μl 0,1% Triton X-100 und die Lysats in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die 24-Loch-Platte wurde weiter bei 37°C inkubiert. Durch Anlegen einer Verdünnungsreihe der Lysate bis 10^{-2} (1:100 Verdünnung) und das Ausplattieren von jeweils 100 μl (gesamt Verdünnung 10^{-3}) auf fünf L-Broth-Agar-Platten konnte ermittelt werden, wie viele Bakterien-Zellen nach 2 h (post Infektion) pro Loch vorgelegen hatten. Der 4 h Wert wurde in selber Weise generiert. Die 24-Loch-Platte wurde für die restlichen 20 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde auch der 24 h Wert, wie vorher beschrieben, generiert. Bei den hierbei anfallenden Verdünnungsschritten des Zelllysats wurde bis 10^{-3} verdünnt und daraus ebenfalls jeweils 100 μl auf fünf L-Broth-Agar-Platten ausplattiert.

8.10.3 Messung der Zytotoxizität

Um zytotoxische Effekte nach der Zugabe von Tri-Valin-Peptid in der LoVo-Zelllinie überprüfen zu können, wurden Zytotoxizitäts Assay durchgeführt und dreimal wiederholt. Dazu wurde mittels des CytoTox-ONE™ *Homogeneous Membrane Integrity Assay* (Promega) die Membranintegrität mit Tri-Valin Peptid behandelte und unbehandelte Zellen untersucht. Der Tests richtete sich nach Herstellerangaben und wurde in einer 96-Loch Platte (Corning) in einem 100 μl Volumen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in DMEM/10% FKS-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte ein Mediaustausch mit definiertem IMDM-Medium (vgl. Tab. 7; Abschnitt 8.3.3). Nach 2 h wurde das Medium durch definiertes IMDM-Medium 10 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin und 150 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Tri-Valin-Peptid ersetzt. Es erfolgte eine Inkubation im Zellkulturbrutschrank für 24 Stunden. Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurde die Zytotoxizität indirekt über die Akkumulation der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium gemessen. Die LDH setzt Laktat mittels NAD^+ zu Pyruvat und NADH um, ist NADH vorhanden kann ein fluoreszierender Farbstoff wie Resazurin reduziert werden was mittels vergleichender Wellenlängenmessung detektiert werden kann. Die Positivkontrolle wurde durch Zugabe von jeweils 2 μl Lysepuffer erzeugt. Nach 10 sek mischen und einer Inkubation von 25 min bei Raumtemperatur wurde das Volumen aller Wells auf 50 μl eingeeengt und die Zugabe des CytoTox-ONE™ Reagenz durchgeführt. Das Reagenz wurde gleichmäßig verteilt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss inkubiert. Um die Auswertung beginnen zu können wurden 25 μl einer Stop-Lösung hinzu pipettiert und erneut für 10 sek gemischt. Dies bewirkte die Unterbrechung des reduktiven Umsatzes von Resazurin zu Resorufin in Anwesenheit von NADH. Das Auslesen der 96-Loch Platte erfolgte automatisch mittels des Luminometers Synergy™ HT durch die Messung der Fluoreszenz (in „Relative Light Units“ RLU) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=530$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda=590$ nm. Die Fluoreszenz der nicht behandelten Zellen wurde von den behandelten Zellen abgezogen und anschließend in einer prozentualen Darstellung gegeneinander bzw. mit der Positivkontrolle verglichen.

8.11 Photometrische Methoden

Aufgrund technischer Beschränkungen des verwendeten Fluorometers in der optischen Analyse der zu untersuchenden *Salmonella* M9-Minimalmedium Flüssigkulturen musste ein Umrechnungsfaktor generiert werden, um auf die tatsächlichen optischen Dichten der Flüssigkulturen schließen zu können. Dazu wurde aus einer stationären Kultur des Referenzstammes 2958 1 ml abgenommen und durch Zentrifugation bei 13000 x g / 1 min die Bakterien sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 1 ml 150 mM NaCl-Lösung resuspendiert. Danach wurden in den Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} verdünnt und photometrisch bei 450 nm die optische Dichte bestimmt. Parallel dazu wurde eine photometrische Analyse der Verdünnungsreihen im Fluorometer durchgeführt. Aus beiden Datensätzen wurden Verhältnisfaktoren abgeleitet. Mit dem ermittelten Umrechnungsfaktor wurden im Anschluss alle mit dem Fluorometer erzeugten Daten multipliziert, um auf den tatsächlichen Wert der optischen Dichte der untersuchten Kulturen schließen zu können.

8.12 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Statistikabteilung des Instituts für physikalische Chemie der Universität Jena durchgeführt. Zur Anwendung kam dabei das Statistik-Programm „R“ (R Development Core Team (2010). *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). Die Daten der Invasions / Replikations Assays wurden dem t-Test Verfahren unterzogen. Für die Normierung der Ergebnisse wurde auf folgende Gleichung zurückgegriffen.

$$\frac{((24\text{h Wert Mutante} / 0\text{h Wert Mutante}) : (2\text{h Wert Mutante} / 0\text{h Wert Mutante}))}{((24\text{h Wert Wildtyp} / 0\text{h Wert Wildtyp}) : (2\text{h Wert Wildtyp} / 0\text{h Wert Wildtyp}))}$$

Alle für die Statistik geschriebenen Programm-Masken wurden bei Dr. K. Tedin (Freie Universität Berlin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen) hinterlegt und sind jederzeit mit dem Programm „R“ einsehbar.

9. Ergebnisse

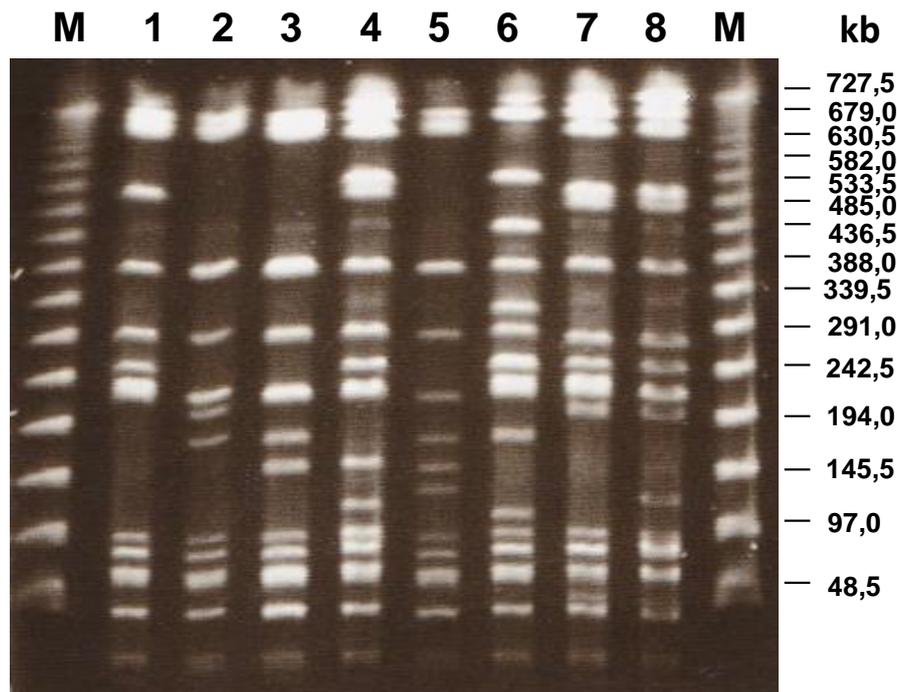
9.1 Generierung und Analyse von Aminosäure-Biosynthese und –Aufnahme-Mutanten

Um indirekt über die intrazelluläre Replikationsrate Rückschlüsse auf das intravakuoläre Nährstoffspektrum von *S. Typhimurium* zu erhalten, wurden durch die Deletion von *Salmonella*-eigenen Aufnahmesystemen für freie Aminosäuren bzw. für Oligo- und Dipeptide, aber auch durch Deletionen innerhalb von diversen Aminosäure-Biosynthesewegen gezielt, Mutanten erzeugt. Die in den Mutanten vorliegenden Auxotrophien ermöglichen das vorliegende Nährstoffspektrum zu analysieren.

Die erzeugte(n) Mutation(en) wurden mittels PCR und Gen-spezifischen Oligonukleotidprimern genetisch verifiziert. Der aus den gesetzten Mutationen resultierende Phänotyp wurde auf M9-Minimalmedium-Platten überprüft, sowohl supplementiert als auch ohne entsprechende Aminosäuren. Die Überprüfung mittels Minimalmedium erbrachte in Abhängigkeit der gesetzten Mutation(en) und deren Auswirkung auf die Aufnahme- bzw. Biosyntheseleistung auxotrophe sowie anscheinend unveränderte Phänotypen hervor. Die Ergebnisse der M9-Minimalmedium Überprüfung werden für die einzelnen Stämme zugehörig zum jeweiligen Aminosäure-Biosyntheseweg bzw. bei den betreffenden Aufnahmesystemen im Text der nachfolgenden Ausführungen besprochen. Es wurden nicht alle Mutanten mittels M9-Plattentests analysiert, da bestimmte Deletionskombinationen den gleichen Phänotyp bedingten. Soweit möglich, wurden alle Einzeldelationen mittels M9-Plattentest überprüft und verifiziert.

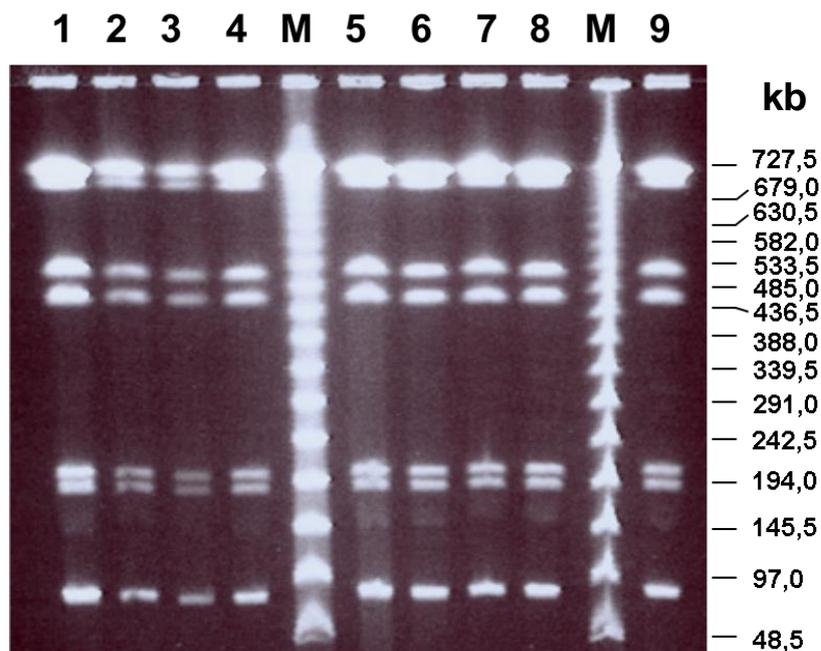
9.2 Überprüfung auf homologe Rekombinationsereignisse

Um Rückschlüsse auf die intrazelluläre Nährstoffquelle als auch auf die intravakuoläre Aminosäure-Biosyntheseleistung von *S. Typhimurium* SL1344 zu erhalten, wurden im Vorfeld als auch während dieser Studie verschiedene Aminosäure-Biosynthese bzw. -Aufnahme Mutanten erzeugt. Da bei dem verwendeten Mutagenese Verfahren Deletionsnarbensequenzen (FRT-sites) auf den Chromosomen der verschiedenen Mutanten zurückblieben (Datsenko & Wanner, 2000), bestand die Gefahr homologer Rekombinationen, die zu umfangreichen strukturellen Veränderungen des bakteriellen Chromosoms führen könnten. Dies wiederum würde in polaren Effekten münden, die die Genexpression an sich sowie indirekte Einflüsse auf unbeteiligte Gene zur Folge haben könnten. Um dies zu überprüfen, wurden mittels Pulsfeld-Gelelektrophoresen die Chromosomenstrukturierung derjenigen Mutanten untersucht, die die meisten Deletionen trugen und damit auch die höchste Wahrscheinlichkeit aufwiesen, Rekombinationen zu tragen (vgl. Abb. 15 und Abb. 16).



▲ Abb. 15: Überprüfung auf Rekombinationsereignisse innerhalb der Chromosomen verschiedener für diese Arbeit wichtigen Mutanten. Dargestellt ist ein 1,2% Agarosegel (Pulsed Field Certificated Agarose, Biorad) in dem mit 20 Units *Xba*I-Restriktionsenzym behandelte chromosomale DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese unter Standardbedingungen aufgetrennt wurde. Marker: [M] Lambda Ladder PFG Marker BioLabs (kb: Kilo-Basen); 1: Wildtyp *S. Typhimurium*; 2: SL1344 $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF$; 3: SL1344 $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP$; 4: SL1344 $\Delta livJ \Delta livKHMGF \Delta brnQ$; 5: SL1344 $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP \Delta yejABEF$; 6: SL1344 $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr$; 7: SL1344 $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD$; 8: SL1344 $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta livJ$.

Wie aus Abb. 15 zu entnehmen ist, zeigen alle mit dem *Xba*I-Restriktionsenzym restringierten Chromosomen der einzelnen Mutanten (1-8) ein unterschiedliches Fragmentschema. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass durch jede zusätzlich eingefügte Mutation eine zusätzliche Schnittstelle für *Xba*I innerhalb der Chromosomen integriert wurde und das Restriktionsbild sich somit bei jeder Mutante unterscheidet. Insgesamt führt die zusätzliche Einbringung der *Xba*I-Restriktionsstellen zu einer starken Veränderung des Standardrestriktionsschemas des Wildtyp-Stammes 2958 (Spur 1).



▲ Abb. 16: Überprüfung auf Rekombinationsereignisse innerhalb der Chromosomen verschiedener für diese Arbeit wichtigen Mutanten. Dargestellt ist ein 1,2% Agarosegel (Pulsed Field Certified Agarose, Biorad) in dem mit 20 Units *AvrII*-Restriktionsenzym behandelte chromosomale DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese unter Standardbedingungen aufgetrennt wurde. Marker: [M] Lambda Ladder PFG Marker BioLabs (kb: Kilo-Basen); 1: Wildtyp *S. Typhimurium*; 2: SL1344 $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF$; 3: SL1344 $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP$; 4: SL1344 $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP \Delta yejABEF$; 5: SL1344 $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD$; 6: SL1344 $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta livJ$; 7: SL1344 $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr$; 8: SL1344 $\Delta livJ \Delta livKHMGF \Delta brnQ$; 9: SL1344 $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA$.

Wie aus Abb. 16 zu entnehmen ist, zeigen alle mit dem *AvrII*-Restriktionsenzym restringierten Chromosomen der einzelnen Mutanten das gleiche Fragmentschema wie der Wildtyp Stamm. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass keine Rekombinationen innerhalb der Chromosomen aufgetreten sind, was zwangsläufig zu einer Veränderung der Positionierung der für diesen Versuch verwendeten *AvrII*-Restriktionschnittstellen und somit zu einer inhomogenen Verteilung des Chromosomenfragmente im Vergleich zum restringierten Wildtyp-Chromosom (vgl. Spur 1 in Abb. 16) geführt hätte.

9.3 Analyse extra- und intrazellulärer Phänotypen

Um globale Auswirkungen der gesetzten Deletionen auf das intrazelluläre Replikationsverhalten der erzeugten Stämme untersuchen zu können und somit Rückschlüsse auf das vorhandene Nährstoffspektrum zu ziehen, wurden Invasions- / Replikations-Assays durchgeführt. Dabei wurde das intrazelluläre Wachstumsverhalten mutagenisierter Stämme gegen das des Wildtyp-Stammes verglichen. Dies erfolgte wie im

Teil Material und Methoden unter 8.10.2 beschrieben. Eine Übersicht aller erhobenen Ergebnisse wird in Tabellenform im Anhang unter 13.1 aufgeführt. Aufgrund der Fülle an Ergebnissen wird in den folgenden Textblöcken hauptsächlich auf Mutanten eingegangen, die wesentliche Veränderungen im intrazellulären Wachstumsverhalten aufzeigten. Diese werden mit Stammbezeichnung, dazugehöriger Deletion und statistisch erhobenen Daten (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, p=P-Wert) aufgeführt. Abzugleichende Diagramme, Wachstumskurven und Fotos sind dem betreffenden Textblock zugeordnet.

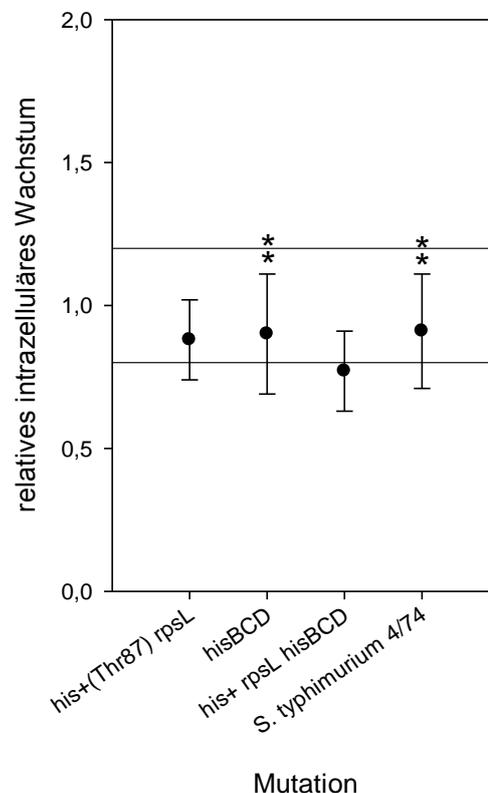
9.4 Histidin-Biosynthese

Der verwendete *S. Typhimurium* SL1344 Stamm 2958, der in den meisten Untersuchungen als Wildtyp-Referenzstamm diente, trägt eine Histidin-Auxotrophie (Hoiseth & Stocker, 1981). Dieser Phänotyp wurde erneut auf M9-Minimalmedium-Agar-Platten verifiziert. Da ein Großteil der für diese Arbeit verwendeten Mutanten SL1344 Derivate waren, trugen diese somit ebenfalls die besagte Histidin-Auxotrophie. Aus diesem Grund musste von Beginn an geklärt werden, ob diese einen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in den verwendeten Wirtszelltyp (LoVo) hatte oder nicht. Trotz seiner Histidin-Auxotrophie bleibt der Stamm SL1344 virulent (Wray & Sojka, 1978; Hoiseth & Stocker, 1981; Leung & Finlay, 1991). Für diese Promotion wurde dargestellt, dass auch in Erweiterung der Mutation kein Einfluss auf die intrazelluläre Replikation besteht. Dazu wurde der parentale Stamm 6144 (*S. Typhimurium* 4/74) des Histidin-auxotrophen Stammes 2958 (*S. Typhimurium his G46*) als auch verschiedene Histidin-prototrophe Revertanten bzw. auxotrophe Mutanten 3946 (*his+(Thr87)*), 6098 ($\Delta hisBCD$) und 6510 (*his+\Delta hisBCD*) mittels Invasions- / Replikations-Assay parallel analysiert.

Wie aus Abb. 17 (folgende Seite) ersichtlich ist, bestanden zwischen den prototrophen Stämmen 6144 (*S. Typhimurium* 4/74), 3946 (*his+(Thr87)*) und dem auxotrophen Stamm 6098 (*hisG46 \Delta hisBCD*) zum Referenzstamm 2958 (*S. Typhimurium hisG46*) keine signifikanten Replikationsunterschiede. Nur der Stamm 6510 (*his+(Thr87) \Delta hisBCD*) wies eine leichte Beeinträchtigung der Replikationsleistung auf, die im Diskussionsteil erneut aufgegriffen wird (S.118).

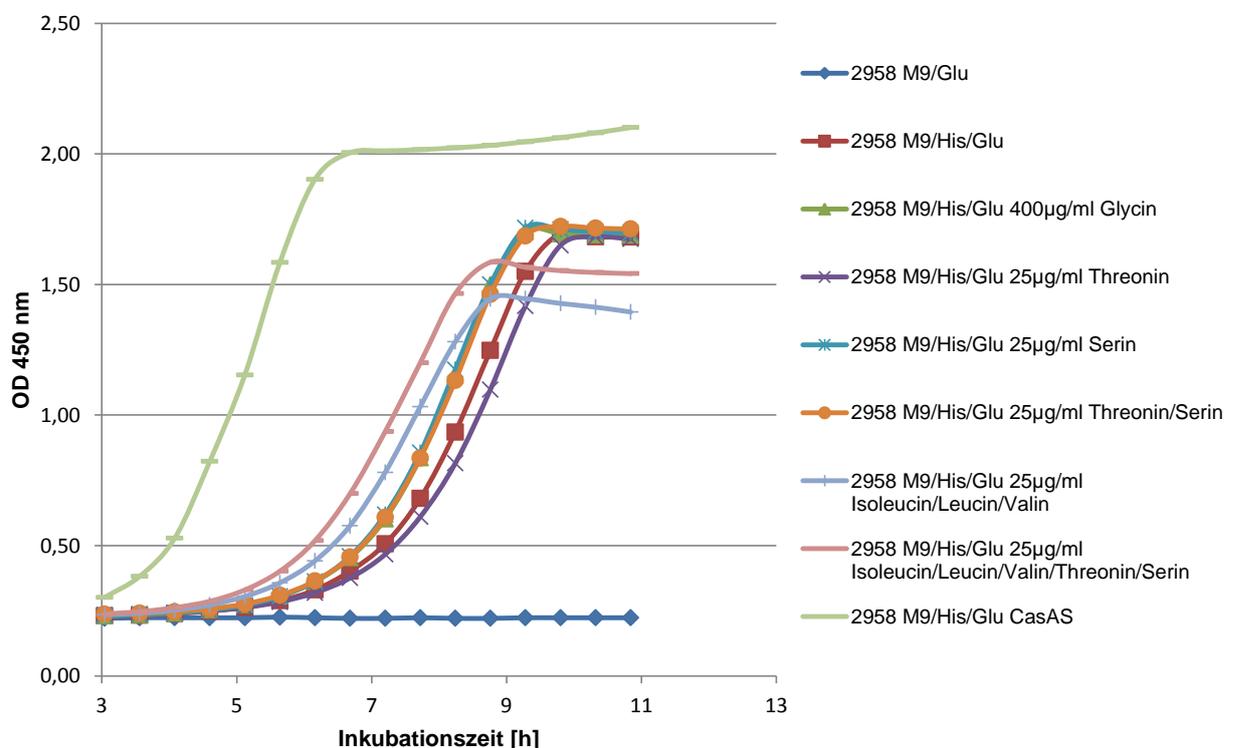
Das Ergebnis der Normierung des parentalen Histidin-prototrophen Stammes 6144 (*S. Typhimurium* 4/74), der zur Erzeugung des Referenzstammes 2958 diente, zeigt deutlich das die Histidin-Auxotrophie von 2958 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation ausübt. Ein identisches Ergebnis ließ sich mit dem revertant Histidin-prototrophen Stamm 3946 (*his+(Thr87)*) erzielen. Dies verifiziert den Stamm 3946 als zweiten Referenzstamm neben 2958.

Die zusätzliche Manipulation am Histidin-Biosyntheseweg durch die Deletion von *hisB*, *hisC* und *hisD* (vgl. Abb. 17 und Abschnitt 4.1 / Abb. 1) wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass Intermediate anderer Synthesewege oder des Wirtes die Biosynthese von Histidin unterhalten können. Somit wurde festgestellt, dass die Histidin-Biosynthese unterbunden ist und Histidin, in welcher Form auch immer, selbst von der Wirtszelle bzw. aus dem Medium stammen muss. Die Deletion von *hisBCD* im *his+*(Thr87) Hintergrund diente der Überprüfung des revertanten Histidin prototrophen parentalen *S. Typhimurium* intrazellulärer Nische. Beide Stämme, 3946 und 6510, verhalten sich leicht unterschiedlich hinsichtlich ihrer intrazellulären Replikationsleistung. Der Stamm 6510 (*his+ ΔhisBCD*) fällt leicht unterhalb der Laborinternen 20%-Begrenzung. Die möglichen Gründe für diesen intrazellulären Phänotyp werden im Diskussionsteil aufgeführt (S.118-119).



▲ Abb.17: Intrazelluläres Replikationsverhalten in Abhängigkeit unterbundener Histidin-Biosynthese: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 3946 (*his+* (Thr87)), 6098 ($\Delta hisBCD$), 6510 (*his+* (Thr87) $\Delta hisBCD$) und 4/74 normiert und analysiert. Histidin-Auxotrophie bzw. -Prototrophie bewirkt keine signifikante Beeinträchtigung aller untersuchten Stämme. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streuungsbereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

Die Beobachtung, dass der Stamm 3946 (*his+* (Thr87)) ohne Histidin-Supplementierung auf M9-Minimal-Agar-Platten kultiviert werden konnte, während der Stamm 6510 (*his+* (Thr87) $\Delta hisBCD$) nicht ohne die Supplementierung mit Histidin wuchs, unterstützt im Abgleich mit den Invasions- / Replikations-Assay Daten die Annahme des Vorhandenseins von Histidin als freie oder gebundene Aminosäure in Peptidform im vakuolären Milieu, was im Diskussionsteil erneut aufgegriffen wird (S. 118-119). Die in Abb. 17 dargestellten Mutanten weisen ausschließlich Deletionen in den Biosynthesewegen für Histidin auf. Für die Histidin-Aufnahmesysteme (Ames & Lever, 1970 und 1972; Higgins *et al.*, 1982) fanden keine näheren Untersuchungen statt.



▲ Abb. 18: Beispielhaftes Wachstum des Stammes 2958 auf M9-Flüssigmedium mit verschiedenen Supplementen. Folgende Medien wurden verwendet: M9/Glu (M9-Medium mit Glukose) und M9/His/Glu (M9-Medium mit Glukose und mit 25 µg/ml Histidin). Dem letztgenannten Medium wurden zusätzliche Aminosäuren zugegeben: Glycin (400 µg/ml); Threonin (25 µg/ml), Serin (25 µg/ml) und Isoleucin, Leucin und Valin (jeweils 25 µg/ml). Die Supplementationen wurden miteinander variiert. Als undefinierte Aminosäure und Peptidquelle diente ein durch Säure hydrolysierte Caseinsuspension (CasAS; 25 µg/ml), in der kein Tryptophan vorhanden war.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die Histidin-Auxotrophie keinen bzw. nur sehr geringen Einfluss auf die Replikation innerhalb der verwendeten humanen intestinalen Epithelzelllinie LoVo hat. Eine zusätzliche Analyse (vgl. Abb. 18) des Stammes 2958 wurde hinsichtlich seines Wachstumsverhaltens

innerhalb von M9-Flüssig-Minimalmedium, supplementiert mit verschiedenen Aminosäure und Peptiden, durchgeführt. Dies diente als Ausgangspunkt für Vergleichsstudien mit Derivaten von 2958, bei denen durch Deletion verschiedenste Aminosäure-Biosynthesewege und Aufnahmesysteme unterbunden bzw. entfernt vorlagen, die aber auf dem gleichen Flüssigmedium wie der Referenzstamm 2958 kultiviert wurden.

9.5 C1-Metabolismus relevante Aminosäuren Serin, Threonin und Glycin

Der C1-Metabolismus als einer der zentralen Stoffwechselprozesse ist für die Erforschung der intrazellulären Replikation von *S. Typhimurium* und der damit in Verbindung stehenden Metabolite von äußerstem Interesse. Nicht nur wegen der vernetzten biosynthetischen Interaktionen bestimmter Aminosäuren wie Serin, Cystein, Methionin, Aspartat, Threonin und Glycin bzw. der verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin sondern auch in seiner Rolle als Hauptlieferant von methylierten Tetrahydrofolat (mTHF) das für verschiedenste Mechanismen in der Zelle eine Rolle spielt (siehe Abs. 4.2 und 4.2.1), rückt der C1-Metabolismus in den Arbeitsfokus dieser Promotion. Ein anderer interessanter Aspekt des C1-Metabolismus ist die Generierung von Acetyl-CoA bzw. Pyruvat als Teilbereich des biochemischen Orchesters für die intrazelluläre Replikation.

Ausgehend von der Fragestellung welche Rolle jede der oben erwähnten Aminosäuren und Metabolite bzw. relevante Transportsysteme für Serin und Threonin für das intrazelluläre Wachstum spielen, wurden Invasions- / Replikations-Assays mit Mutanten, die Einzeldelationen bzw. Kombinationen dieser trugen, durchgeführt. Die auf den Referenzstamm 2958 normierten Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 19 dargestellt. Auffällig ist, dass in Abb. 19 nur vier einzelne oder in Kombination vorliegende Mutationen eine starke Veränderung der intrazellulären Replikation bewirkten. Drei weitere liegen im unteren Begrenzungsbereich des laborinternen Streuungsbereiches. Auf diese sieben Stämme wird im Folgenden eingegangen. Alle anderen Mutationen / Mutanten, die in der Serin-, Glycin-, Threonin-, Isoleucin- und Aspartat-Aminosäure-Biosynthese bzw. bei der Regulation eine Rolle spielen, führten nicht zu einer nennenswerten Verschlechterung des intrazellulären Wachstums. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da selbst der Wegfall essentieller biosynthetischer Reaktion und die dadurch hervorgerufenen Auxotrophien (M9-Minimalmedium verifiziert) [Daten nicht gezeigt], nicht in einem Wachstumsdefekt auf intravakuolärer Ebene münden. Welche Rückschlüsse ableitbar sind, wird im Diskussionsteil eingehend erörtert (S. 119-124).

denen gezeigt worden ist, dass nach dem über die Konversion von Serin zu Glycin mittels *glyA* und THF und dem daraus resultierenden 5,10-mTHF, 60% - 70% der von der Zelle benötigten C1-Komponenten synthetisiert werden (Dev & Harvey, 1984).

Für die *in vitro*-Versuche musste stets Glycin zu den Infektionsvorkulturen supplementiert werden, um ein annähernd Wildtyp-gleiches Wachstum zu generieren und um ausreichend Zellmaterial für die Infektionsversuche zu generieren. Nach 24 Stunden post Infektion konnten in niedrigen Verdünnungsstufen *Salmonella* Δ *glyA*-Mutanten nachgewiesen werden (rund 10% intrazelluläre Replikation). Dieses Ergebnis bestätigt das Unvermögen des *gcvTHP*-Systems, den hohen Bedarf an methylierten THF zu decken. Somit spiegelt die verschwindend geringe intrazelluläre Replikation (10% im Vergleich zum Wildtyp) der Δ *glyA*-Mutanten indirekt die mTHF-Biosyntheseleistung unter den vakuolär zugänglichen Nährstoffvorkommen wieder. Zusammenfassend ist auszuführen, dass unter Beachtung der gesammelten Daten die Ermangelung an methyliertem THF hauptverantwortlich für die geringe intrazelluläre Replikationsleistung zu sein scheint und somit keinen direkten Rückschluss auf das intravakuoläre Nährstoffangebot gibt.

Der Phänotyp der Aspartat-Aminotransferase (*aspC*) (in Einzeldelation) in dem Stamm 6182 (MW: 0,81; SD: 0,18; $p > 0,05$) bewirkte einen leichten Replikationsrückgang, der immer noch im Streubereich ($\pm 0,2$ des Wildtyps) liegt, sich aber dennoch im Grenzbereich bewegt und hier näher beleuchtet werden soll. Die Aminosäure Aspartat dient als Vorläufermolekül für die Synthese von Lysin und Homoserin. Letzteres dient seinerseits als Vorläufermolekül für die Synthese von Threonin bzw. Methionin und ist somit ein wichtiger Bestandteil des C1-Stoffwechsels. Wie im Einleitungsteil bereits aufgeführt (vgl. Abb. 3 und 7) spielt die Aspartat-Aminotransferase (*aspC*) auch bei der Synthese von Tyrosin und Phenylalanin eine Rolle (Pittard, 1987,1996)

Ebenfalls von Interesse waren die zuvor von Van Dyk (1986) gemachten Beobachtungen, dass eine Deletion von *aspC* (Aspartat-Aminotransferase) in *S. Typhimurium* bei einer Zugabe von Tyrosin zum Kulturmedium eine Wachstumsinhibierung hervorrief. Diskutiert wurde in diesem Zusammenhang eine Akkumulation von α -Ketobutyrat, resultierend aus der Inhibierung der Acetohydroxy-Säure-Synthase II (Acetolaktat-Synthase II), welche eine Rolle bei der Synthese von verzweigtkettigen Aminosäuren einnimmt. Der Einfluss von höheren α -Ketobutyrat-Konzentrationen auf den Organismus wurde bereits in seinen Auswirkungen im Einleitungsteil (Abs. 4.3) beschrieben und könnte für die reduzierte Replikationsleistung verantwortlich sein. Im vorliegenden Ergebnis zur *aspC*-Deletion muss festgehalten werden, dass ein leichter Replikationsrückgang im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurde. Da auf M9-Festmedium-Platten ohne die Supplementierung von Aspartat dennoch Wachstum zu beobachten war, konnte eine Auxotrophie für Aspartat nicht generiert

werden. Dies weist darauf hin, dass eine andere Aminotransferase als die durch *hisC* oder *tyrB* kodierten auf M9-Festmedium bzw. *in vitro* die Syntheseleistung übernimmt. Dies wird erneut im Diskussionsteil aufgegriffen (S. 120).

Um einen genaueren Überblick über das vorhandene Nährstoffspektrum zu erhalten, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Kombination der Einzeldelationen hergestellt.

Eine andere Mutante, die unterhalb der Streuungsbereichsgrenze lag, war die $\Delta serA$ - Δkbl - tdh -Mutante (Stamm 6562) (MW: 0,79; SD: 0,1; $p < 0,01$), bei der die Serin-Biosynthese sowie der Threonin-Katabolismus zur Erzeugung von Glycin unterbunden ist. Auf M9-Agar-Platten konnte die Mutante nur auf Festmedium kultiviert werden, welches Serin enthielt. Die Supplementation mit Threonin allein führte nicht zur erfolgreichen Kultivierung, was Aufschluss über die Funktion des *ItaA*-Produktes gibt. Somit kann zusätzliches, zum biosynthetisch erzeugten Threonin, intrazellulär zugängliches Threonin, nicht kompensatorisch den Mangel an Serin über das *ItaA*-System ausgleichen. Zusammen mit den *in vitro* gesammelten Daten bedeutet dies, dass Serin bzw. Glycin, in welcher Form auch immer, zugänglich sind und das intravakuoläre Wachstum der Mutante bedingen.

Die dreifach-Mutante $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl$ - tdh (Stamm 6240) bewegte sich ebenfalls im engen Streuungsbereich. Dabei handelt es sich um eine Serin und Threonin abhängige Mutante. Ähnlich zu den Deletionen in Stamm 6954 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta ilvA$), sind die Biosynthesen von Threonin und die von Serin aus 3-Phosphoglycerat (3PG) unterbunden. Dazu wird der Katabolismus von Threonin in Richtung Glycin durch die Deletion von *kbl*-*tdh* unterbunden. Als alternative Route steht weiterhin die Umformung von Threonin zu Glycin via *ItaA*-Produkt theoretisch offen. Da aber M9-Plattentests mit dem Stamm 6562 ($\Delta serA \Delta kbl$ - tdh) nahelegten, dass das *ItaA*-System unter den gewählten Bedingungen nicht funktionell erscheint, muss die Funktion des *ItaA*-Systems in diesem Zusammenhang mit Vorsicht betrachtet werden. Die Theronin- und Serin-Abhängigkeit konnte auf M9-Agar-Platten bestätigt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Einzelsupplementierungen der Aminosäuren Serin, Threonin bzw. Glycin nicht zu Wachstum auf dem Festmedium führten. Erst eine Kombination von Serin und Threonin ermöglichte dies. Intrazellulär unterscheidet sich die $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl$ - tdh -Mutante vom Wildtyp dahingehend, dass es zu einem leichten Replikationsrückgang kam, was erneut auf das Vorhandensein von Serin, Glycin und Threonin schließen lässt und im Diskussionsteil vertieft wird (S. 121-123).

Eine andere auffällige Mutante ist der Stamm 6142 (*his*⁺ 3946 Hintergrund) (MW: 0,71; SD: 0,26; $p > 0,05$), der die Deletionen $\Delta serA \Delta kbl$ - $tdh \Delta itaA$ trug. Der Phänotyp kombiniert eine revertante Histidin-Prototrophie zusammen mit einer Inhibierung der Serin-Biosynthese (aus 3-Phosphoglycerat) und einem vollständig unterbunden Threonin-

Katabolismus (in Richtung der Glycin-Biosynthese). Diese Mutationen erzeugten eine intrazelluläre Abhängigkeit für die Aminosäuren Serin und Glycin. Der Bedarf an Serin in dieser Mutante müsste wesentlich höher sein, da die Biosynthese von Glycin über den Katabolismus von Threonin unterbunden wurde und der Bedarf an beiden Aminosäuren gedeckt werden muss. Wie aus den Untersuchungen zu den Deletionen im Histidin Biosyntheseweg hervorging, spielt die revertante Histidin-Prototrophie für die Auswertung der erhobenen Daten keine Rolle, da die Untersuchungen zeigten, dass intravakuolär Histidin vorliegt und somit nicht synthetisiert werden muss. Durch das Einfügen weiterer Deletionen war es möglich, einen noch genaueren Blick auf die vorhandenen C1-Stoffwechsel-relevanten Aminosäuren zu werfen.

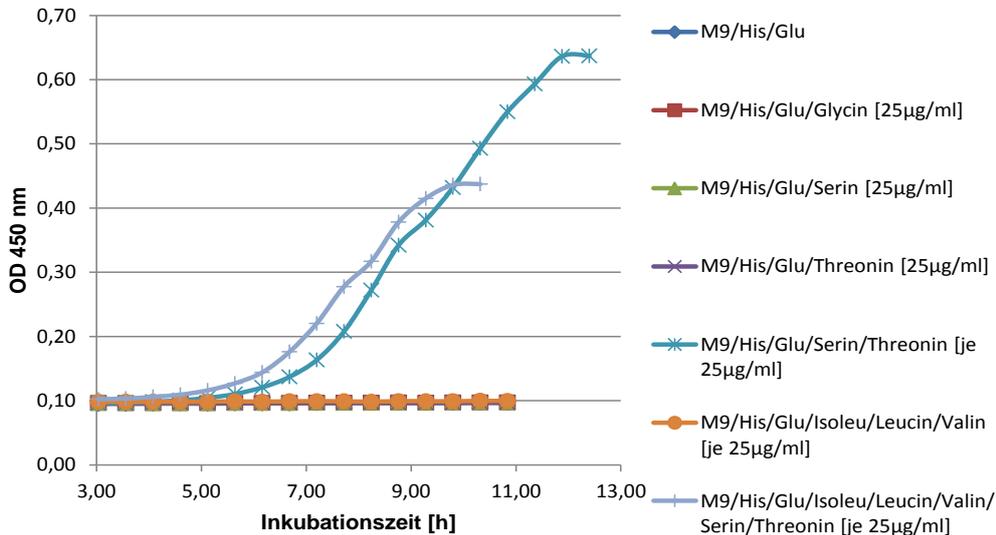
Die Mutante mit den Deletionen $\Delta serA$, $\Delta thrBC$, $\Delta kbl-tdh$ und $\Delta ltaA$ (Stamm 6246) (MW: 0,49; SD: 0,19; $p < 0,001$) wies eine signifikante Beeinträchtigung (~49%) der intrazellulären Replikation auf. Bei dieser Mutante wurden sowohl die Serin- und Threonin-Biosynthese als auch der Threonin-Katabolismus unterbunden. In dieser Mutante wurde der Threonin-Katabolismus vollständig in Richtung Isoleucin umgelenkt und die Mutante abhängig von Threonin gemacht. Hier stellt sich die Frage, warum es zu einer signifikanten Replikationseinschränkung kommt, wenn die Mutante Threonin in Richtung Isoleucin-Biosynthese katabolisieren muss.

Interessant in diesem Zusammenhang ist das Einfügen einer zusätzlichen Mutation in den zuvor beschriebenen $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA$ -Hintergrund. Die zusätzliche Deletion des *ilvA*-Gens (Threonin-Dehydratase) in Stamm 6956 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA \Delta ilvA$) bewirkt eine annähernde Normalisierung der zuvor entstandenen Replikationseinschränkung. Die Threonin-Dehydratase (*ilvA*) wandelt Threonin in α -Ketobutyrat um, welches im Anschluss seinerseits durch die *ilvGM* und *ilvIH* kodierten Acetohydroxy-Säure-Synthasen II und III zu Isoleucin umgebaut wird. Durch die Deletion von *ilvA* ist die Synthese von α -Ketobutyrat unterbunden bzw. die Synthese von Isoleucin beeinträchtigt. Welche dieser Metabolite letztlich für die beobachtete Replikationsbeeinträchtigung verantwortlich ist, wird im Diskussionsteil ausführlich beschrieben (S. 122-123). Allerdings ist schon jetzt auf die im Einleitungsteil erwähnten Vernetzungen und Wirkspektren von α -Ketobutyrat zu verweisen.

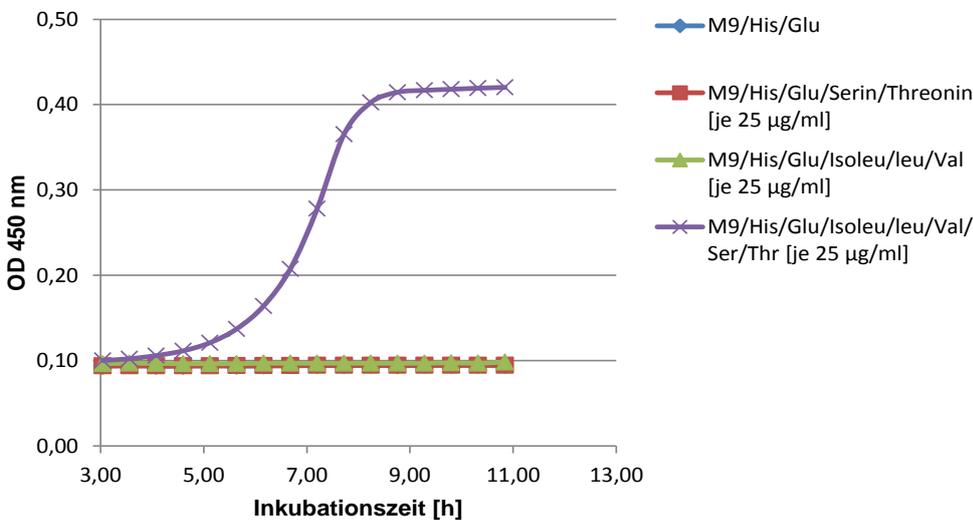
Um zu überprüfen, auf welchen Aminosäure-Substrat(en) die Stämme 6246 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA$) und 6956 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA \Delta ilvA$) kultivierbar sind, fanden Wachstumsversuche auf supplementiertem M9-Flüssigmedium statt (vgl. Abb. 20). Die zusätzliche Deletion von *ilvA* des Stammes 6956 führte zu einem Unvermögen, auf den Aminosäuren Serin und Threonin zu wachsen. Dieses Ergebnis konnte auch auf

supplementiertem M9-Festmedium verifiziert werden. Weder konnte Wachstum auf M9-Festmedium mit Glycin allein, mit Serin und Threonin zusammen oder mit Valin, Isoleucin und Leucin in Kombination beobachtet werden.

ΔserA ΔthrBC Δkbl-tdh ΔltaA (Stamm 6246)



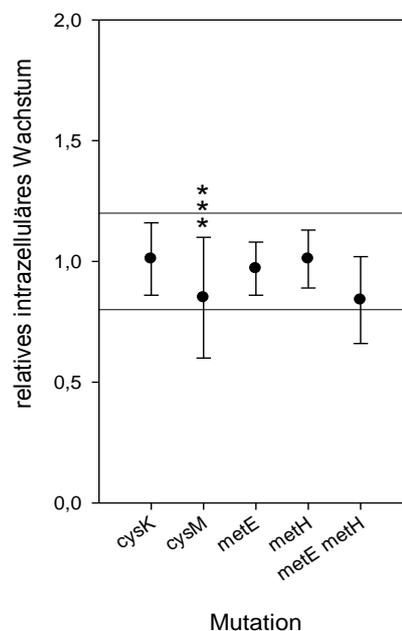
ΔserA ΔthrBC Δkbl-tdh ΔltaA ΔilvA (Stamm 6956)



▲ Abb. 20 : Beispielhaftes Wachstum der Stämme 6246 (obere Wachstumskurven) und 6956 (untere Wachstumskurven) auf M9-Medium Flüssigmedium mit verschiedenen Supplementen. Folgende Medien wurden verwendet: M9/His/Glu (M9-Medium mit Glukose und mit 25 µg/ml Histidin). Dem letztgenannten Medium wurden zusätzliche Aminosäuren zugegeben: Threonin (25 µg/ml), Serin (25 µg/ml) und Isoleucin, Leucin und Valin (jeweils 25 µg/ml). Die Supplementationen wurden miteinander variiert.

9.6 Die Rolle der Cystein- und Methion-Biosynthese

Die Cystein-Biosynthese war aufgrund ihrer Verbindung zum C1-Metabolismus bzw. der als Vorläufermolekül wirkenden Aminosäure Serin von Interesse für diese Arbeit. Wie in der Einleitung unter Abs. 4.4 beschrieben, wird Serin durch die *cysE* kodierte Serin-Transacetylase und Acetyl-CoA zu O-Acetylserin umgeformt. Dieses dient seinerseits als Substrat für die O-Acetylserin-Sulphydrolase A (*cysK*) bzw. der bifunktionalen O-Acetylserin-Sulphydrolase B (*cysM*). Bei den Einzeldelationen von $\Delta cysK$ oder $\Delta cysM$ konnte die Cystein-Auxotrophie nicht bestätigt werden. Aufgrund der räumlichen Nähe auf dem Chromosom der beiden Gene sowie weiteren dazwischen liegenden Genen war die Erzeugung einer Doppelmutante mit der verwendeten Mutagenisierungsmethode nicht möglich. Für beide Einzeldelationen $\Delta cysK$ (Stamm 6152) als auch für $\Delta cysM$ (Stamm 6156) konnte keine signifikante Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation beobachtet werden (vgl. Abb. 21).



▲ Abb. 21: Relatives intrazelluläres Wachstum von Biosynthesemutanten für Cystein und Methionin: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 6152 ($\Delta cysK$), 6156 ($\Delta cysM$), 6148 (*metE*), 6160 (*methH*) und 6310 ($\Delta metE \Delta methH$) normiert und analysiert. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Manipulation der Methionin-Biosynthese beobachtet. Die Einzeldelation als auch die kombinierte Deletion der Gene *metE* (5-Methyltetrahydropteroyltrimethylglutamat / Homocysteine-S-Methyltransferase) in Stamm 6148 und *methH* (B12-abhängige Methionin-Synthase) in Stamm 6160, führten nicht zu signifikanten

Beeinträchtigungen der intrazellulären Replikation (vgl. Abb. 21). Auf M9-Festmediumplatten konnte nur für die Doppelmutante $\Delta metE \Delta methH$ (Stamm 6310) die angestrebte Methionin-Auxotrophie bestätigt werden. Durch die *in vitro* gesammelten Daten der Methionin-auxotrophen Doppelmutante ($\Delta metE \Delta methH$) lässt sich ableiten, dass diese Aminosäure Methionin ebenfalls im vakuolären Milieu vorhanden sein muss, was im Diskussteil erneut aufgegriffen wird (S. 124) (vgl. Abb. 21).

9.7 Die Rolle der Aminosäuren Arginin und Prolin

Der Biosyntheseweg der Aminosäure Arginin war u.a. wegen seiner Bedeutung für die Synthese von Polyaminen für diese Arbeit relevant. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss einer Deletion des für die Synthese des Vorläufermoleküls Ornithins verantwortlichen Genprodukts von *argE*, kodiert für die *N*-Acetylorithinase, untersucht. Ebenfalls wurden Deletionen im terminalen Bereich des Biosynthesewegs von Arginin gesetzt, um dessen Synthese zu unterbinden. Dies sollte Aufschluss über Abhängigkeiten vom Wirt, mögliche Regulationseffekte und etwaige vakuoläre Limitierungen geben.

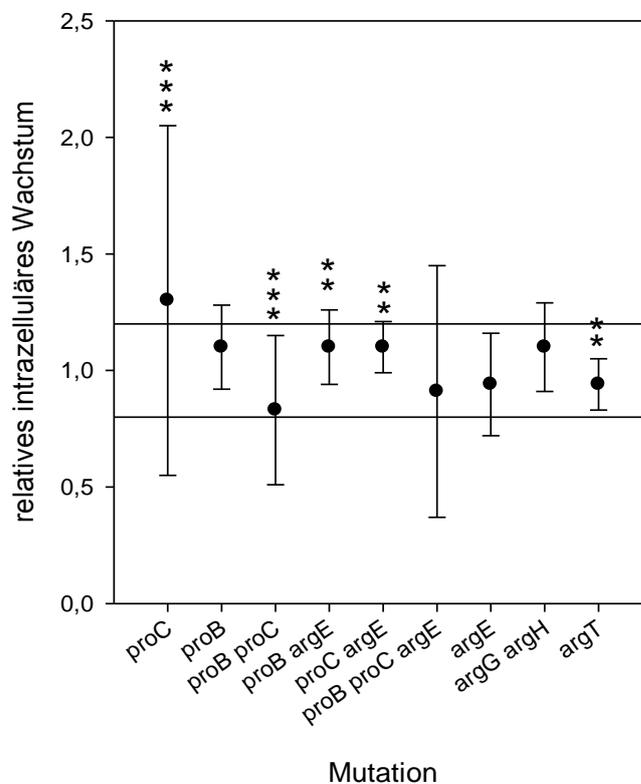
Sowohl der Biosyntheseweg der Aminosäure Prolin als auch die Aminosäure selbst waren aufgrund zweier Besonderheiten für diese Arbeit von Belang. Prolin selbst dient vielen Mikroorganismen als Osmoprotektant, was die Vermutung zulässt, dass intrazelluläre *Salmonella* Prolin nutzen, um sich in ihrer membrangebundenen Nische zu stabilisieren (Wood, 1988; Csonka & Hanson, 1991; Csonka *et al.*, 1994; Foster & Spector, 1995).

Andererseits bestehen zwischen den Biosynthesewegen von Arginin und Prolin Verbindungen, aus denen sich möglicherweise synergetische Effekte unter intrazellulären Bedingungen ableiten lassen. So werden beide Aminosäuren aus dem gleichen Vorläufermolekül L-Glutaminsäure synthetisiert. Des Weiteren kann das Zwischenprodukt L-Glutamat- γ -semialdehyd in der Prolin-Biosynthese aus dem in der Arginin-Biosynthese entstehenden Zwischenprodukt *N*-Acetylglutamat- γ -semialdehyd über die zuvor bereits beschriebene *N*-Acetylorithinase (*argE*) synthetisiert werden (vgl. Abb. 8). Somit sind beide Biosynthesewege sowohl über das Substrat selbst als auch über die Umformung von Zwischenprodukten miteinander verbunden.

Die Deletion von *proC* (Stamm 6500) (MW: 1,3; SD: 0,75; $p < 0,001$) bewirkte eine leichte intrazelluläre Replikationszunahme. Das Fehlen der durch *proC* kodierten L-Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase bedingt die Unterbindung des finalen Syntheseschrittes von Prolin aus L-Pyrrolin-5-Carboxylat und NADPH. Was die möglichen Konsequenzen für den intrazellulären Phänotyp sein könnte, wird im Diskussteil erneut aufgegriffen (S.124-125).

Die Einzeldelation des Gens *proB* (Stamm 6420) als auch die Kombinationsdelation $\Delta proB \Delta proC$ (Stamm 6426) bewirkten keine signifikante Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation. Auf M9-Festmediumplatten konnten Prolin-Auxotrophien für $\Delta proC$ - und $\Delta proB$ -Mutanten bestätigt werden. Die Befunde verweisen in Abstimmung mit den *in vitro* gesammelten Daten auf das Vorhandensein von Prolin als freie oder in Peptidform gebundene Aminosäure im vakuolären Milieu, was im Diskussionsteil erneut vertiefend beleuchtet wird (S.124-125).

Bei den Stämmen, in denen die Genkombination $\Delta proB \Delta argE$ (Stamm 7064), $\Delta proC \Delta argE$ (Stamm 7066) und $\Delta proB \Delta proC \Delta argE$ (Stamm 7068) deletiert wurden, konnte kein inhibierender Einfluss beobachtet werden (vgl. Abb. 22).



▲ Abb. 22: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum von Prolin- und Arginin-Biosynthese- bzw. Transport-Mutanten: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 6500 ($\Delta proC$), 6420 ($\Delta proB$), 6426 ($\Delta proC \Delta proB$), 7062 ($\Delta argE$), 6788 ($\Delta argT$), 5398 ($\Delta argG \Delta argE$), 7064 ($\Delta proB \Delta argE$), 7066 ($\Delta proC \Delta argE$) und 7068 ($\Delta proB \Delta proC \Delta argE$) normiert und analysiert. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

Alle drei Stämme wiesen sowohl für Arginin- als auch für Prolin-Auxotrophien auf, die mittels M9-Festmedium bestätigt wurden. Dies ist erneut ein deutliches Indiz für das Vorhandensein von Arginin und Prolin im intravakuolären Milieu und wird im Diskussionsenteil näher beleuchtet (S. 124-125).

Durch die Deletion des Gens *argE* (Stamm 7062) wird die Synthese von Arginin als auch Ornithin unterbunden. Da die Mutante keine intravakuoläre Beeinträchtigung erfährt, kann abgeleitet werden, dass Arginin in ausreichenden Mengen vorhanden ist, um sowohl die Polyamin-Synthese als auch den Arginin-Bedarf selbst zu decken. Die entstandene Arginin-Auxotrophie konnte auf M9-Festmedium verifiziert werden.

Die Deletionskombination von *argG* mit *argH* (Stamm 5398; $\Delta argG \Delta argH$) bewirkte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (vgl. Abb. 22). Die Deletionen von Enzymen, verantwortlich für Reaktionen im terminalen Bereich des Biosynthesewegs von Arginin (für letzte zwei katalytischen Reaktionen), führen vor Augen, dass Arginin, in welcher Form sei dahin gestellt, in ausreichenden Mengen sowohl für die in der SCV stattfindenden katabolen als auch anabolen Prozesse zur Verfügung steht.

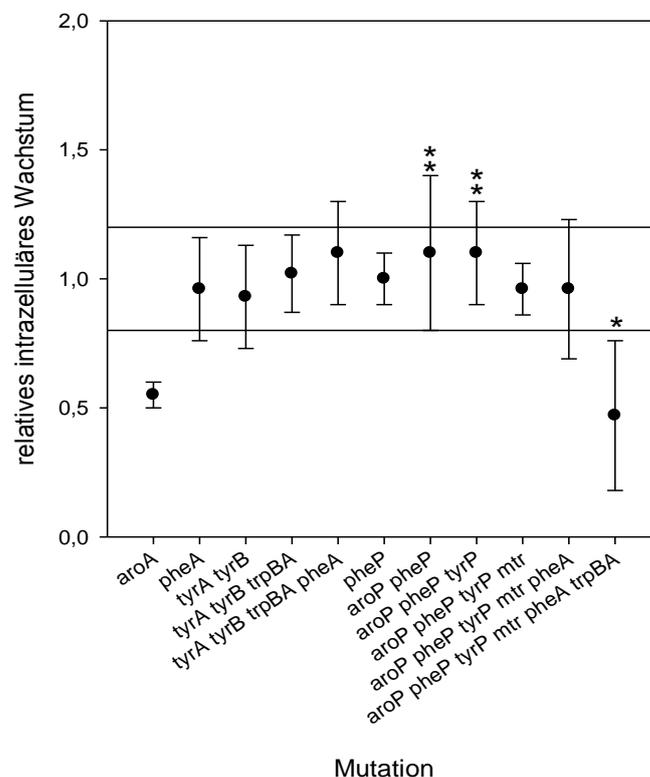
Um die Rolle von *argE* für die Prolin-Synthese zu analysieren (vgl. Abb. 22), wurde die Rolle eines für den unspezifischen Transport von Arginin verantwortlichen Bindeproteins, kodiert durch *argT*, in Stamm 6788 untersucht. Auch hier wurde kein Unterschied zum intrazellulären Replikationsverhalten des Wildtypstammes festgestellt. Dies ist ein sehr interessantes Ergebnis und wird im Diskussionsteil erneut aufgegriffen (S.125).

9.8 Die Rolle der aromatischen Aminosäuren

Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin war aufgrund ihrer besonderen Verkopplung von gemeinsamen intermediären Metaboliten von entscheidendem Interesse für diese Arbeit. Wie in der Einleitung bereits dargestellt (vgl. Abs. 4.6), liegt der Synthese aller drei genannten Aminosäuren das gleiche Vorläufermolekül (Chorismat) zu Grunde. Chorismat selbst dient aber nicht nur als Vorläufermolekül für die Synthese der genannten aromatischen Aminosäuren, sondern spielt auch als Bestandteil in der Synthese von Folsäure, Enterochelin bzw. Salmochelin und Ubiquitin (Hagervall *et al.*, 1990) eine wichtige Rolle. Da die biochemischen Verkettungen und die Komplexität des Systems die Deletion von *aroA* bzw. die Unterbindung der Synthese von Chorismat eine Analyse der einzelnen aromatischen Aminosäuren unterminieren, wurden gezielte Deletionen in den für die Synthese der aromatischen Aminosäuren betreffenden Wegen

gesetzt. Somit wurde vermieden, dass die Siderophor-Synthese oder der Folsäure- und Ubichinon-Haushalt beeinträchtigt und so die Ergebnisse verfälscht wurden.

Zur näheren Betrachtung wurden zu Beginn der Analyse die biosynthetisch relevanten Gene *aroA*, *pheA*, *tyrA* bzw. *tyrB* und *trpBA* untersucht. Die Deletion von *aroA* (Stamm 7230) (MW: 0,55; SD: 0,05; $p > 0,05$) führte, wie vermutet, zu einer Reduktion der intrazellulären Replikation (vgl. Abb. 25). Eine tiefgehende Analyse der *aroA*-Deletion wird im Zusammenhang mit *para*-Aminobenzoat erneut aufgegriffen und ist unter Abs. 9.11 aufgeführt. Die Einzeldelation des Gens *pheA* (bifunktionelles Enzym, Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydratase) in dem Stamm 6190 sowie die Doppeldelation der Gene *tyrA* (bifunktionelles Enzym, Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase) und *tyrB* (Tyrosin-Aminotransferase) in Stamm 5418 erbrachte keine signifikante Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation (vgl. Abb. 23).



▲ Abb. 23: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum von aromatischen Aminosäure-Biosynthese bzw. Transport-Mutanten: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 7230 (Δ *aroA*), 6190 (Δ *pheA*), 5954 (Δ *pheP*), 5418 (Δ *tyrA* Δ *tyrB*), 5762 (Δ *tyrA* Δ *tyrB* Δ *trpBA*), 5768 (Δ *tyrA* Δ *tyrB* Δ *trpBA* Δ *pheA*), 5588 (Δ *aroP* Δ *pheP*), 5668 (Δ *aroP* Δ *pheP* Δ *tyrP*), 5674 (Δ *aroP* Δ *pheP* Δ *tyrP* Δ *mtr*), 6220 (Δ *aroP* Δ *pheP* Δ *tyrP* Δ *mtr* Δ *pheA*) und 6292 (Δ *aroP* Δ *pheP* Δ *tyrP* Δ *mtr* Δ *pheA* Δ *trpBA*) normiert und analysiert. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0,05$; (**), $p < 0,01$; (***), $p < 0,001$

In Überprüfung auf supplementiertem M9-Festmedium konnten die erzeugten Auxotrophien für Phenylalanin und Tyrosin verifiziert werden. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Phenylalanin als essentielle Aminosäure und Tyrosin in ausreichender Menge, ob gebunden oder als freie Aminosäure, intravakuolär vorlagen, was im Diskussionsteil erneut aufgegriffen (S.125-126) wird.

Auch der für Tryptophan- und Tyrosin-auxotrophe Stamm 5762 ($\Delta trpBA \Delta tyrA \Delta tyrB$) (M9-Festmedium verifiziert) als auch der für Phenylalanin-, Tryptophan- und Tyrosin-auxotrophe Stamm 5768 ($\Delta pheA \Delta trpBA \Delta tyrA \Delta tyrB$) (M9-Festmedium verifiziert), wiesen keine signifikante Veränderung der intrazellulären Replikation auf.

Nach der Analyse der biosynthetisch wichtigen Gene wurde der Arbeitsfokus auf die für die Transportsysteme kodierenden Gene gerichtet. Zu diesen zählen *pheP* (Phenylalanin-spezifische-Permease), *aroP* (aromatische Aminosäure-Permease), *tyrP* (Tyrosin-spezifische-Permease) und *mtr* (Tryptophan-spezifische-Permease). Die Deletion von *pheP* (Stamm 5954) allein, aber auch in Kombination mit *aroP* (Stamm 5588), *tyrP* (Stamm 5668) und *mtr* (Stamm 5674), veränderte die intrazellulären Replikation nicht signifikant zum Wildtyp (vgl. Abb. 23). Als logischer Schluss aus dieser Beobachtung ergibt sich, dass der benötigte Bedarf der aromatischen Aminosäuren über die intakten Biosynthesewege gedeckt wurde, was im Diskussionsteil erneut aufgegriffen wird (S. 126-129).

Um der Frage nachzugehen, in wieweit die Kombination von Deletionen bestimmter Biosynthesegene und transportrelevanter Systeme / Gene für aromatische Aminosäuren das intravakuoläre Wachstum beeinflusst, wurden weitere Kombinations-Mutanten erzeugt.

Wie aus der vorliegenden Untersuchung abzuleiten ist, entstand der intrazellulären *Salmonella*-Mutante mit dem Deletionshintergrund $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ (Stamm 6220) kein Replikationsdefizit im Vergleich zum Wildtypstamm (vgl. Abb. 23). Dieses Ergebnis wird im Diskussteil eingehend diskutiert (S. 126-129), da das Wildtyp-gleiche Wachstum möglicherweise durch eine Bypass-Reaktion bedingt ist und somit die angestrebte Auxotrophie nicht hergestellt werden konnte. Erst die Erweiterung der Deletion um $\Delta trpBA$ (Stamm 6292) (MW: 0,47; SD: 0,29; $p < 0,05$) ergab eine Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation (vgl. Abb. 23). Im Vergleich der Wachstumsraten zwischen Mutante (Stamm 6292) und dem Wildtyp ergab sich, dass diese ähnlich, wenn nicht sogar gleich erschienen (Daten nicht gezeigt). Das Wachstumsverhalten auf L-Broth-Agar-Platten als auch Flüssigmedium war nur zu Teilen durch die Zugabe von Casein-Aminosäure / Peptidgemisch kompensierbar. Der Deletionshintergrund $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$

$\Delta trpBA$ bewirkte, dass sich die Wachstumsrate wesentlich verlangsamte. Dies führte dazu, dass entweder mit einem höheren Inokulum gearbeitet werden musste oder dass für die durchgeführten Infektionsversuche die optische Dichte der anderen Kulturen angepasst wurde, um eine verhältnismäßig gleiche Zellzahl für die Infektion einsetzen zu können. Beide Herangehensweisen erbrachten vergleichbare Infektionsraten und intrazelluläre CFUs (Daten nicht gezeigt). Die Mutante wies auch auf M9-Agar-Platten nur in Supplementierung mit Casein-Behandlung hergestelltem Aminosäure- / Peptid-Medium Wachstum auf. Alle anderen Supplementierungen ließen eine Kultivierung nicht zu. Entscheidend ist folglich der gebundene Tryptophan-Anteil in den zur Verfügung stehenden Peptiden. Das Gleiche gilt auch für die Deletionskombinationen $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA \Delta tyrA$ und $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA \Delta tyrA \Delta tyrB$. Auch bei dieser Deletionskombination war es nicht möglich, über das angebotene Medium den Tyrosin-Bedarf, gebunden in Peptidform, zugänglich zu machen (Daten nicht gezeigt, da diese nach Beendigung der praktischen Arbeiten im Labor erhoben und bestätigt wurden, persönliche Mitteilung Dr. Tedin).

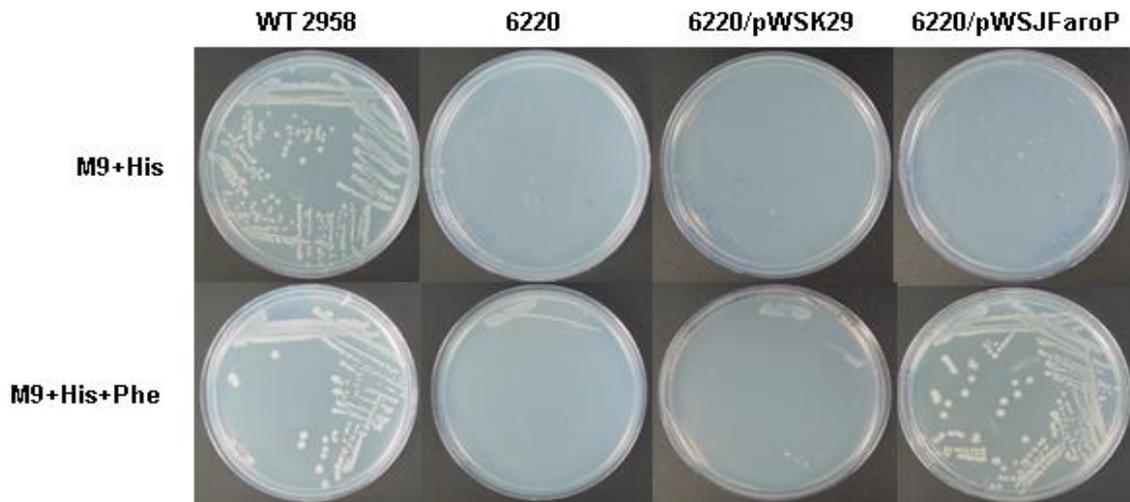
Im Anhang unter 14.2 D finden sich beispielhafte Invasions- / Replikations-Assays die nach Beendigung der hier vorliegenden Arbeit erstellt wurden aber für diese Arbeit von Belang sind (S. 148). Diese zeigen, dass eine gezielte Deletion von *aspC* (Aspartat-Aminotransferase) in Kombination mit *tyrB* (Tyrosin-Aminotransferase) welche die Biosynthese von Phenylalanin, Tyrosin und Aspartat unterbinden (vgl. Abb. 3 und 7), zwar zu einem intrazellulären Replikationsdefizit führen aber dennoch ein stetiges Wachstum auf intrazellulärer Ebene zeigen. Was dies bedeutet wird im Diskussionsteil erneut aufgegriffen (S. 140-141).

9.9 Hinweise für die intrazelluläre Verfügbarkeit von Peptiden für *Salmonella*

Der Deletionshintergrund $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ kombiniert sowohl Aufnahmesysteme aromatischer Aminosäure als auch die für die Phenylalanin-Biosynthese essentielle und bifunktionell wirkende Chorismat-Mutase bzw. Prephenat-Dehydratase (*pheA*). Die Chorismat-Mutase bzw. Prephenat-Dehydratase katalysiert die ersten beiden Reaktionen in Richtung des Endprodukts Phenylalanin aus dem Substrat Chorismat (vgl. Abb.6). Damit unterliegt der Stamm 6220 ($\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$) theoretisch einer biosynthetischen und transportbedingten Phenylalanin-Auxotrophie, da weder freies Phenylalanin aufgenommen noch synthetisiert werden kann. Um dies zu verifizieren, wurden Wachstumstests auf M9-Festmedium durchgeführt. Bei allen Wiederholungen des Experiments wurde sowohl auf Platten mit als auch ohne Phenylalanin getestet und der Wildtypstamm gegenübergestellt (vgl. Abb. 24).

Die $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ -Mutante konnte, wie aus Abb. 24 zu entnehmen ist, nicht auf/in Phenylalanin haltigen Fest- oder Flüssigmedien (nicht dargestellt) kultiviert

werden. Das Wachstum, welches im Anstrichbereich ersichtlich ist (vgl. Abb. 24), kann auf zwei Möglichkeiten zurückgeführt werden. Entweder handelt es sich dabei um Wachstum, welches durch Peptide von abgestorbenen Zellen zurückzuführen ist, oder das Wachstum im Anstrich ist auf die Akkumulation eines bestimmten Vorläufermoleküls, welches in Phenylalanin-auxotrophen Mutanten von *E. coli* akkumuliert, und so die Auxotrophie überbrückt, zurückzuführen. Im Diskussionsteil wird erneut auf die intrazellulären als auch auf Festmedium gemachten Beobachtungen eingegangen (S. 127).

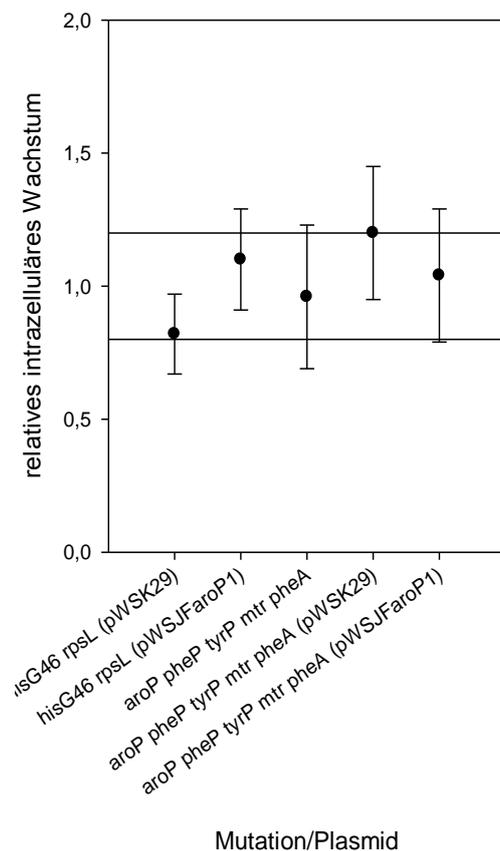


▲ Abb. 24: Bestätigung der Phenylalanin-Auxotrophie (biosynthetisch und Aufnahme freier Aminosäure betreffend) in der Mutante 6220 ($\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$). Dargestellt werden Histidin-M9-Festmediumplatten supplementiert mit und ohne Phenylalanin. Ersichtlich ist, dass der als Referenzstamm dienende Stamm 2958 sowohl mit als auch ohne Phenylalanin auf der gesamten Platte wächst. Im Gegensatz dazu präsentieren sich der Stamm 6220 und seine Derivate. Bis auf den Stamm 6220/pWSJFaroPI vermögen die Stämme 6220 und 6220/pWSK29 nicht auf dem Phenylalanin supplementiertem Festmedium zu wachsen. Nur im Anstrichbereich ist Wachstum zu verzeichnen. Die Komplementierung der Phenylalanin-Auxotrophie durch die Transformation mit dem Plasmid pWSJFaroPI und dem darin enthaltenen konstitutiv expremierten *aroP*-Gen (aromatische Aminosäure Permease) ermöglicht wieder die Aufnahme von Phenylalanin. Das Ursprungsplasmid pWSK29, das für die Erzeugung von pWSJFaroPI verwendet wurde, komplementiert die Phenylalanin-Auxotrophie nicht.

Um zu überprüfen, ob die erzeugte Auxotrophie komplementierbar war, wurde die Klonierung von *aroP* (*aroP*, aromatische Aminosäure-Permease) in einem „low-copy“ Plasmidvektor, pWSK29, unter die Kontrolle eines in *Salmonella* konstitutiv expremierten *lac*-Promotors durchgeführt. Die Verifizierung fand wie im Teil Material und Methoden (8.1.2) aufgeführt satt. Als Kontrolle diente das Ausgangsplasmid pWSK29.

Sowohl der komplementierte Stamm mit pWSJFaroPI (Stamm 6220/pWJFaroPI) als auch die mitgeführten Kontrollstämme des Wildtyp-Hintergrundes in Stamm 2958

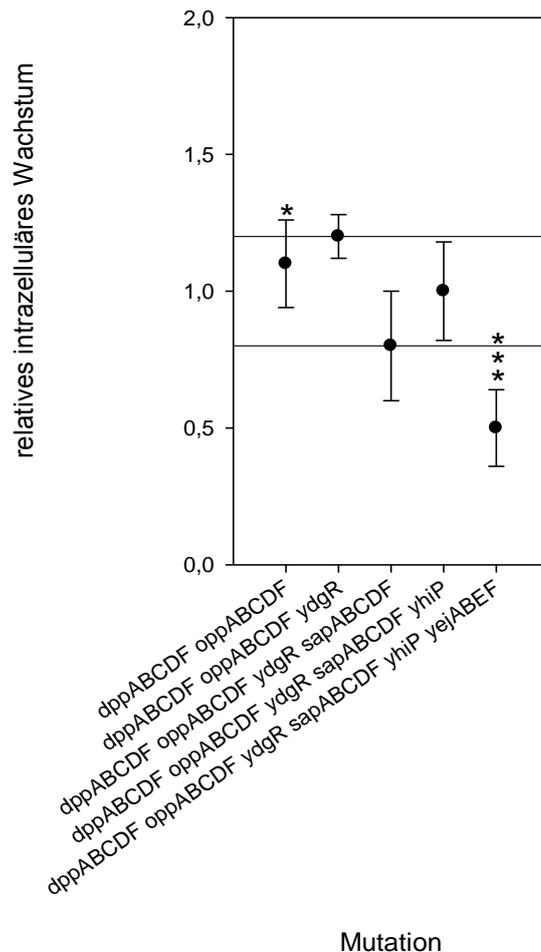
(2958/pWSK29 und 2958/pWSJFaroPI) wiesen keinen signifikanten Unterschied im Replikationsverhalten zum Wildtyp auf (vgl. Abb. 25). Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Ergebnissen nur bedingt abgeleitet werden, dass *S. Typhimurium* SL1344 unter den gewählten Kulturbedingungen *in vitro* einen intrazellulären Zugang zu Peptiden hat. Warum dies nicht klar ableitbar erscheint, wird letztlich im Diskussionsteil erörtert (S.126-128).



▲ Abb. 25: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum der Pheylalanin-auxotrophen Biosynthese und Transport-Mutante: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden das intrazelluläre Wachstum der *S. Typhimurium* Stämme 2958/pWSK29, 2958/pWSJFaroPI, 6220 (Δ aroP Δ pheP Δ tyrP Δ mtr Δ pheA), 6220/pWSK29 und 6220/pWSJFaroPI normiert und analysiert. Das Plasmid pWSK29 diente als Ausgangsplasmid für die Erzeugung von pWSJFaroPI bei dem das aroP-Gen (aromatische Aminosäure-Permease) unter die Kontrolle eines konstitutiven Lac-Promotors kloniert wurde. Dadurch war es möglich einen komplementierten Stamm zu generieren (6220 Hintergrund) der die freie Aminosäure Phenylalanin wieder aufnehmen konnte. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

9.10 Die Rolle der Peptidtransportsysteme

Um Rückschlüsse auf die intrazelluläre Verfügbarkeit von Aminosäuren und Peptiden ziehen zu können, war es ebenfalls von Belang, den Einfluss spezifisch- und unspezifisch-arbeitender Peptidaufnahmesysteme zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden Deletionsmutanten konstruiert und mittels Infektions- / Replikations-Assays analysiert (vgl. Abb. 26).



▲ Abb. 26: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum von aromatische Aminosäure-Biosynthese bzw. Transport-Mutanten: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 5202 ($\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF$), 5208 ($\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR$), 5500 ($\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF$), 5556 ($\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP$) und 5618 ($\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP \Delta yejABEF$) normiert und analysiert. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

S. Typhimurium kann, wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben (4.8), über verschiedene Transportsysteme Peptide aufnehmen. Da *Salmonella* aber nicht über extrazelluläre Peptidasen verfügt, die zur vollständigen Proteolyse von Peptiden dienen könnten, wirkt sich dies zusammen mit der Kapazitätsgrenze der in der äußeren Membran lokalisierten Porine limitierend auf die Größe der als Substrat verwertbaren Peptide aus.

Durch die Deletionen des *dppABCDF*-Operons (Di-Peptidaufnahmesystem) und des *oppABCDF*-Operons (Oligo-Peptidaufnahmesystem) in Stamm 5202 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Die zusätzliche Deletion des *ydgR*-Gens (*tpp*; Tripeptid-Permease) in Stamm 5208 bzw. des *sapABCDF*-Operons (Peptid-Transport-System) in Stamm 5500 (MW: 0,8; SD: 0,2; $p > 0,05$) bewirkte eine leichte Verbesserung bzw. Reduktion der intrazellulären Replikation im Toleranzbereich von +/-0,2. Auch die Deletion des *yhiP*-Gens (Peptid-Transporter der inneren Membran) in Stamm 5556 wirkte sich nicht auf die intrazelluläre Replikationsleistung aus (vgl. Abb. 26). Da alle biosynthetischen wichtigen Wege für die Erzeugung der benötigten Aminosäuren intakt vorlagen und somit jedweder Bedarf gedeckt werden konnte, ist dieses Ergebnis durchaus interessant und wird im Diskussionsteil näher beleuchtet (S.129).

Erst die Deletion des putativen ABC-Transporters, kodiert durch das *yejABEF*-Operon, bewirkte eine signifikante Veränderung der intrazellulären Replikation von Stamm 5618 (MW: 0,5; SD: 0,14; $p < 0,001$). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei diesem um ein System handelt, welches eine Rolle bei der Abwehr antimikrobiell wirkender Peptide spielt (Eswarappa et al, 2008). Interessant ist, dass das *sapABCDF*-Operon ebenfalls ein System darstellt, das die Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Peptiden steuert. Da aber auch nach der Deletion des *sapABCDF*-Systems ein leichter Rückgang der intrazellulären Replikationsleistung zu verzeichnen war, bleibt die tatsächliche Rolle des *sapABCDF*-Systems offen. Auch die Normalisierung der intrazellulären Replikation durch die zusätzliche Deletion von *yhiP* lässt eine Interaktion zwischen diesen beiden Systemen vermuten, was im Diskussionsteil erneut aufgegriffen wird (S. 129-130).

9.11 Die Rolle von *para*-Aminobenzoat (PABA)

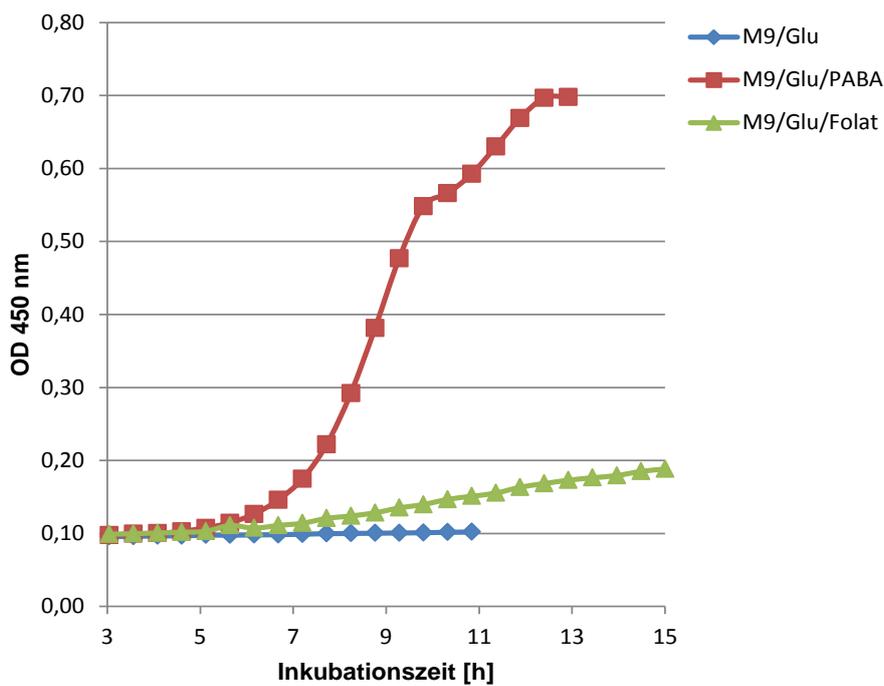
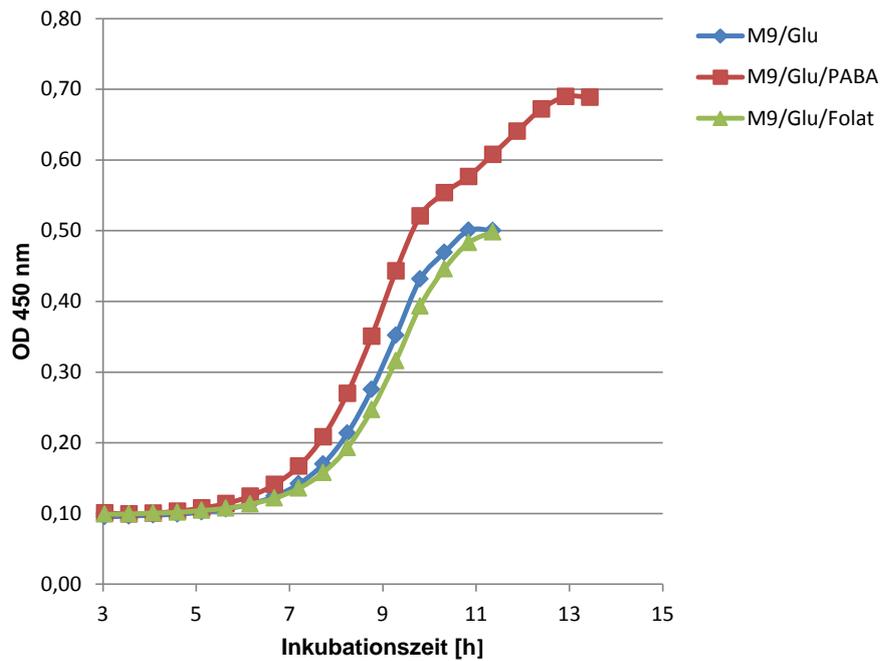
Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde (vgl. Abs. 4.5), finden bei der Generierung von *Salmonella*-Vakzinierungsstämmen Δ *aroA*-Mutationen eine breite Anwendung (Stocker, 1983; Smith, 1984; Tan, 1997; Koesling, 2001; Alam, 2009). Sie gelten als sicher und bewirken im Tierversuch den erwünschten Effekt der Vakzinierung. Problematisch in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass bereits zu Beginn der Untersuchungen bezüglich der *aroA*-Deletion in *Salmonella* eine Beobachtung gemacht wurde, die in den Studien der folgenden Dekaden keine Beachtung fand. Die ersten Arbeiten von Hoiseth und Stocker (1981) zeigten bereits, dass eine Zugabe von *para*-Aminobenzoat (PABA) und 2,3 di-Hydroxybenzoat

(DHB) zum Wasser der Versuchsmäuse die Virulenz des $\Delta aroA$ -Stammes wieder auf Wildtypniveau ansteigen ließ. Aufgrund dieser Ergebnisse stand schon seit 1981 die Frage im Raum, welcher biochemische Zusammenhang die Virulenz des $\Delta aroA$ -Stammes bedingte und dies unter Berücksichtigung, dass laut Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 (Futtermittelzusatzstoff-Verordnung) PABA als Nährstoffergänzungsmittel in allen Tierfuttern Verwendung finden kann, ohne eine genaue Dosierungsgrenze festzulegen.

Um sich der Fragestellung innerhalb des Rahmens dieser Arbeit zu nähern, wurden *Salmonella*-Mutanten erzeugt bei denen die Synthese von Chorismat selbst durch die Deletion von *aroA* (5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase) unterbunden wurde (Stämme 7230 (*his*-) und 7254 (*his*+)). Zusätzlich dazu wurden Stämme erzeugt, bei denen die Synthese von *para*-Aminobenzoat (PABA) aus Chorismat in Richtung der Folat-Biosynthese durch die Deletion der Gene *pabA* (*para*-Aminobenzoat-Synthase, kleine Untereinheit; Stamm 6464) *pabB* (*para*-Aminobenzoat-Synthase, große Untereinheit; Stamm 6470) und *pabC* (4-Amino-4-Desoxy-Chorismat-Lyase; Stamm 6476) unterbunden vorlagen.

Wie bereits erwähnt, mündet der Biosyntheseweg von *para*-Aminobenzoat in die Folat-Biosynthese, was somit die Frage aufwarf, ob die Deletion von *aroA* und die damit verbundene Reduktion der intrazellulären Replikation nicht möglicherweise auf das Fehlen von Folat zurückzuführen ist. Die aus der Deletion von *pabA*, *pabB* und *pabC* resultierende Auxotrophie für PABA wurde mittels M9-Festmedium verifiziert. Ebenso wurde das Wachstum der *pab*-Mutanten auf Folat bzw. PABA supplementiertem M9-Flüssigmedium mittels Wachstumskurven überprüft und bestätigt (vgl. Abb. 27). Hierbei zeigte sich, dass die Supplementierung mit Folat den Wachstumsdefekt nicht annähernd in dem Maß kompensieren konnte wie dies durch die Zugabe von PABA erzielt wurde. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da viele Bakterien, die selbst Folat herstellen können, keine Transportsysteme für Folat besitzen (Carter *et al.*, 2007).

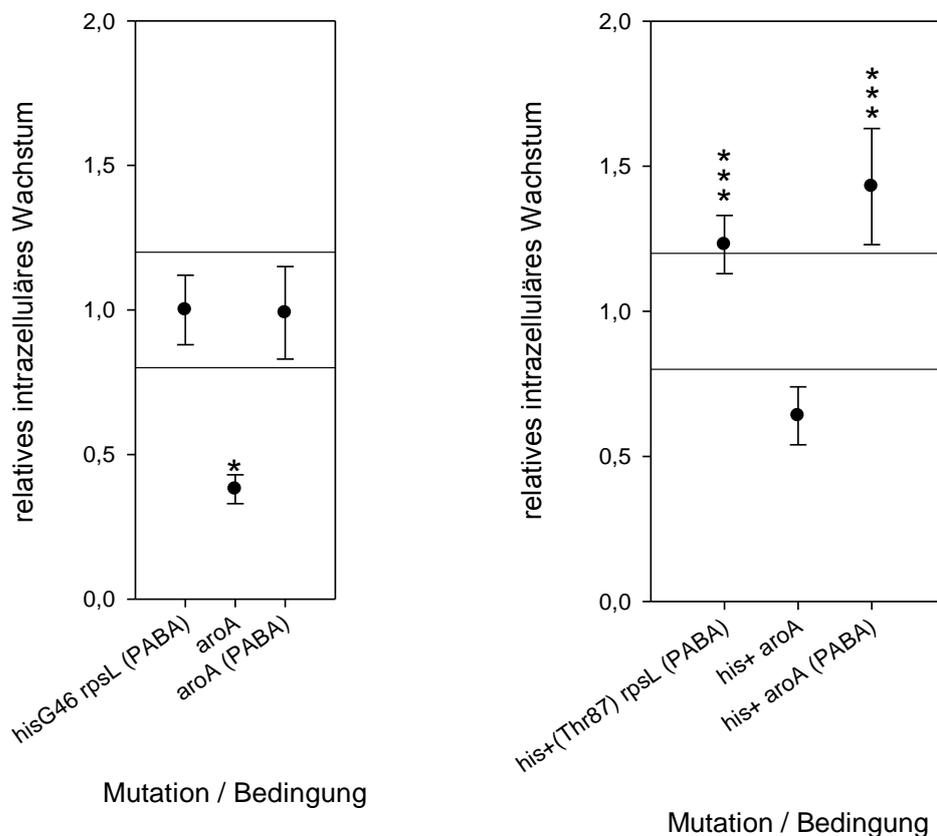
Um sich einen Überblick über die intravakuolären Replikationsleistungen der $\Delta aroA$ - bzw. $\Delta pabA$ -; $\Delta pabB$ -; $\Delta pabC$ -Mutanten zu verschaffen, wurden in umfangreicher Weise Invasions- / Replikations-Assay durchgeführt. Durch die zusätzliche Supplementierung des Wirtszell-Kulturmediums mit PABA bzw. Folat wurde untersucht, ob diese Komponenten einen Einfluss auf das intravakuoläre Replikationsverhalten ausübten (vgl. Abb. 27).



▲ Abb. 27: Beispielhaftes Wachstum der Stämme 3946 (Wildtyp; obere Wachstumskurven) und 6476 ($\Delta pabABC$; untere Wachstumskurven) auf M9-Medium Flüssigmedium mit verschiedenen Supplementen. Folgende Medien wurden verwendet: M9/His/Glu (M9-Medium mit Glukose und mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Histidin). Dem letztgenannten Medium wurden zusätzliche Supplemente zugegeben: *para*-Aminobenzoat PABA (25 $\mu\text{g/ml}$), Folat (25 $\mu\text{g/ml}$).

9.12 Die Rolle von *aroA*

Die *aroA*-Deletion im Histidin-auxotrophen Stamm 7230 bewirkte eine signifikante Reduktion der intrazellulären Replikation um rund 62% im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 28). Die Zugabe von 2,3-Dihydroxybenzoat (DHB) (Daten nicht gezeigt) erbrachte keine Verbesserung der intrazellulären Replikation, was vermuten lässt, dass die Synthese von Enterochelin, für die DHB nötig ist, nicht den entscheidenden Faktor bei der intrazellulären Inhibierung im verwendeten *in vitro*-Modell darstellt, was im Diskussionsteil erneut aufgegriffen wird (S. 130-132).



▲ Abb. 28: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum von aromatische Aminosäure-Biosynthese bzw. Transport-Mutanten: [Rechts] Auf den Wildtyp-Stamm 2958 (1,0) und [Links] auf Stamm 3946 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 2958 (*hisG46 rpsL* (PABA)), 7230 (Δ *aroA*), 7230 (Δ *aroA*) (PABA) sowie 3946 (*his*+(Thr87) (PABA)), 7254 (*his*+ Δ *aroA*) und 7254 (*his*+ Δ *aroA*) (PABA) normiert und analysiert. Supplementierung mit *para*-Aminobenzoat (PABA). Endkonzentration in Medium: PABA [10µg/ml]; Folat [117µg/ml]. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

Die Supplementierung des Stammes 7230 (vgl. Abb. 28, linke Seite) mit PABA hingegen bewirkte eine intrazelluläre Replikations-Leistung auf Niveau des Wildtyps (vgl. Abb. 28). Dies steht in Übereinstimmung mit den von Hoiseth und Stocker (1981) gemachten Beobachtungen der vollständigen Wiederherstellung der Virulenz / Replikationsleistung. Untersuchungen von Hölzer & Hensel (2012) in HeLa-Zellen zeigen, dass die Replikation der intrazellulären *aroA*-Mutante durch Zugabe von PABA verbessert werden kann, aber nicht wie in der hier vorliegenden Studie auf Wildtypniveau. Als Kontrolle wurde auch der Wildtyp 2958 mit PABA mitgeführt. Auch bei diesem Stamm entstand keine intrazelluläre Beeinträchtigung (vgl. Abb. 28).

In gleicher Weise wurden Histidin-revertante Stämme (3946 Hintergrund) analysiert (vgl. Abb. 28, rechte Seite). Die *aroA*-Deletion im Histidin revertanten Stamm 7254 bewirkte ebenfalls eine Reduktion der intrazellulären Replikation um rund 32% im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier erbrachte die Zugabe von DHB keine Verbesserung der intrazellulären Replikation (Daten nicht gezeigt).

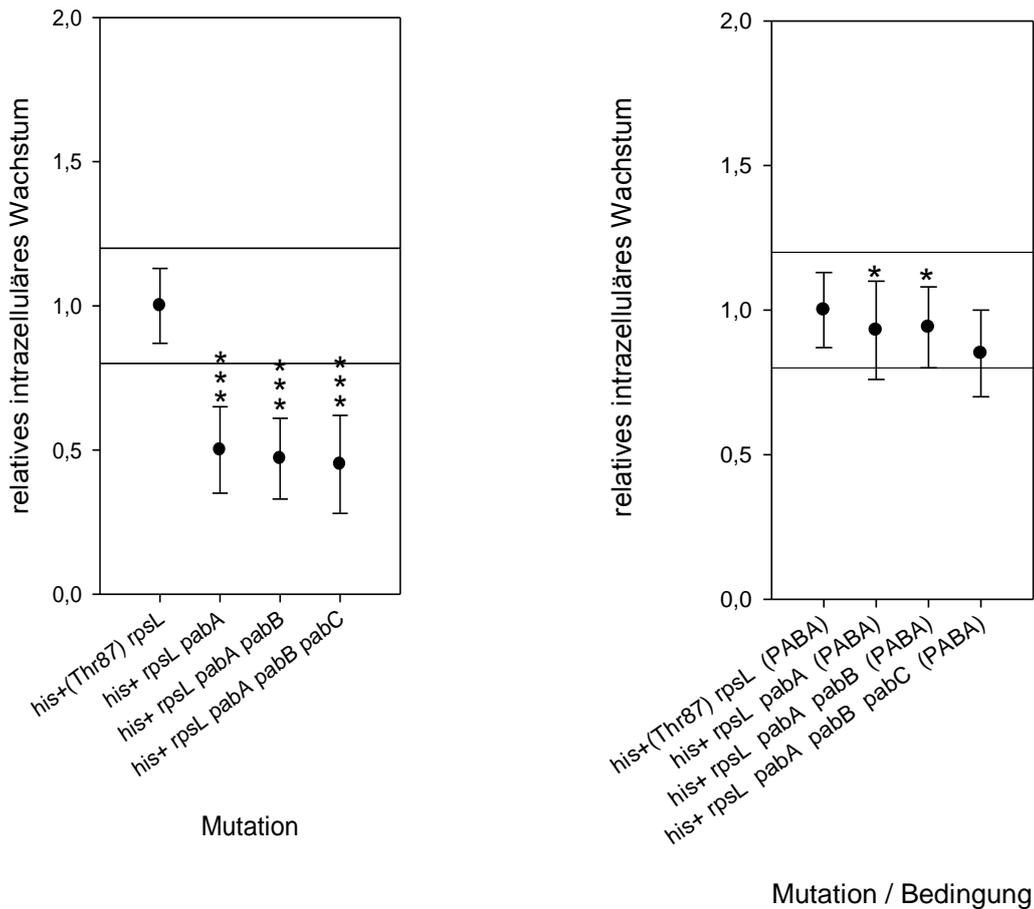
Die Supplementierung des Stammes 7254 mit PABA hingegen bewirkte eine intrazelluläre Replikationsleistung weit über der des verwendeten Wildtyps 3946 für den Normierungsschritt. Dieses Ergebnis als auch die Daten des Kontrollstammes 3946 mit PABA zeigen sehr deutlich, welchen fördernden Effekt PABA auf die Replikationsleistung ausübt (vgl. Abb. 28). Warum es zu einem so starken Unterschied zwischen den Referenzstämmen kam, wird u.a. im Diskussionsteil erneut aufgegriffen (S. 130-132).

9.13 Die Rolle von PABA

Um den Einfluss von PABA selbst bzw. die Unterbrechung der Biosynthesen zu untersuchen, wurde der Fokus im Verlauf der Analyse auf die $\Delta pabABC$ -Mutanten gerichtet. Wie aus Abb. 29 (linkes Diagramm) zu entnehmen ist, verringerte sich die intrazelluläre Replikation der $\Delta pabA$ Mutante (Stamm 6464), der $\Delta pabAB$ Mutante (Stamm 6470) und der $\Delta pabABC$ Mutante (Stamm 6476) um rund 50%. Somit ist der direkte Einfluss der PABA-Synthese auf die intrazelluläre Replikation ebenso so stark reduzierend wie der $\Delta aroA$ -Hintergrund (vgl. Abb. 29).

Im Vergleich zwischen PABA-supplementierten $\Delta pabABC$ -Mutanten (rechte Darstellung Abb. 29) fällt auf, dass die 50%ige Reduktion beider Deletionshintergründe nur auf das Fehlen bzw. die Verfügbarkeit von PABA zurückzuführen ist.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass in Abgleich mit den auf M9-Fest- und Flüssigmedium gemachten Beobachtungen intrazellulär genug PABA vorhanden ist, um eine 50%ige Replikationsleistung im Vergleich zum Wildtyp in nicht-supplementierter Zellkultur zu gewährleisten, was im Diskussionsteil erneut aufgegriffen wird (S. 130-132).



▲ Abb. 29: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum von *para*-Aminobenzoat Biosynthese-Mutanten: [Rechts und Links] Auf den Stamm 3946 (*his+(Thr87)*) (1,0) wurden die *S.Typhimurium* Stämme 6464 (*his+ ΔpabA*), 6470 (*his+ ΔpabA ΔpabB*), 6476 (*his+ ΔpabA ΔpabB ΔpabC*) ohne bzw. mit PABA-Endkonzentration in Medium [10μg/ml] normiert und analysiert. Links ohne PABA-Supplementierung, rechts mit PABA-Supplementierung. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***) , $p < 0.001$

9.14 Die Rolle der verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin

Die verzweigt-kettigen Aminosäuren (VKA) Isoleucin, Leucin und Valin waren aufgrund ihrer Biosyntheseweg-Kopplung zu Threonin bzw. Pyruvat für diese Arbeit relevant. Die Biosynthese der VKA ist abhängig von dem Vorhandensein von Pyruvat und α -Ketobutyrat, einem intermediären Metabolit des Threonin-Katabolismus.

Das für Leucin-kodierende Operon *leuABCD* beinhaltet die Gene *leuA*: Isopropyl-Malat-Synthase; *leuB*: β -Isopropyl-Malat-Dehydrogenase und *leuCD*: Isopropyl-Malat-Isomerase. Eine Deletion des Operons in Stamm 5488 erwies sich als leicht fördernd auf das

Replikationsverhalten der Mutante (vgl. Abb. 30). Auf M9-Festmedium konnte die Leucin-Auxotrophie bestätigt werden.

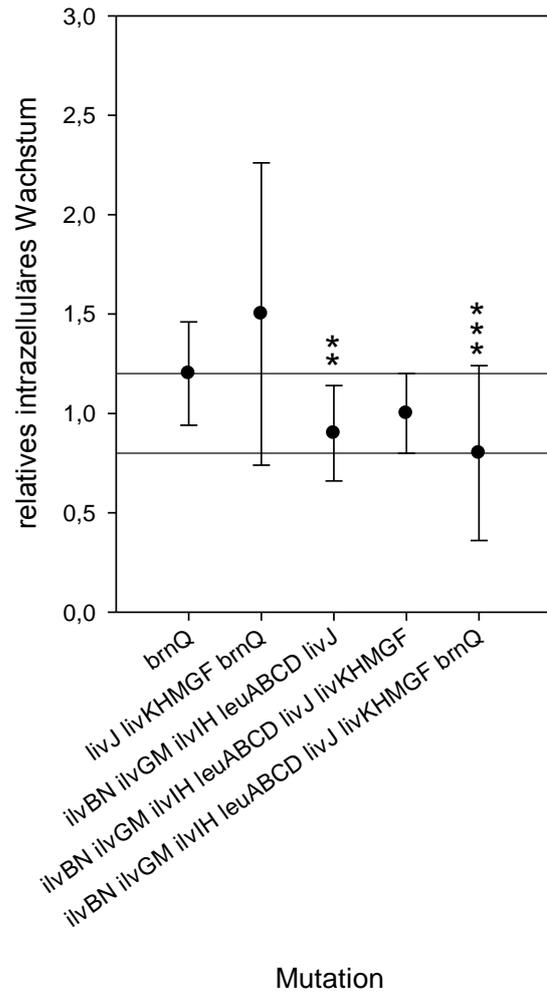
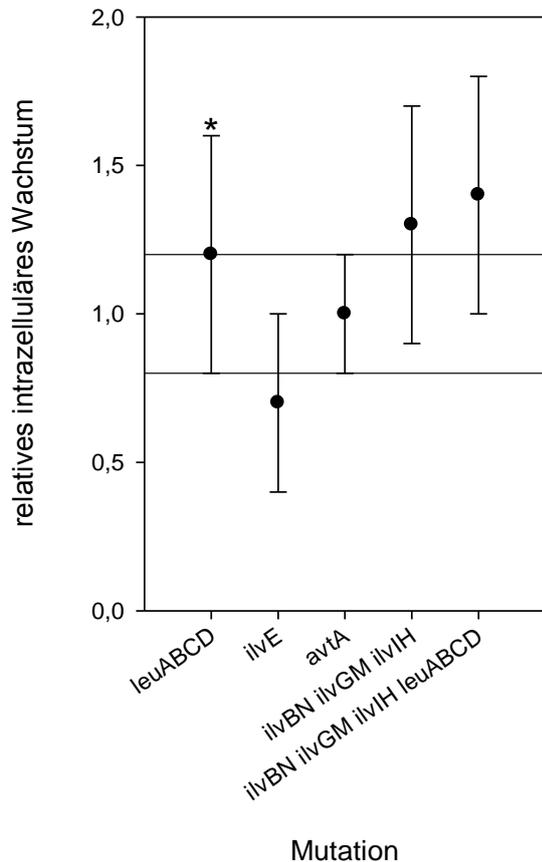
Ausgehend von dieser Beobachtung wurden weitere Mutanten untersucht, die Deletionen in verschiedenen Biosyntheseschritten der betreffenden VKA trugen. Ebenfalls wurden die Transportsysteme der VKA deletiert sowie Kombinationen aus Transport und Biosynthesedeletionen mittels Invasions- / Replikations-Assays analysiert.

Der letzte Syntheseschritt zu Valin, Leucin und Isoleucin wird durch die Transaminase B, kodiert durch das *ilvE*-Gen, katalysiert (siehe Einleitung). Eine Deletion von *ilvE* in Stamm 6630 (MW: 0,7; SD: 0,3; $p > 0,05$) führte zu einer Beeinträchtigung des intrazellulären Wachstumsverhaltens (vgl. Abb. 30). Fehlt *ilvE*, kann nur in der Valin-Biosynthese-Richtung, die durch *avtA* kodierte Valin-Pyruvat-Aminotransferase, die katalytische Funktion übernommen werden (vgl. Einleitung). Isoleucin und Leucin können durch die Deletion von *ilvE* nicht mehr synthetisiert werden.

Die Valin-Pyruvat-Aminotransferase, kodiert durch das Gen *avtA*, katalysiert neben der Transaminase B (*ilvE*) den finalen Biosyntheseschritt von Valin aus α -Ketoisovalerat. Das Gen *avtA* wird durch Leucin und/oder Alanin reprimiert aber nicht durch Isoleucin oder Valin (Whalen & Berg, 1982; Berg, 1983). Die Transaminase C fungiert in *S. Typhimurium* in drei biochemischen Reaktionen. Dazu zählen die Katalysen die in beide Richtungen, von Pyruvat zu Alanin, von α -Ketobutyrat zu α -Aminobutyrat und α - Ketoisovalerat zu Valin katalysieren. Um den Einfluss von *avtA* auf das intrazelluläre Wachstum untersuchen zu können, wurde eine Deletion vorgenommen.

Wie aus Abb. 30 hervorgeht, entstand der *avtA*-Deletionsmutante (Stamm 6094) kein intrazellulärer Wachstumsdefekt. Auf M9-Festmedium konnte keine Auxotrophie generiert werden, da *ilvE* (Transaminase B) die Funktion übernimmt.

Um die Synthese von Valin bzw. Leucin und Isoleucin noch detaillierter untersuchen zu können, wurden die für die Synthese von allen drei VKA zentralen Acetohydroxy-Säure Synthasegene deletiert. Zwei der drei Acetohydroxy-Säure-Synthasen (AHS) werden durch Valin konzentrationsabhängig gehemmt (S. 17-18). Zu diesen zählen die durch *ilvBN* kodierte AHSI und die durch *ilvIH* kodierte AHSIII. Die Acetohydroxy-Säure-Synthase II (AHSII), kodiert durch *ilvGM*, wird nicht durch das Endprodukt (Valin) inhibiert. Eine Deletion von *ilvGM* resultiert in einer auf Valin sensitiv reagierenden Mutante, die aufgrund der valinabhängigen Hemmung von AHSI und AHSIII für Leucin und Isoleucin auxotroph wird.



▲ Abb. 30: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum von aromatischen Aminosäure-Biosynthese bzw. Transport-Mutanten: [Rechts und Links] auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 5488 ($\Delta leuABCD$), 6630 ($\Delta ilvE$), 6094 ($\Delta avtA$), 5434 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH$), 5778 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD$), 5952 ($\Delta brnQ$), 5596 ($\Delta ilvJ \Delta ilvKHMGE \Delta brnQ$), 6226 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta ilvJ$), 6282 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta ilvJ \Delta ilvKHMGE$), 6322 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta ilvJ \Delta ilvKHMGE \Delta brnQ$). Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von $\pm 0,2$ um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

Wie aus der Abb. 30 zu entnehmen ist, entstand durch die Deletion aller Acetohydroxy-Säure-Synthasen ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH$) in Stamm 5434 (MW: 1,3; SD: 0,4; $p > 0,05$) ein positiver intrazellulärer Replikationseffekt. Auch eine Kombination der Deletionen $\Delta ilvBN$, $\Delta ilvGM$, $\Delta ilvIH$, mit $\Delta leuABCD$ in Stamm 5778 (MW: 1,4; SD: 0,4; $p > 0,05$) mündete nicht, wie zunächst angenommen, in eine Replikationsbeeinträchtigung, sondern vielmehr in einer Verbesserung der intrazellulären Replikation (vgl. Abb. 30).

Die möglichen Ursachen für diese Beobachtung werden im Diskussionsteil analysiert (S. 133-135). Es soll aber schon jetzt darauf hingewiesen werden, welche großen regulatorisch wirkenden Effekte Lrp in globaler Hinsicht auf den Organismus haben kann.

Auch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass sich in einer intensivierten Überprüfung der Gensequenzen von *leuABCD* und *ilvBN ilvGM ilvIH* herausstellte, dass bei dem Versuch des Einfügens der $\Delta leuABCD$ in die Deletionskombination ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH$) das Wildtyp *ilvIH* Operon, höchstwahrscheinlich bei der Erzeugung des Stammes 5778 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD$), aufgrund der räumlichen Nähe zum *leuABCD*-Operon im Transduktionsprozess verschleppt wurde (ähnlich zu der zuvor beschriebenen $\Delta cysK \Delta cysM$ -Mutante, vgl. Abs. 4.4 und 9.6). Problematisch in diesem Zusammenhang ist die Überprüfbarkeit dieser These, denn ohne die durch *ilvBN* und *ilvGM* kodierten Acetohydroxysäure-Synthasen musste Valin auf M9-Minimalmedium als freie Aminosäure zugegeben werden, um ein Wachstum zu ermöglichen. Die durch *ilvIH* kodierte Acetohydroxysäure-Synthase selbst wird jedoch durch Valin reprimiert und mimikriert somit den Phänotyp. Grundsätzlich muss deswegen bei der Interpretation der Daten aus Abb. 30 darauf hingewiesen werden, dass das erhöhte Wachstum der Stämme 5434 und 5788 nicht signifikant ist.

Die Deletion von *brnQ*, einem Gen, das für das „Branched chain uptake system II“ kodiert, führte bei der Analyse von Stamm 5952 (MW: 1,2; SD: 0,26; $p > 0,05$) zu einer leichten Verbesserung der intrazellulären Proliferation (vgl. Abb. 30). Durch zusätzliche Deletionen weiterer Transportsysteme für VKA (*livJ* und *livKHMGF*) in Stamm 5596 (MW: 1,5; SD: 0,76; $p > 0,05$) konnte der zuvor beobachtete positive Effekt auf die Replikationsleistung weiter erhöht werden. Mögliche Gründe für diesen werden im Diskussionsteil analysiert (S. 133-135).

Die Kombination der VKA Aufnahmesystem- und Biosynthesedeletionen erbrachte sowohl in der $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta livJ$ -Mutante (Stamm 6226) als auch in der $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta livJ \Delta livKHMGF$ -Mutante (Stamm 6282) keine signifikante Beeinträchtigung des intrazellulären Wachstums (vgl. Abb. 30).

Durch das Setzen einer weiteren Deletion (*brnQ*) konnte bei der $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta livJ \Delta livKHMGF \Delta brnQ$ -Mutante (Stamm 6322 (MW: 0,8; SD: 0,44; $p < 0,001$)) eine leichte Beeinträchtigung der intrazellulären Replikationsleistung unterhalb des Wildtypniveaus beobachtet werden (vgl. Abb. 30).

Das wiederholte Auftreten einer Wachstumsverbesserung bei den Deletionskombinationen $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH$ bzw. $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD$ und

ΔlivJ ΔlivKHMGF ΔbrnQ ist möglicherweise über einen regulativen Effekt zu erklären, auf dem im Diskussionsteil näher eingegangen wird (S. 134-135).

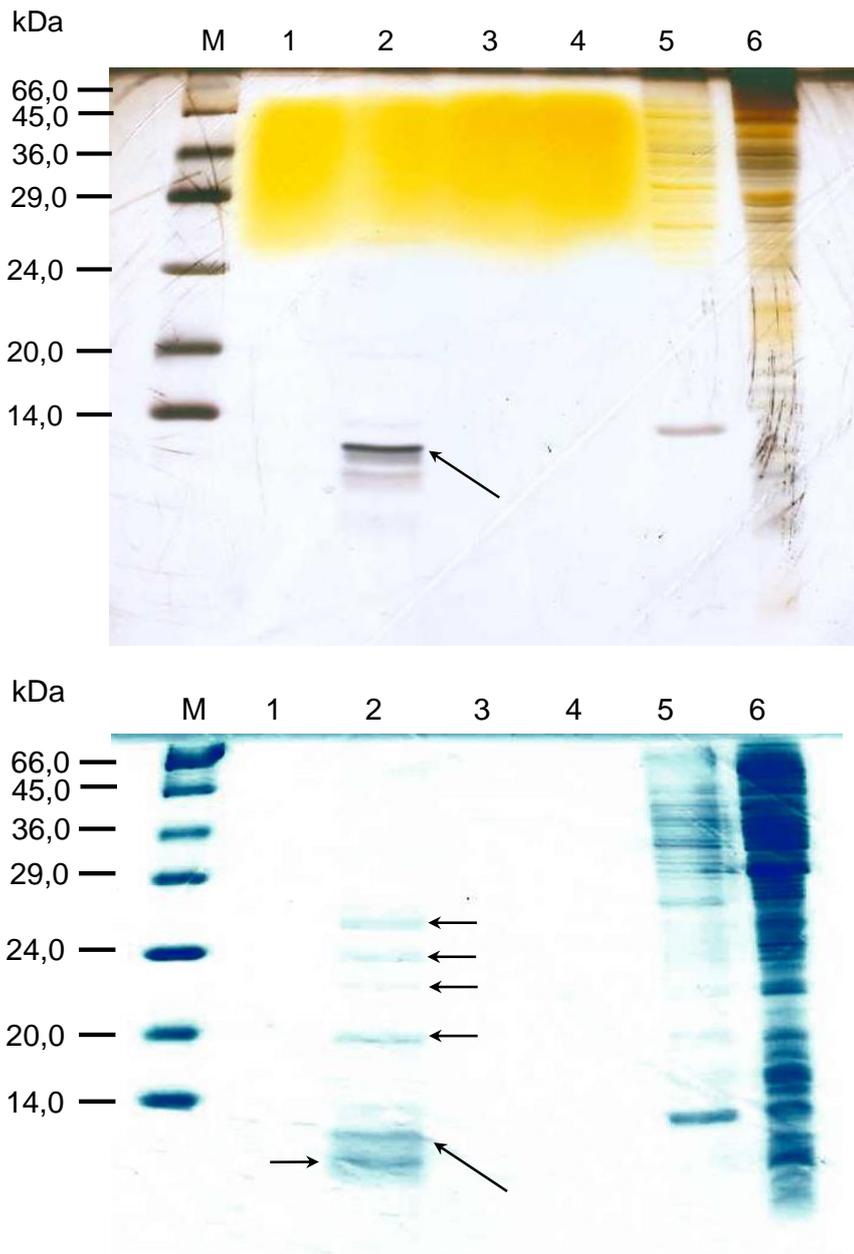
9.15 Versuche mit Poly-Valin zur Inhibierung von *Salmonella livGM*-Mutanten

Zur Überprüfung der These, dass intrazelluläre *S. Typhimurium* Zugang zu kleinen Peptiden haben, wurde versucht, mittels eines induzierbarer Plasmids die benötigten Poly-Valin-Peptide durch *E. coli* synthetisieren zu lassen, diese aufzureinigen und als Valin-Quelle der Valin-sensiblen *S. Typhimurium ΔlivGM*-Mutante zugänglich zu machen.

Im Vorfeld der Arbeiten mussten dafür DNA-Syntheseschritte durchgeführt werden, die in einer DNA-Sequenz mündeten die für 27 Aminosäuren, bestehend aus Alanin, Threonin, Glycin und Valin, kodierten. Diese Sequenz wurde in den Vektor pET45b eingebracht. Dadurch konnte die DNA-Sequenz unter die Kontrolle des auf dem Plasmid enthaltenen Bakteriophagen T7-Promotors und der für die Expressionssteuerung verantwortlichen Lac-Operators kloniert werden.

Voraussetzung für die Expression ist das Vorhandensein der Bakteriophagen T7 RNA-Polymerase, welche chromosomal durch ein lysogenes Bakteriophagen λ (Lambda) Derivat in Stamm 445 (*E. coli* BL21: λ DE3) verankert ist. Das Phagenkonstrukt beinhaltet das T7-Gen 1.0 (T7 RNA-Polymerase) welches unter transkriptioneller Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Dieser Promotor ist durch IPTG induzierbar. Die Zugabe von IPTG führt zur Expression der T7 RNA-Polymerase, welche ihrerseits den T7-Promotor, welcher vor die DNA-Sequenz der oben beschrieben 27 Aminosäuren kloniert wurde, erkennt und somit ausschließlich dessen Expression steuert.

Das Plasmidkonstrukt (pET45b-RPEP) war so konzipiert, dass bei der Expression der Poly-Valin-Sequenz dieses mit einer Poly-Histidin-Markierung („His-Tag“) versehen wurde, welche nach dem Translationsschritt für die Aufreinigung mittels Nickelsäulen Verwendung finden sollte (vgl. Abb. 31).



▲ Abb. 31: Auftrennung von Amicon-Filter gereinigten Poly-Valin-Peptid II. Dargestellt sind zwei 20% SDS-Polyacrylamidgеле. Oberes Gel (Silber-Färbung), von links nach rechts wurden folgend aufgetragen: M= Protein Molekulargewicht Marker SIGMA VII-L; 1= erste Eluation; 2= zweite Eluation; 3 und 4= Durchfluss der 3 und 4 Eluation; 5= Durchfluss erster Waschschrift; Gesamtprotein aus uninduziertem Trägerstamm. Pfeil markiert isoliertes Peptid in der Größe von 12,21 kDa. Unteres Gel (Coomassie-Färbung), von links nach rechts wurden folgend aufgetragen: M= Protein Molekulargewicht Marker SIGMA VII-L; 1= erste Eluation; 2= zweite Eluation; 3 und 4= Durchfluss der 3 und 4 Eluation; 5= Durchfluss erster Waschschrift; Gesamtprotein aus uninduziertem Trägerstamm. Waagerechte Pfeile verweisen auf die in der Proteinaufreinigung mitgeführten zusätzlichen Proteine, die durch Silberfärbung nicht ersichtlich wurden. Angewinkelter Pfeil markiert auch hier das gesuchte Peptid in der Größe von 12,21 kDa. Probenauftragsvolumen zwischen 5-10 µl Probe in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Gellaufzeit:1,4h (100V / 30mA).

Es stellte sich aber im Verlaufe der Arbeiten heraus, dass die Überexpression auch durch Zugabe von Nukleosiden, Nukleotiden sowie von im Poly-Valin-Peptid enthaltenen Aminosäuren nicht den gewünschten Effekt erzielte, eine Biosynthese zu erreichen, die signifikante Mengen des Polypeptids hervorbrachte. Ein anderer störender Aspekt der Arbeiten bestand darin, dass die Größe von 27 Aminosäuren die Isolierung auch in hochkonzentrierten Polyacrylamid-Gelen deutlich erschwerte. Auch konnte durch Coomassie bzw. Silberfärbung keine angemessene Markierung in Vergleichsgelen erreicht werden, um eine Isolierung möglich zu machen.

Aufgrund der Resultate der Arbeiten mit pET45b-RPEP wurde ein abgewandeltes Konstrukt generiert mit der Zielsetzung, ein wesentlich größeres Poly-Valin-Peptidprodukt zu erzeugen, welches im weiteren Verlauf der Arbeiten durch Enterokinase-Behandlung wieder in passende kleine Stücke zerlegt werden konnte. Dazu wurde erneut eine DNA-Sequenz synthetisiert, die, unterbrochen durch Enterokinase-Schnittstellen-Sequenzen, vier hintereinander folgende DNA-Sequenzen aufwies. Diese vier DNA-Sequenzen bestanden aus einer Histidin-Markierung („HisTag“) und 27 Aminosäuren, darunter Hauptanteilig Valin. Nach erfolgreicher Transformation des *E. coli* Stammes 445 mit dem Plasmid pET45polyVal II wurde das Plasmid mittels Testrestriktion überprüft (Daten nicht gezeigt) und die Induzierbarkeit des Plasmidkonstrukts durch die Zugabe von IPTG zum Kulturmedium überprüft. Dabei konnte die Synthese des Poly-Valin-Peptids zwischen induzierter und nicht induzierter Kultur nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings wiesen deutlich verlangsamte Wachstumsraten des induzierten Trägerstammes auf eine Synthese des gewünschten Polypeptids hin. Die Proteinaufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben des Protino Ni-Ted-Kits von Macherey und Nagel. Durch die Verwendung von Kit-eigenen Nickelsäulen konnten in der zweiten Elutionsphase Proteine in geeigneter Größe isoliert werden (vgl. Abb. 31)

Um zu überprüfen, ob die isolierten Peptide eine Wachstumsinhibition bei der Valin-sensiblen *S. Typhimurium* $\Delta ilvGM$ -Mutante hervorrief, wurden diese auf gewaschenen 10^{-5} Verdünnungen zu je 100 μ l ausplattiert. Darauf wurden Filterpapierscheiben zentrisch aufgetragen, die mit dem in DMSO rückgelösten Peptiden versetzt waren. Eine Inhibition des Wachstums konnte auch mit erhöhter Peptidkonzentration nicht festgestellt werden. Auf die möglichen Ursachen wird im Diskussionsteil näher eingegangen (S. 135).

Da die Isolierung der überexprimierten Poly-Valin-Peptide I und II nicht zu dem erwünschten Effekt führte, um eine Inhibition des Wachstums der $\Delta ilvGM$ -Mutante hervorzurufen, wurde auf synthetische Peptide zurückgegriffen. Die synthetisierten Poly-Valin-Peptide bestanden jeweils nur aus Penta- bzw. Tri-Valin und wurden zu lyophilisierten Chargen von 12 mg geliefert.



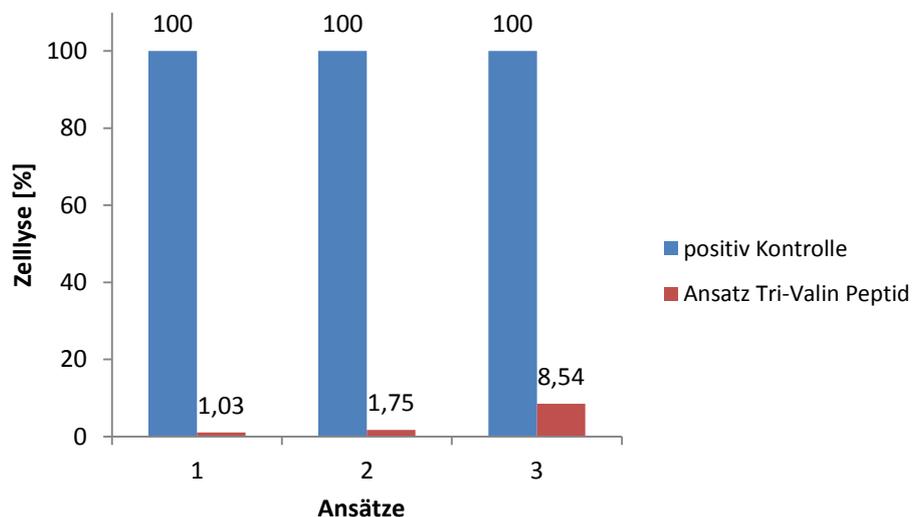
▲ Abb. 32: Überprüfung der Wirksamkeit des artifiziellen Tri-Valin-Peptids:

Dargestellt sind M9-Minimalmedium-Agar-Platten supplementiert mit Histidin (25µg/ml). Die Stämme 6186 ($\Delta ilvGM$) [links], 5722 ($\Delta ilvGM$) [mittig] und 2958 (Wildtyp) [rechts] wurden auf L-Broth-Flüssigmedium bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Zellen aus 1 ml Zellkultur wurden sedimentiert und zweimal mit 1 ml NaCl [150mM] gewaschen. Anschließend erfolgte eine Verdünnung bis 10^7 /ml. Daraus wurden 100 µl ausplattiert. Sterile Filterplättchen wurden mit zwei Tropfen einer 1,2 mg/ml Tri-Valin Lösung in ddH₂O versetzt und in das Plattenzentrum übertragen. Die Platten wurden bei 32°C über Nacht inkubiert. Wie deutlich aus den Hemmhöfen auf den Platten der beiden $\Delta ilvGM$ -Mutanten zu entnehmen ist, konnte erfolgreich eine Repression der Isoleucin-Synthese durch erhöhte Valinkonzentration in Peptidform erzielt werden. Die rechte Platte mit Wildtyp Stamm 2958 zeigt, dass Tri-Valin-Peptid für den parentalen Stamm beider $\Delta ilvGM$ -Mutanten nicht inhibierend ist. Die Versuche wurden dreimal mit selben Ergebnis wiederholt.

Um die Peptide in Lösung zu bringen, wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet: ddH₂O, Zellkulturmedium, DMSO (99%), TritonX-100 0,1 bis 10% Lösung, Ethanol 10% bis 40%, Methansäure und Essigsäure in unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei stellte sich heraus, dass das Penta-Valin-Peptid in keinem der gewählten Lösungsmittel aufgenommen werden konnte. Das Tri-Valin-Peptid hingegen ließ sich in allen gewählten Lösungsmitteln lösen und fand für die weiterführenden Experimente Verwendung (Tab. 6, Material und Methoden). Um die Wirksamkeit des Tri-Valin-Peptids überprüfen zu können, wurden auf sterilen Filterpapierscheiben durch Tränken gelöste Tri-Valin-Peptide, in IMDM Zellkulturmedium, aufgetragen. Die Stämme 2958 (Wildtyp) 5722 ($\Delta ilvGM$) und 6186 ($\Delta ilvGM$, unabhängiges Zweitisolat) wurden in L-Broth angezogen und 100 µl einer durch photometrische Bestimmung ermittelten 10^{-5} Verdünnung auf M9-Minimalmedium mit Histidin ausplattiert. Wie aus Abb. 32 hervorgeht, konnte bei beiden $\Delta ilvGM$ -Mutanten (links und mittig) eine Wachstumsinhibierung erzielt werden. Der Wildtyp-Stamm 2958 (rechts) wies keine Wachstumsinhibierung auf.

9.16 Test auf Zytotoxizität des Tri-Valin-Peptids in Zellkultur

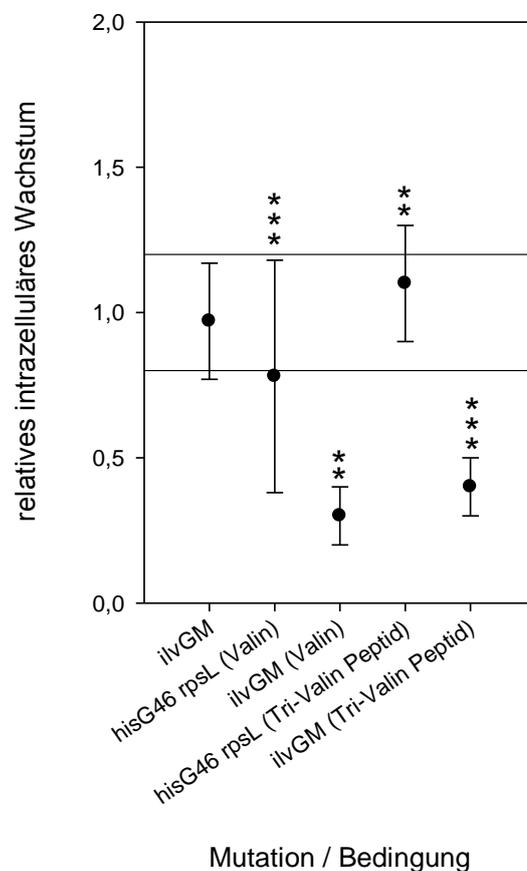
Um überprüfen zu können, ob die Zugabe des Tri-Valin-Peptids die Wirtszelllinie LoVo beeinträchtigt und somit die Ergebnisse der Invasions- / Replikations-Assays möglicherweise verfälschen würde, wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. Dabei wurde, wie im Teil Material und Methoden bereits beschrieben, die Permeabilität der Zellmembran indirekt mittels des Cytotox-One-Kit (Promega) verfolgt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Tri-Valin-Peptid bzw. mit einem im Assay-Kit enthaltenen Zelllyse-Puffer. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und konnten reproduziert werden. Wie aus Abb. 33 zu entnehmen ist, konnten keine signifikanten zytotoxischen Effekte durch die Zugabe von Tri-Valin-Peptid zum Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Alle drei Versuchsdurchläufe erbrachten Ergebnisse, bei denen die beobachtete Zelllyse, bzw. deren indirekte Messung, Werte unter 10% erbrachte.



▲ Abb. 33: Zytotoxizitätstest von Tri-Valin-Peptid (150µg/100µl / (4,76 mM)) nach Zugabe zum Zellkulturmedium im Zeitraum von 24 Stunden: Dargestellt ist der prozentuale Zytotoxizitätseinfluss (rot) im Vergleich mit der positiv Kontrolle (blau) auf die als Wirtszellen fungierende humane intestinale Epithelzelllinie LoVo in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Prozentuale Wertangaben oberhalb des dazugehörigen Balkens im Diagramm.

Resultierend aus dieser Beobachtung wurden Infektions- / Replikations-Assays durchgeführt, bei denen das verwendete Medium in seiner Zusammensetzung definiert wurde (vgl. Abb. 34). Dies garantierte, dass eine Verfälschung der Daten durch additive extrazelluläre Valin- und Isoleucin-Supplementation (wenn nicht beabsichtigt) vermieden werden konnte. Um die humanen intestinalen Epithelzellen (LoVo) auf die neuen Medienbedingungen zu adaptieren und die Metabolisierung der noch vorhandenen extra- und intrazellulären Valin- und Isoleucin-Vorkommen gezielt zu fördern, wurde vier Stunden vor Infektion auf Valin und Isoleucin freies Medium gewechselt. Der Medien austausch erfolgte nach einmaligem Waschen der adhären Epithelzellen mit PBS-Lösung.

Eine Stunde nach der Infektion der Zellkultur erfolgte erneut ein Mediaumaustausch (vgl. Abs. 8.10.2), um extrazelluläre *Salmonella* durch Zugabe von 50 µg/ml Gentamycin abzutöten. Dieser Schritt wurde genutzt, um möglichst früh nach der Infektion die gezielte Supplementierung mit freier Aminosäure Valin und in Peptidform gebundenem Tri-Valin-Peptid durchzuführen. Um Vergleiche zwischen behandelter und unbehandelter Kultur ziehen zu können, kamen parallele Ansätze ohne freie Aminosäure Valin bzw. Tri-Valin-Peptid zum Einsatz. Der Entzug der freien Aminosäuren Valin und Isoleucin bewirkte im Experimentalzeitraum von 24 Stunden keine signifikante Veränderung zwischen behandeltem und unbehandeltem Wildtyp (vgl. Abb. 34).



▲ Abb. 34: Relatives (auf den Wildtyp normiertes) intrazelluläres Wachstum verzweigtkettiger Aminosäure-Biosynthese $\Delta ilvGM$ -Mutante mit Valin und Tri-Valin-Peptidbehandlung: Auf den Wildtyp 2958 (1,0) wurden die *S. Tyhimurium* Stämme 5722 ($\Delta ilvGM$) und 2958 unter Standardbedingungen, mit Valin-Supplementation [117µg/ml (371 µM)] und mit Tri-Valin-Peptid [1,2 mg/ml (3,17 mM)] Supplementation normiert und analysiert. Ein durch schwarze Linien markierter Bereich von +/- 0,2 um den Wildtyp-Normierungswert 1,0 begrenzt einen laborinternen Streubereich. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

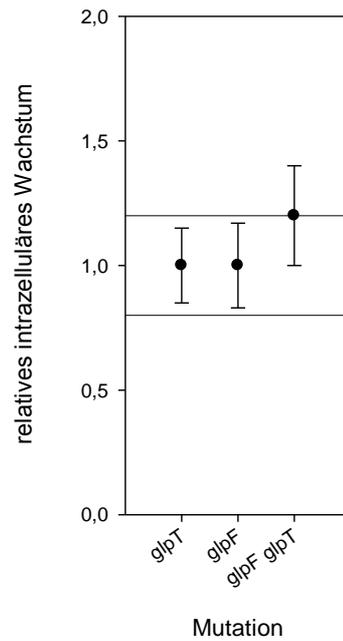
Um zu überprüfen, ob sich die freie Aminosäure Valin auf das Replikationsverhalten des Referenzstammes 2958 auswirkte, wurde Valin in einer Endkonzentration von 117 µg/ml (371 µM) dem Kulturmedium zugegeben. Die Behandlung führte zu signifikanter Beeinträchtigung. Auf mögliche Ursachen wird im Diskussionsteil eingegangen (S. 135-139). Der mit freier Aminosäure Valin behandelte $\Delta ilvGM$ -Mutanten Stamm 5722 wies eine bis zu 70%ige Verminderung der intrazellulären Replikationsleistung auf. Wie aus Abb. 34 zu entnehmen ist, weisen auch unbehandelte $\Delta ilvGM$ -Mutanten Stamm 5722 keinen intrazellulären Replikationsdefekt auf.

Um den Einfluss von Tri-Valin-Peptid auf den Referenzstamm 2958 zu untersuchen, wurde dem Valin- und Isoleucin-freien Medium Tri-Valin-Peptid zugegeben. Wie aus Abb. 34 ersichtlich ist, kam es durch die Behandlung der infizierten Zellkultur mit dem Tri-Valin-Peptid nicht zu einer Beeinträchtigung des intrazellulären Referenzstammes. Der Einfluss von Tri-Valin-Peptid auf die intrazelluläre $\Delta ilvGM$ -Mutante Stamm 5722 wirkte sich auf den intrazellulären Phänotyp annähernd so aus wie die Behandlung mit freier Aminosäure Valin. Dieses Ergebnis steht grundsätzlich im Einklang mit den auf M9-Minimalmedium- Agar-Platten gemachten Beobachtungen, wobei im vorliegenden *in vitro*-Versuch keine 100%ige Inhibierung erzielt werden konnte. Die möglichen Ursachen des beobachteten $\Delta ilvGM$ -Phänotyps werden im Diskussionsteil ausführlich beleuchtet (S. 135-139).

9.17 Die Rolle des Glycerol-Transportes

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wurden auch Mutante erzeugt, bei denen sowohl Komponenten des Glycerol-Transportes in Einzel- als auch in Kombinationsdeletion vorlagen (Abs. 4.8). Dazu wurde der Arbeitsfokus auf *S. Typhimurium* SL1344 Mutanten mit $\Delta glpT$ (kodierte Glycerol-3-Phosphat-Transport-Protein) und $\Delta glpF$ (kodierte Glycerol-Transport-Kanal) gelenkt. In der Überprüfung auf M9-Platten konnte kein wachstumshemmender Einfluss der Deletionen verzeichnet werden.

Bei der Zusammenfassung der durch Invasions- / Replikations-Assays gewonnenen Daten (vgl. Abb. 35) wurde festgestellt, dass die Einzeldelation von $glpF$ (Stamm 6382) bzw. $glpT$ (Stamm 6496) zu keiner signifikanten Veränderung der intrazellulären Replikationsleistung führten. Erst die Doppelmutation $\Delta glpF \Delta glpT$ (Stamm 6388) (MW: 1,2; SD: 0,2; $p > 0,05$) bewirkte eine leichte Erhöhung der Reproduktionsleistung auf vakuolärer Ebene (vgl. Abb. 35). Dieses Ergebnis ist interessant und wird im Diskussionsteil wieder aufgegriffen (S. 139-140).



▲ Abb.35: Relatives intrazelluläres Wachstum von Aufnahmemutanten für Glycerol: Auf den Wildtyp-Stamm 2958 (1,0) wurden die *S. Typhimurium* Stämme 6382 ($\Delta glpF$), 6496 ($\Delta glpT$) und 6388 ($\Delta glpF \Delta glpT$) normiert und analysiert. In Bezug auf diesen wird empirisch davon ausgegangen, dass es zu keinem Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp kam. Statistische Analyse mittels t-Test. (*), $p < 0.05$; (**), $p < 0.01$; (***), $p < 0.001$

10. Diskussion

10.1 Zielsetzung der Arbeit

Pathogene intrazelluläre Mikroorganismen akquirieren intrazellulär auf unterschiedliche Art und Weise Nährstoffe für die eigene Replikation. Die Erforschung der intrazellulären Nährstoffquellen und der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist eine noch relativ junge Disziplin und vieles liegt im Unklaren. Die weltweit rasant ansteigende Zahl an Resistenzausbildung sowohl gegenüber kommerziell genutzten als auch neuen Antibiotika rückt die intrazelluläre Nährstoffversorgung pathogener Keime in den wissenschaftlichen Fokus der heutigen Zeit. Studien von Becker *et al.* (2006) legen aufgrund des robusten Stoffwechsels von *Salmonella* nahe, dass es nur sehr wenige Möglichkeiten gibt, mittels gängiger antimikrobieller Strategien (Antibiotika) das intrazelluläre Pathogen zu bekämpfen. Die Entwicklung alternativer Bekämpfungsstrategien setzt jedoch voraus, dass ein umfassendes Verständnis der intrazellulären Lebensweise vorliegt, um mögliche Ansatzpunkte für die erfolgreiche Bekämpfung zu eröffnen. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde ein bakterielles Pathogen beleuchtet, welches sowohl den Menschen als auch verschiedene Tierspezies als Wirt nutzen kann (Saarinen *et al.*, 1996).

Trotz der Kenntnis über die umfassende Stoffwechsellistung von *Salmonella* ist nur sehr wenig über die intrazelluläre Nährstoffversorgung des Pathogens bekannt (Appelberg, 2006). Wie in der Einleitung bereits dargestellt wurde, existieren sowohl unterschiedlichste Vermutungen zu möglichen Nährstoffquellen (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010; Götz *et al.*, 2010) als auch einer etwaigen Verbindung zwischen Virulenz und Aminosäure-Auxotrophien (Virgilio & Cordano, 1981; Fields *et al.*, 1986; Leung & Finlay, 1991; Klose & Mekalanos, 1997; Appelberg, 2006). Gegen eine Verallgemeinerung einer Verbindung zwischen Virulenz und Aminosäure-Auxotrophien sprechen eine Vielzahl von Untersuchungen die mit virulenten auxotrophen Stämmen von *Salmonella* durchgeführt wurden, wie SL1344 (Virgilio & Cordano, 1981; O'Callaghan *et al.*, 1988; Leung & Finlay, 1991) oder SL3201 (Duguid *et al.*, 1975; Nevola *et al.*, 1985). Diese Untersuchungen zeigten, dass Histidin (Stamm SL1344) bzw. Histidin, Cystein und Leucin Auxotrophien, aber auch Inositol und Rhamnoseauxotrophien (Stamm SL3201), nicht zu Avirulenz führen. Weitere Indizien, die eine Verbindung von Auxotrophien und Virulenzmechanismen in Frage stellen, sind Beobachtungen, die an klinischen Isolaten von *S. Typhi* gemacht wurden. Dabei wurde gezeigt, dass viele Isolate Auxotrophien für Glutamin und/oder Tryptophan aufweisen (Virgilio & Cordano, 1981; Klose & Mekalanos, 1997). Auch zeigen andere intrazelluläre Pathogene wie *Legionella pneumophilla* oder *Chlamydia* spp, dass diese trotz des Fehlens von ganzen Aminosäure-Biosynthesewegen noch virulent sind

(Mintz *et al.*, 1988; Hatch, 1975; Stephens *et al.*, 1998; Jules & Buchrieser, 2007; Saka & Valdivia 2010). Die hier vorliegende Promotion konzentrierte sich aus folgenden Gründen auf die Aminosäure-Biosynthese: Einerseits aus den zuvor beschriebenen widersprüchlichen Beobachtungen, dass auxotrophe Isolate dennoch virulent sind und sogar in Abhängigkeit der Auxotrophie in der Lage sind, das Wirtstier zu töten (Histidin-Auxotrophie/Mäuse). Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass Publikationen erscheinen, die durch Aminosäure-Auxotrophien hervorgerufene Attenuationen als sicher für die Erzeugung von Vakzinierungsstämmen beschreiben (Eisenreich *et al.*, 2010). Ein anderer Punkt ist, dass Aminosäuren indirekt verantwortlich für die Regulation der Replikationsraten sind, da deren Konzentration die Beladung der tRNAs bestimmt. Dies bedeutet, dass das Verhältnis von beladenen zu unbeladenen tRNAs die basale intrazelluläre Konzentration des Signalmoleküls Guanosin-Tetraphosphat (ppGpp) beeinflusst. Dieses reguliert seinerseits wiederum die Menge bzw. die Synthese von ribosomaler RNA und tRNA und bedingt so die bakterielle Wachstumsrate (Pizzaro-Cerdá & Tedin, 2004; Thompson *et al.*, 2006, Jain *et al.*, 2006). Die bakterielle intrazelluläre Wachstumsrate wird als mögliche bakterielle Strategie angesehen, das Immunsystem zu umgehen (Tischler & McKinney, 2010).

Durch das Studium des intrazellulären Stoffwechsels bzw. die damit verbundene Analyse der vorhandenen intrazellulären Nährstoffe sollte, untersucht werden, welche Rolle Aminosäuren und Peptide für die vakuoläre Replikation von *S. Typhimurium* spielen. Dazu wurden sowohl im Vorfeld als auch während der Promotion verschiedenste Deletionsmutanten generiert, um anhand der ermittelten intrazellulären Replikationsrate einen Einblick in das intrazelluläre Nährstoffspektrum des Pathogens zu ermöglichen. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte erstmals in so umfassender Weise gezeigt werden, dass *Salmonella* Zugang zu verschiedenen Aminosäuren hat und somit Auxotrophien im gewählten Wirtszelltyp keine oder nur in bestimmten Ausnahmen eine Rolle spielen. Es konnten auch weitere Indizien dafür gesammelt werden, dass kleine Peptide unter intrazellulären Bedingungen vorliegen bzw. zugänglich sind und diese als Nährstoffquelle genutzt werden. Des Weiteren konnte der biochemische Zusammenhang beleuchtet werden, welcher letztlich für den durch die *aroA*-Deletion hervorgerufenen intrazellulären Phänotyp verantwortlich ist sowie der Umstand, dass die *aroA*-Deletion, als Einzeldelation, risikobehaftet und für die Generierung von Vakzinierungsstämmen nur bedingt geeignet ist. Mittels synthetischer Peptide war es möglich, *Salmonella* intrazellulär zu beeinträchtigen, was als Grundlage einer alternativen Methode zur Bekämpfung intrazellulärer *Salmonella* genutzt werden kann.

Durch die gezielte Störung der Aminosäure-Biosynthese bzw. von Aufnahmeprozessen, vermittelt durch Deletionen in relevanten Gen- und Operonstrukturen,

sollte untersucht werden, ob *S. Typhimurium* SL1344 Derivate in der intrazellulären Nische (SCV) Zugang zu Aminosäuren haben, die entweder als freie Aminosäuren und/oder in Peptidform vorliegen. Vermutet wurden in diesem Zusammenhang auch Faktoren, die eine Nährstoffaufnahme in die SCV vermitteln (Leung & Finlay, 1991).

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass bis auf wenige Ausnahmen die durch Deletion bedingten Auxotrophien für Aminosäuren sich nicht auf das intrazelluläre Wachstum auswirkten und somit deutlich die These unterstützen, dass *Salmonella* intrazellulär keine Limitierung dieser Nährstoffgruppe erfahren, da der Bedarf anscheinend über Transportsysteme für freie Aminosäuren oder Peptide gedeckt wird. Dieses Ergebnis liegt im allgemeinen Trend anderer Untersuchungen an Aminosäure-auxotrophen Mutanten von *Salmonella* (Eisenreich *et al.*, 2010). Aber, und dies muss hier deutlich hervorgehoben werden, stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Gegensatz zu älteren Veröffentlichungen (Virgilio & Cordano, 1981) bzw. zu relativ aktuellen Veröffentlichungen (Klose & Mekalanos, 1997). Es konnten allerdings auch intrazelluläre Phänotypen beobachtet werden, die Auffälligkeiten aufwiesen und auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

10.2 Histidin-Auxotrophie und intravakuoläre Folgen

Der Stamm SL1344 bot sich in besonderem Maße für diese Arbeit an. Zum Einem aus dem Grund, dass bereits umfassende Daten, basierend auf Arbeiten mit diesem Stamm, vorliegen und verifiziert sind. Zum anderen muss in deutlichem Hinweis auf die Vergleichbarkeit mit diesen zuvor erhobenen Daten/Arbeiten verwiesen werden, die in den letzten Jahrzehnten eine Fülle an Informationen zum Stamm selbst zur Verfügung stellten. Wären für die vorliegende Untersuchung ein anderer Stamm bzw. andere Derivate zum Einsatz gekommen, wäre die Vergleichbarkeit und somit der Erkenntnisgewinn in fragwürdigen Maße zu überprüfen gewesen. Daher erübrigt sich eine Argumentation, die rein auf Stamm bzw. Isolat spezifischen Beobachtungen beruht.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Rolle einer bei *S. Typhimurium* SL1344 auftretenden Histidin-Auxotrophie auf das intrazelluläre Replikationsverhalten des als Referenzstamm verwendeten Stammes 2958 analysiert. Wie aus der Untersuchung hervorging, trat nur ein leichter, nicht signifikanter Wachstumsunterschied im *hisG+* Δ *hisBCD* (Stamm 6510) Deletionshintergrund gegenüber dem Referenzstamm 2958 (*hisG46*) auf. Es ist denkbar, dass der sehr leichte Replikationsrückgang im *hisG+* Δ *hisBCD* Hintergrund auf einen Regulationseffekt zurückzuführen ist. Beobachtungen von Fields *et al.* (1986) zeigten bereits, dass nur bestimmte Mutationen, die die Histidin-Biosynthese betrafen, effektvolle Avirulenz bzw. Wachstumsdefekte sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Versuchen bedingten. Es wurde gezeigt, dass die gesetzten Mutationen die Dereprimierung der *hisG*-

Expression betrafen und somit entscheidend auf den intrazellulären Phänotyp wirkten, indem ein indirekter Mangel an Purin über die Erschöpfung an ATP vermutet wurde (Johnston & Roth, 1978; Fields *et al.*, 1986). Somit ist denkbar, dass die Wachstumsbeeinträchtigung als Folge eines auftretenden ATP-Mangels ausgelegt werden kann. Um dies aber eindeutig klären zu können, müssten entsprechende Messungen vorgenommen werden.

10.3 Manipulationen am C1-Stoffwechsel und deren Folgen

Wie im Einleitungsteil bereits beschrieben, ist der C1-Stoffwechsel von besonderer Bedeutung für den Gesamtmetabolismus des Pathogens, da über ihn der Synthese-Hauptanteil der C1-Transfer Verbindung Methyl-Tetrahydrofolat organisiert ist (siehe Abs. 4.2 und 4.2.1). Des Weiteren dient dieser Weg als Schnittstelle zwischen den Biosyntheserouten für Glycin über Serin und Threonin. Letztere speisen ihrerseits wiederum weitere Biosyntheserouten für Pyruvat, Cystein bzw. Methionin und dienen zur Synthese von Vorläufermolekülen der verzweigt-kettigen Aminosäuren (siehe Abs. 4.2.1, 4.3 und 4.4). Somit spielt die Synthese von Glycin über Serin und Threonin und den daran beteiligten Enzymen zur Generierung von methyliertem Tetrahydrofolat eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel.

Auffallende Veränderungen der intrazellulären Replikation traten bei der Analyse des C1-Stoffwechsels der $\Delta glyA$ -Mutanten auf. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass über die durch *glyA*-kodierte Serin-Hydroxymethyltransferase 60-70% der von der Zelle benötigten C1-Verbindungen in Form von methyliertem Tetrahydrofolat generiert werden. Fehlt dieser Reaktionsschritt, ist es der Mutante nicht möglich, diesen Wachstumsdefekt adäquat auszugleichen, was mit stark verlangsamten Wachstumsraten einhergeht (Dev & Harvey, 1984). Generell ist der beobachtete Phänotyp also keine Erscheinung, welche auf intrazelluläre Limitierung an Nährstoffen zurück zu führen ist, sondern eine direkte Folge der gesetzten Mutation, welche bereits Auswirkungen außerhalb der Wirtszelle hatte. Gleichzeitig bedeutet dies, dass die Zugänglichkeit bzw. die *de novo* Biosynthese der Aminosäuren (Serin, Glycin, Threonin) äußerst wichtig für die Funktionalität der intrazellulären Replikationsleistung ist. Wird der Zugang limitiert, etwa im intrazellulären Milieu durch z.B. den Eigenbedarf der Wirtszelle, hat dies fundamentale Auswirkungen auf den gesamten Metabolismus des Pathogens. Dies steht im Einklang mit dem auf M9-Minimalmedium-Agar-Platten (+/- Histidin) gemachten Beobachtungen mit den Stämmen 5832 und 6626, bei denen der Histidin-auxotrophe Stamm 5832 ($\Delta glyA$) nicht ohne supplementiertes Glycin und der Histidin-prototrophe Stamm 6626 ($\Delta glyA$) nicht ohne supplementiertes Serin kultiviert werden konnte. Erklärbar ist dies darüber, dass die Synthese von Glycin auch über den Threonin-Katabolismus verlaufen kann und Serin als zugängliche freie Aminosäure die Synthese über die Umformung von 3-Phosphoglycerat

erübrigt. Die *glyA*-Mutante musste grundsätzlich mit zusätzlichem Glycin versorgt und mit einem höherem Inokulum für die Infektionsversuche eingesetzt werden. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass theoretisch das aktive GCV-System mit zusätzlichem Glycin den Mangel an methyliertem Tetrahydrofolat ausgleichen könnte. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten aber, dass dies nicht der Fall ist. Dies prädestiniert die Serin-Hydroxy-Methyltransferase (*glyA*) als potentiell Ziel antimikrobieller Bekämpfungsstrategien, ähnlich zu denen, die bei der Malaria-Bekämpfung zum Tragen kommen (Sopitthummakhun *et al.*, 2012). Das Fehlen der über das *gcvTHP*-System generierten methylierten Tetrahydrofolate scheint keinen bzw. für die intrazelluläre Replikation keinen wichtigen Einfluss zu haben. Auch das Fehlen der durch das *gcvTHP*-System generierten Metabolite CO₂ und NH₃ scheint nicht ausschlaggebend zu sein, um eine etwaige intravakuoläre Pufferfunktion zu erfüllen.

Der Deletionshintergrund $\Delta aspC$ wies eine leichte Replikations-Beeinträchtigung auf, die sich sehr nah am empirisch abgeleiteten Begrenzungsbereich von -0,2 im Vergleich zum Referenzstamm ergab. Möglicherweise ist der leichte intrazelluläre Replikationsrückgang bei der $\Delta aspC$ -Mutante darauf zurück zu führen, dass im Abgleich mit weiteren durchgeführten Experimenten von Dr. Tedin nach Abschluss der praktischen Arbeiten für diese Promotion, mit einer $\Delta aspC$ - $\Delta tyrB$ -Mutante das Replikationsdefizit intrazellulär verstärkt werden konnte (persönliche Mitteilung). Da bei der $\Delta aspC$ -Mutante keine Auxotrophie für Aspartat generiert werden konnte, muss eine andere Aminotransferase (*tyrB*) deren Funktion übernommen haben. Es ist für *E. coli* bekannt (Gelfand & Steinberg, 1977), dass $\Delta aspC$ $\Delta tyrB$ -Deletionen zu einem strikten Bedarf an Tyrosin, aber nicht an Phenylalanin führten. Nur eine zusätzliche Deletion von *ilvE* (verzweigtkettige Aminosäure-Aminotransferase) führte zu einer Auxotrophie für Phenylalanin. Es ist naheliegend, dass die durch *tyrB* kodierte Aminotransferase in *Salmonella* die Funktion von *aspC* übernimmt und das der leichte Replikationsrückgang darauf zurückzuführen ist, dass es durch das Fehlen von *aspC* zu einem Rückstau von Oxalacetat kommt, welches sich letztlich auf den Tri-Karbonsäure-Zyklus (TCA) auswirkt. Da dieser Wachstumsdefekt aber nicht auf L-Broth-Medium beobachtet werden kann, bei dem das Wachstum auf der Verwendung von freien Aminosäuren bzw. Peptiden beruht, ist der beobachtete Wachstumsdefekt der $\Delta aspC$ $\Delta tyrB$ -Mutante auch aus der Perspektive der zur Verfügung stehenden Nährstoffe interessant. Anscheinend, und dies wird auch aus anderen Untersuchungen ersichtlich (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010), verwenden intrazelluläre *Salmonella* die Glykolyse bzw. den TCA-Zyklus. Finden an diesen zentralen Biosynthesewegen Beeinträchtigungen statt, mündet dies in reduzierter intrazellulärer Replikation.

Die Beobachtung, dass die $\Delta aspC$ $\Delta tyrB$ -Deletion zu einem wesentlich stärkeren Rückgang der intrazellulären Replikation führte (vgl. Anhang 14.2, D), könnte auch darauf

zurückzuführen sein, dass es nicht wie zunächst angenommen, zu einer Veränderung der Syntheserichtung des TCA aufgrund der Akkumulation von Oxalacetat kommt, sondern vielmehr zu einer Akkumulation von 4-Hydroxyphenyl-Pyruvat (HPP). Es ist bekannt, dass HPP ein potenter Inhibitor der humanen Dihydropteridin-Reduktase ist (Shen, 1984). Die Dihydropteridin-Reduktase ist auch in *E. coli* funktionell (Vasudevan *et al.*, 1992) und weist Dihydrofolat-Reduktase-Aktivität auf. Es kann vermutet werden, dass akkumulierendes HPP sich inhibitorisch auch auf die bakterielle Dihydropteridin-Reduktase von *Salmonella* auswirkt (*nfnB*, *S. Typhimurium* LT2; STM0578; Stand: 27.02.2013 (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?stm:STM0578)) und deswegen bei der $\Delta aspC \Delta tyrB$ -Deletionsmutante ein stärkerer Replikationsrückgang zu verzeichnen war. Interessant ist auch, dass die Dihydropteridin-Reduktase von *S. Typhimurium* LT2, laut KEGG-Datenbank (Stand: 27.02.2013, selbe Internetadresse wie oben angegeben), unter der Biosynthesewegbezeichnung stm01120 in Verbindung mit dem mikrobiellen Metabolismus in verschiedenen Umgebungen, also sich verändernden Umweltbedingungen, aufgeführt wird. Somit könnte diese im vakuolären Milieu eine Rolle einnehmen und durch Akkumulation von HPP in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, was letztlich für die $\Delta aspC \Delta tyrB$ -Mutante in einem Replikationsdefizit mündet. Es bleibt zu vermuten was genau für den Rückgang der intrazellulären Replikation verantwortlich ist und es ist darauf zu verweisen, dass es bei der für diese Arbeit untersuchten $\Delta aspC$ -Deletion, keine negative Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation zu beobachten war, weil höchstwahrscheinlich die Reaktion vom *tyrB*-Produkt übernommen wurde.

Die $\Delta serA \Delta thrBC$ -Mutation generierte eine Mutante, bei der die Synthese von Serin aus 3-Phosphoglycerat (3PG) unterbunden ist und bei der zusätzlich die Threonin-Auxotrophie auftritt (M9-Minimalmedium verifiziert). Das Ergebnis, dass unter vakuolären Bedingungen kein Replikationsunterschied zum Wildtyp auftrat, belegt das sowohl Serin als auch Threonin, in welcher Form auch immer, in ausreichenden Mengen zugänglich sein müssen. Bei der $\Delta thrBC \Delta kbl-tdh$ -Deletion wurde eine Mutante erzeugt, die unfähig ist, sowohl Threonin zu synthetisieren als auch über den *kbl-tdh* vermittelten Katabolismus in Richtung Gycin-Biosynthese Acetyl-CoA zu generieren (M9-Minimalmedium verifiziert). Die Mutante wies kein intrazelluläres Replikationsdefizit auf, was wiederum das Vorhandensein von Threonin bestätigt.

Die Deletion von *serA* und *ilvA* ($\Delta serA \Delta ilvA$) bedingte, dass Serin nicht aus 3-Phosphoglycerat synthetisiert werden konnte. Durch die zusätzliche Deletion von *ilvA* (Threonin-Dehydratase) konnte Threonin nicht mehr in α -Ketobutyrat umgewandelt werden. Somit wurde die Biosynthese von Isoleucin selbst beeinträchtigt. Die Beobachtung, dass die Mutante kein intrazelluläres Replikationsdefizit aufweist, lässt den Schluss zu, dass auch

Isoleucin in ausreichenden Mengen auf intravakuolärer Ebene zur Verfügung stehen muss. Wie im Ergebnisteil ersichtlich, wies ein Großteil der auxotrophen Stämme im C1-Stoffwechsel keine Beeinträchtigungen der intrazellulären Replikationsleistung auf. Dies bestätigt und erweitert die Arbeiten von Virgili & Cordano (1981) sowie Klose & Mekalanos, (1997). Dies ist ein sehr starkes Indiz dafür, dass die benötigten Aminosäuren zu jedem Zeitpunkt der intrazellulären Replikation vorlagen. Es muss natürlich berücksichtigt werden, dass im Anzuchtmedium von *Salmonella* Aminosäuren und Peptide beinhaltet sind, ebenso wie im Wirts-Zellkulturmedium. Mit Eintritt in die Wirtszelle (SCV), dem schrittweisen Transport in Richtung Zellkern und der Maturation der SCV stehen dennoch ausreichend Auxotrophie-überbrückende Nährstoffkonzentrationen zur Verfügung, die Wildtyp-gleiche Wachstumsraten ermöglichen.

Die Unterbindung des Transports bzw. der Aufnahme von Serin, Glycin und Threonin bei intrazellulären *S. Typhimurium* wird erwartungsgemäß durch die Biosyntheseleistung selbst ausgeglichen. Es muss darauf verwiesen werden, dass die betreffenden Aminosäuren auch eventuell durch andere Transportsysteme unspezifisch aufgenommen oder transportiert werden können (Ames, 1964; Payne, 1980).

Die $\Delta serA \Delta kbl-tdh$, $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh$ und $\Delta serA \Delta thrBC \Delta lta \Delta ilvA$ -Deletionen erwiesen sich ebenfalls als leicht beeinträchtigend und lagen sehr nah am empirisch abgeleiteten Begrenzungsbereich von -0,2 (ca. 20% Verminderung) im Vergleich zum Referenzstamm. Im Vergleich mit den Deletionen, die ebenfalls in die katabolen und anabolen Reaktionen für Serin, Glycin bzw. Threonin eingriffen und keine Beeinträchtigung bewirkten, steht das Ergebnis der genannten Mutanten unter kritischer Betrachtung. Die Regulation des C1-Stoffwechsels und der daran beteiligten Aminosäuren ist sehr komplex (Stauffer, 1987, 1996; Kredich, 1987, 1996; Cohen & Saint-Girons, 1987; Patte, 1996; Greene, 1996). Verschiedenste regulatorische Komponenten werden wirksam und sind untereinander weitläufig verknüpft. Es ist naheliegend, dass die beobachteten leichten Einschränkungen auf regulatorische Effekte oder Akkumulation bestimmter Verbindungen zurückzuführen sind und durch zusätzliche Deletionen wieder nivelliert wurden. Für die These spricht beispielsweise das Erscheinungsbild der $\Delta serA \Delta kbl-tdh \Delta ltaA$ -Mutationen im Histidin revertanten Hintergrund bzw. die $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA$ -Mutationen (hoch signifikant, MW: 0,49; STW: 0,19; p-Wert: <0,001). Die erstgenannte Mutationskombination unterscheidet sich von der zweitgenannten nur durch das Fehlen der $\Delta thrBC$ -Mutation. Trotzdem weist diese bereits ein Replikationsdefizit auf welches sich durch die Deletion von $\Delta thrBC$ in der zweiten Mutante deutlich verstärkt. Dies spricht auch für eine regulatorische/akkumulative Erscheinung, da die unterbundene Threoninbiosynthese durch die erfolgte Deletion nicht mehr als regulatorisches Bindeglied fungieren kann. Bei der $\Delta serA$

$\Delta thrBC \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA$ -Mutante kann man ableiten, dass Threonin immer noch durch das aktive *ilvA*-Produkt in α -Ketobutyrat umgewandelt wird und der entstehende Isoleucinspiegel regulatorisch auf die Aktivität des *ilvA*-Produkts einwirken kann (vgl. Abs. 4.2 und 4.2.1). In der $\Delta serA \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA$ -Mutante kontrolliert auch das *thrBC*-Produkt indirekt die α -Ketobutyrat-Synthese über die Threonin-Syntheseleistung. Wird dieser Kontrollpunkt deletiert, verstärkt sich das zuvor beobachtete Replikationsdefizit. Interessanterweise wurde die beobachtete Wachstumsbeeinträchtigung durch das Einfügen einer zusätzlichen Deletion ($\Delta ilvA$) wieder ausgeglichen ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA \Delta ilvA$). Auch die Wachstumsversuche auf supplementiertem M9-Medium zeigten, dass die Generierung bzw. die Verfügbarkeit von Isoleucin für die $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA \Delta ilvA$ -Mutante essentiell ist. Im Vergleich zu den *in vitro* erhobenen Daten lässt sich das Vorhandensein der Aminosäure Isoleucin in ausreichenden Mengen unter vakuolären Bedingungen ableiten, da sonst Wachstum auf näherungsweise Wildtyp-Niveau nicht möglich wäre. Wie bereits im Ergebnisteil angedeutet wurde (vgl. Abs. 9.5), könnte eine Akkumulation von α -Ketobutyrat für den intrazellulär auftretenden Phänotyp verantwortlich sein. Interessant ist, dass dieser Phänotyp überhaupt auftritt, denn der im Einleitungsteil aufgegriffene Erklärungsversuch bezieht sich auf die breitflächig auftretenden Effekte die im Zusammenhang mit α -Ketobutyrat gemacht wurden unter der Voraussetzung, dass eine Biosynthese stattfindet. Dazu zählen die folgenden, in Kurzübersicht dargestellten, Wirkungsbereiche von α -Ketobutyrat: Die Stimulation des Isoleucin-Katabolismus (Primerano & Burns, 1982), die Inhibierung der Valin- und Aspartatsynthese (Shaw & Berg, 1980 (a); Danchin *et al.*, 1984; Van Dyk & LaRossa, 1986), die Phantothanat-Synthese (Primerano & Burns, 1982), der Zuckertransport (Danchin *et al.*, 1984) sowie die Unterstützung bei der Synthese von Acetyl-CoA (Danchin *et al.*, 1984) und die Rolle als bakterielles Alarmon Guanosin-tetraphosphat (ppGpp) (Daniel *et al.*, 1983; Danchin *et al.*, 1984), ebenso die Beteiligung bei der Aminoacylation der tRNAs für Isoleucin und Valin (Primerano & Burns, 1982; Danchin *et al.*, 1984). Führt man sich aber vor Augen, dass wie im Ergebnisteil (vgl. Abs. 9.15 & 9.16) dargestellt, Peptide intravakuolär vorhanden sind, stellt sich die Frage, warum α -Ketobutyrat akkumuliert wird, wenn der Bedarf an Isoleucin, für dessen Biosynthese α -Ketobutyrat benötigt wird, auch in Form von Peptiden zugänglich ist und somit eine Biosynthese erübrigt. Die logische Schlussfolgerung aus diesen Erkenntnissen muss lauten, dass intravakuolär sowohl biosynthetische als auch Peptid-verwertende Leistung stattfindet und diese zu verschiedenen Zeiten. Da am vakuolären Kompartiment von *Salmonella* verschiedene Marker für die Interaktion mit dem frühen endozytotischen System sowie lysosomale Marker im späteren Verlauf auftreten (vgl. Abs. 6.6), bleibt zu vermuten, an welchem Punkt das Pathogen seine Glykolyse-abhängige Aminosäure-Biosyntheseleistung einschränkt und Peptide bzw. freie Aminosäuren verwertet. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wäre

es unabdingbar, eine Methode zur schnellen und kontaminationsfreien Isolierung für vakuoläre *Salmonella* beladene intrazelluläre Kompartimente zu etablieren, denn nur so wird es möglich sein, unstrittig mittels z.B. RNA-Mikroarray, Proteom- oder Metabolom-Analyse der isolierten Salmonellen genau ableiten zu können, in welchem Infektionsstadium welches Nährstoffangebot vom Pathogen verwendet wird und bei welcher genetischen Einschränkung welches alternative Versorgungssystem zum Tragen kommt.

Bei der Analyse von Deletionen die die Cystein- und Methionin-Biosynthese betrafen, wurden keine Auffälligkeiten im Wachstumsverhalten im Vergleich zum Referenzstamm festgestellt. Unter Berücksichtigung der M9-Plattentests konnte zumindest zweifelsfrei für Methionin gezeigt werden, dass dieses, in welcher Form sei dahingestellt, intrazellulär vorliegen muss, da sonst die $\Delta metE \Delta methH$ -Mutante nicht auf Referenzstamm Niveau replizieren würde.

10.4 Manipulation der Prolin-Biosynthese

Bei der Untersuchung der Prolin- und Arginin-Biosynthese erbrachten drei Mutanten interessante Ergebnisse. Dabei handelte es sich um die $\Delta proC$ -, $\Delta proB \Delta proC$ - und $\Delta argT$ -Deletionsmutanten. Die Deletionsmutation $\Delta proC$ bewirkte eine signifikante Verbesserung der intrazellulären Replikation mit hoher Standardabweichung. Die Doppelmutation $\Delta proB \Delta proC$ hingegen tendierte leicht in ein Replikationsdefizit welches sich aber immer noch im empirischen Toleranzbereich bewegte. Die Regulation des Prolin-Biosyntheseweges wird hauptsächlich durch Rückkopplungs-Inhibierung (feedback inhibition) der γ -Glutamyl-Kinase (*proB*) durch Prolin selbst (Smith *et al.*, 1984; Brady & Csonka, 1988) organisiert. Alle drei Enzyme der Prolin-Biosynthese (kodiert durch *proB*, *proA* und *proC*) werden auf einem unveränderlichen Level synthetisiert, unabhängig von der Verfügbarkeit von Prolin (Smith *et al.*, 1984; Brady & Csonka, 1988; Csonka, 1988). Hier stellt sich die Frage, warum es zu diesem intrazellulären Replikationsanstieg kam, wenn anscheinend keine regulativen Mechanismen greifen. Der schlüssigste Interpretationsansatz ist, dass das anfallende Produkt der γ -Glytamyl-Phosphat-Reduktase (*proA*), Pyrrolin-5-Carboxylat, wieder zu Glutamat umgewandelt wird. Dies geschieht über das durch *putA* (Surber & Maloy, 1998) kodierte bifunktionelle Enzym Prolin-Dehydrogenase (Oxidase) / Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (Ratzkin & Roth, 1978). Bekanntlich stammt der gesamte zelluläre Stickstoff für die Synthese von Makromolekülen in Enterobakterien von den Aminogruppen des Glutamins bzw. von Glutamat selbst (Reitzer & Magasanik, 1987) oder direkt von der Stickstoffaufnahme (NH_3). Glutamat stellt den größten Anteil an Stickstoff für die Synthese der meisten Aminosäuren zur Verfügung (Reitzer & Magasanik, 1987). Deswegen verwundert es nicht, dass es bei einer Akkumulation von Glutamat durch die Rückführung von Pyrrolin-5-Carboxylat zu einer Verbesserung der intrazellulären Replikation der $\Delta proC$ -

Mutante durch die zusätzlich zur Verfügung stehende Stickstoffquelle Glutamat kam. Da die Gene der Prolin-Biosynthese konstitutiv exprimiert werden (Brady & Csonka, 1988), wird auch konstitutiv Pyrrolin-5-Carboxylat synthetisiert, welches anschließend wieder katabolisiert wird. Damit unterstützt die Unterbindung der Prolin-Biosynthese durch die Deletion von $\Delta proC$ andere Biosynthesereaktionen, die sich in der positiven intrazellulären Replikation der $\Delta proC$ -Mutante manifestieren. Indirekt erklärt dies auch die bei der $\Delta proB$ $\Delta proC$ -Doppelmutante auftretende leichte Replikationsbeeinträchtigung. Durch das Fehlen von *proB* (γ -Glytanyl-Synthase) kann auch kein Pyrrolin-5-Carboxylat synthetisiert werden, da das Vorläufermolekül fehlt. Daraus ergibt sich, dass kein zusätzliches Glutamat über das bifunktionelle *putA*-Produkt synthetisiert werden kann. Indirekt zeigt also das Ergebnis der $\Delta proB$ $\Delta proC$ -Doppelmutante nicht nur, dass Prolin vorhanden ist, sondern auch wie hoch der Anteil an Prolin ist, der über Peptide oder Aminosäuren intravakuolär zugänglich zu sein scheint.

10.5 Δarg -Phänotyp unterschiedlich in Epithelzelllinie

Die dritte interessante Mutante trägt die $\Delta argT$ -Deletion. Auffällig bei dieser Mutante ist, dass kein Wachstumsdefizit entsteht. Ein Wachstumsdefizit wurde zuvor jedoch in Tierversuchen und *in vitro*-Experimenten mit Makrophagen festgestellt (Das *et al.*, 2010). Dieses Ergebnis verweist darauf, dass die Abwehrmechanismen in Epithelzellen einer anderen Strukturierung und Hierarchie untergeordnet sind bzw. bestimmten Stimuli unterworfen sein müssen, um erfolgreich intrazelluläre Pathogene abwehren zu können (Dimier & Bout, 1997). Andererseits entsteht anscheinend kein Konkurrenzverhalten zwischen Wirt und Pathogen um die Aminosäure Arginin, wie es im Fall von Makrophagen der Fall ist. Dies ist wiederum ein Hinweis dafür, dass zelluläre Abwehrmechanismen in Epithelzellen einer anderen Organisation unterworfen sind. Dieses Ergebnis zeigt einmal mehr, dass in Abhängigkeit der gesetzten Mutation und der verwendeten Versuchsbedingungen unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten sind. Deletionen, die hier keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation zu haben scheinen, müssen nicht zwangsläufig den gleichen Phänotyp in anderen Zelllinien oder im Tierversuch zeigen. Deswegen ist es unabdingbar, weitere Studien zur Validierung der hier erzeugten Daten durchzuführen.

10.6 Aromatische Aminosäuren und deren Rolle für die intrazelluläre Replikation

Bei den Deletionsmutanten, welche die Biosynthese als auch den Transport aromatischer Aminosäuren betrafen, fielen zwei Mutanten durch starke intrazelluläre Replikationsdefizite auf. Zu diesen zählten die bereits beschriebene $\Delta aroA$ -Deletion sowie die $\Delta aroP$ $\Delta pheP$ $\Delta tyrP$ Δmtr $\Delta pheA$ $\Delta trpBA$ -Mutante. Der Phänotyp der $\Delta aroA$ -Mutation mündet in einem Replikationsdefizit und in einer damit verbundenen Avirulenz in Mäusen (Hoiseh & Stocker,

1981). Wie aus der hier vorliegenden Untersuchung abzuleiten ist, stimmen die zuvor gemachten Ergebnisse (Hoiseith & Stocker, 1981) mit den in dieser Studie gemachten Beobachtungen überein. Die grundlegende Idee der $\Delta aroA$ -Mutation war es, einen sicheren Vakzinierungsstamm zu entwickeln, auf der Grundlage, dass in tierischen Geweben bestimmte Verbindungen, die die Deletion ausgleichen können (*para*-Aminobenzoat) nicht vorkommen (Hoiseith & Stocker, 1981). Diese Beobachtung wurde auch in der verwendeten Wirtszelllinie bestätigt und wird zu einem späteren Zeitpunkt in detaillierter Form erneut aufgegriffen.

Die Deletionskombination von $\Delta aroP$, $\Delta pheP$, $\Delta tyrP$, Δmtr , $\Delta pheA$ und $\Delta trpBA$ erbrachte einen extra- und intrazellulären Phänotyp mit einem stark verlangsamten Wachstum, da sowohl Aufnahmesysteme als auch Biosynthese in Kombination deletiert vorlagen. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben (vgl. Abs. 9.8) konnte ein Vollmedium wie L-Broth den Wachstumsdefekt nicht ausgleichen. Dies mag daran liegen, dass bedingt durch das verwendete Herstellungsverfahren Tryptophan und oder Tyrosin in diesem Medium fehlen. Als Zugabe in Form von freier Aminosäure nützt es der Mutante jedoch nicht, da für die Aufnahme in Frage kommende Transportsysteme deletiert wurden. Die einzige Möglichkeit Tryptophan aufzunehmen liegt in der Peptidaufnahme. Diese Annahme konnte auch zu Teilen bestätigt werden. Die Zugabe von steril-filtrierter 1% Casein behandelte Peptidlösung ("Casamino acids") zum Standard L-Broth-Medium, bewirkte eine deutliche Verbesserung der Wachstumsrate, da darin der Anteil an Tryptophan- bzw. Tyrosin-haltiger Peptide wesentlich höher liegt. Der Mangel an Tyrosin bzw. Tryptophan, aber auch das stark eingeschränkte extrazelluläre Protease-Repertoire von *Salmonella* (nur PgtE vorhanden, eine Serin-Protease, (Grodberg & Dunn, 1989) lässt den Schluss zu, dass Festmedien, die keine ausreichenden Mengen an kleinen Peptiden mit einem hohen Anteil an Tyrosin bzw. Tryptophan aufweisen, zur Kultivierung der Mutante nicht verwendet werden können. Anscheinend sind die noch vorhandenen Peptid- bzw. Oligopeptid-Aufnahmesysteme nicht in der Lage den Bedarf an Tyrosin und Tryptophan über die zugänglichen Peptide zu kompensieren. Somit erscheint der Anteil an verwendbaren Peptiden bzw. der Anteil an gebundenem Tyrosin und Tryptophan in diesen sehr gering zu sein. Andere größere Peptide, die nicht aufgenommen werden können, aber die benötigten Aminosäuren beinhalten, könnten überrepräsentiert sein. Leider war es nicht möglich auf kommerzieller wie auch auf Labor-Ebene, durch Überexpression und Aufreinigung, die benötigten Peptide in geeigneter Größe (<5-6 Aminosäuren) zu generieren bzw. zu beschaffen und dadurch die Mutanten erfolgreich in dem Maße auf Festmedium zu kultivieren, dass diese eine Wildtyp-gleiche Invasionsrate bzw. Virulenzgenexpression induzieren. Denn um Vergleichbarkeiten generieren zu können muss gewährleistet sein, dass die Virulenzgene unter optimalen

Bedingen expremiert werden können (Pizarro-Cerdá & Tedin, 2004; Thompson *et al.*, 2006; Vogel, 2009).

Eine weitere interessante Deletionskombination wies die $\DeltaaroP \DeltapheP \DeltatyrP \Deltamtr \DeltapheA$ -Mutante auf, die intrazellulär Wiltyp-gleiche Replikation zuließ. Dies unterstreicht die Annahme, dass intrazellulär ein Zugang zu kleinen Phenylalanin beinhaltenden Peptiden besteht. Allerdings ist dies kritisch zu betrachten, denn die Ergebnisse die auf M9-Festmedium, mit der für Phenylalanin auxotrophen $\DeltaaroP \DeltapheP \DeltatyrP \Deltamtr \DeltapheA$ -*Salmonella*-Mutante, erzielt wurden legen nahe, dass Ähnlichkeiten zu dem Phänotyp einer bestimmten Phenylalanin-auxotrophe Mutante von *E. coli* (Simmonds,1950; Katariki & Sato, 1953; Davis,1953) auftraten. Wahrscheinlich ist das Wachstum im Anstrich der M9-Festmediumplatten auf die Akkumulation von Prephenat (PPA) zurückzuführen welches unter einer pH-Wertabsenkung in einer Bypass-Reaktion in Phenylalanin, umgewandelt werden könnte. Da auch in *Salmonella* eine solche Bypass-Reaktion die Phenylalanin-Auxotrophie unter vakuolären Bedingen im sauren Milieu der SCV nicht auszuschließen ist, müssen die gesammelten Daten Grundlage weiterer Überprüfungen sein. Es ist aber immer noch umstritten, wie die SCV ansäuert und welche Unterschiede zwischen Makrophagen bzw. intestinalen Epithelzellen bestehen (Rathman *et al.*, 1996; Steele-Mortimer *et al.*, 2000; Martin-Orozco *et al.*, 2006; Drecktrah *et al.*, 2007). Es ist möglich, dass die Maturations-Geschwindigkeit der SCV entscheidend ist für die Ansäuerung. Ein anderer Grund könnte auch die eingesetzte MOI sein oder experimentelle bzw. technische Unterschiede. Um Klarheit zu schaffen, dass die gesetzten Deletionen die erwünschte Auxotrophie für Phenylalanin auf intrazellulärer Ebene gewährleisten oder nicht müssen weitere Untersuchungen folgen. Sinnvoll wäre hier auch eine $\DeltaaroP \Deltaphe \DeltatyrP \Deltamtr \DeltapheA \DeltatyrA \DeltatyrB$ -Mutante um sich der Fragestellung zu nähern. Solche Mutanten wurden in den *S. Typhimurium* SL1344 und 4/74 Hintergründen nach Beendigung der praktischen Arbeiten konstruiert (Dr. Tedin, persönliche Mitteilung).

Auch auffällig bei der Untersuchung der intrazellulären Replikation war, dass der mit dem Plasmid pWSK29 (Wang & Kushner, 1991) transformierte Kontrollstamm, einerseits einen leichten Replikationsrückgang im Referenzstamm-Hintergrund aufwies, während im $\DeltaaroP \DeltapheP \DeltatyrP \Deltamtr \DeltapheA$ -Hintergrund, dass Vorhandensein des Plasmids eine leichte Wachstumsverbesserung hervor rief. Dies ist überraschend, denn in Studien von Knodler *et al.* (2005) erwies sich das Plasmid besonders geeignet in intestinalen Epithelzellen, da es sich nicht auf Infektionsrate als auch intrazelluläre Replikation auszuwirken schien. Die Veränderungen der intrazellulären Replikation bewegten sich immer noch im empirisch abgeleiteten Toleranzbereich (+/- 0,2). Da es sich bei dem Plasmid pWSK29 um ein konstitutiv expremiertes Konstrukt handelt, welches in einer Kopiezahl von 6

bis 8 Plasmide pro Zelle auftritt (Wang & Kushner, 1991), können die erhobenen Daten so interpretiert werden, dass im Referenzstamm-Hintergrund die konstitutive Expression der auf dem Plasmid-kodierten beta-Laktamase bzw. des Replikations-Initiationsproteins (Wang & Kushner, 1991) zum Replikationsrückgang führen. Unter der Annahme, dass der Referenzstamm intrazellulär Aminosäure-Biosynthese betreibt, wie es zumindest in Makrophagen beschrieben wurde (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010; Götz *et al.*, 2010), würden Proteine synthetisiert die einerseits Ressourcen binden andererseits aber wieder abgebaut werden müssen und somit den Trägerorganismus unter intrazellulären Bedingungen durch Akkumulation belasten können. Im $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ -Hintergrund hingegen ist der Metabolismus auf die Verwertung von Peptiden bereits synchronisiert und entsprechende Peptidasen vorhanden. Kommt es nun zu einer konstitutiven Expression bzw. Transkription der auf dem Plasmid-kodierten beta-Laktamase bzw. des Replikations-Initiationsproteins werden diese wesentlich effizienter abgebaut was den Anteil an freien Aminosäuren in globaler Hinsicht erhöht und somit Replikationsfördernde Effekte haben könnte, wenn genug Ribosomen vorhanden sind. Um dieser Frage gezielt nachgehen zu können wären Untersuchungen mit 2-D-Gelelektrophorese nötig um die Hypothese zu stützen, dass beta-Laktamase bzw. das Replikations-Initiationsprotein im Referenzstamm-Hintergrund akkumulieren. Auch könnte hier ein Enzym-Assay quantitativ die Beta-Laktamase-Aktivität ermitteln und somit der Anteil des Enzyms bestimmt werden.

Die gesetzten $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ - bzw. zsg. $\Delta trpBA$ -Deletionen üben auch einen Einfluss auf die Regulation aus. Wenn man sich vor Augen führt, dass die $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ -Mutante keine intrazelluläre Wachstumsbeeinträchtigung erfährt und auch auf L-Broth-Medium keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Referenzstamm zu beobachten waren und die zusätzliche Deletion von *trpBA* (Tryptophan Synthase) diesen gravierenden intrazellulärer Replikations-Rückgang bewirkt (persönliche Mitteilung Dr. Tedin), zeigt dies deutlich, welche Rolle Tryptophan im untersuchten System einnimmt. Tryptophan gehört zu den essentiellen Aminosäuren die von der humanen intestinalen Wirtszelle nicht synthetisiert werden kann und somit vollständig aus dem Medium bzw. der Diät aufgenommen werden muss. Untersuchungen von Adibi *et al.*, (1967) zeigten, dass Tryptophan sehr effektiv (75,7%; +/- 3,7) auf intestinaler Ebene absorbiert wird und es ist ableitbar, dass das Konkurrenzverhalten um die Aminosäure zwischen Wirt und Pathogen entsprechend hoch ist. Auch erschöpft sich der Aminosäureanteil im Medium im Beobachtungszeitraum von 22 h (Medienwechsel berücksichtigt) was die Situation und die Rückgewinnung von Tryptophan über den proteinogenen Abbau der Wirtszelle erschwert. Interessant in diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung mit Poly-Tryptophan welches zum Zellkulturmedium der infizierten Wirtszellen gegeben wird. Kommt es hierbei

zur Wachstumsverbesserung der intrazellulären Mutante, wäre dies erneut ein deutlicher Hinweis für den Peptidzugang auf vakuolärer Ebene.

10.7 Peptidaufnahmesysteme und deren Rolle für die intrazelluläre Replikation

Bei der Untersuchung der intrazellulären Auswirkung von Deletionen, die die Peptidaufnahmesysteme betrafen, fiel auf, dass es bei drei Deletionskombinationen zu Auffälligkeiten kam. Die ersten beiden Wachstumsunterschiede konnten zwischen den Deletionskombinationen $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR$ und $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF$ beobachtet werden. Während der $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR$ Deletionshintergrund eine leichte Wachstumsverbesserung bewirkte, konnte bei der zusätzlich eingebrachten Deletion von $\Delta sapABCDF$ eine leichte Verringerung der intrazellulären Replikation beobachtet werden. Beide intrazellulären Phänotypen bewegten sich aber noch im empirischen Toleranzbereich. Es ist durchaus denkbar, dass es sich um einen regulatorischen Effekt handelt. Das Gen *ydgR* kodiert für eine Tripeptid-Permease (Hiles *et al.*, 1987) und wird, wie bereits in der Einleitung beschrieben, unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Da es mit dem Stress-Antwortsystem interagiert (Jamieson & Higgins, 1984, 1986; Gibson *et al.*, 1987), könnte sich das Fehlen des *ydgR*-Gens dahingehend positiv auswirken, dass mehr freie Induktoren für die entstehende Stressantwort (OmpR Proteine) vorhanden sind. Diese wiederum bewirken eine noch effizientere Anpassung an die sich verändernden intravakuolären Bedingungen (sinkender pH-Wert, reaktive Sauerstoffspezies) im Zuge der SCV-Maturation, was sich in einer leichten Verbesserung der intrazellulären Replikation im Vergleich zum Referenzstamm ableiten ließe. Die Reduktion der intrazellulären Replikation durch das Einfügen einer weiteren Deletion ($\Delta sapABCDF$) muss darauf zurückgeführt werden, dass das deletierte System eine Rolle bei der Antwort auf antimikrobiell wirkende Peptide zu haben scheint (Groisman *et al.*, 1992; Para-Lopez *et al.*, 1993, 1994). Die Beobachtung, dass es zu Wachstumsbeeinträchtigungen auf intrazellulärer Ebene kam, steht in Einklang mit Ergebnissen von Groisman *et al.* (1992). Welche Effekte Systeme haben können, die gegen antimikrobielle Peptide (AMPs) arbeiten, zeigt die dritte auffällige Mutante des $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP \Delta yejABEF$ -Deletionshintergrundes. Zuvor muss aber auf die anscheinende Regenerierung der intrazellulären Replikation durch die zusätzliche Deletion von *yhiP* im $\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP$ -Hintergrund eingegangen werden. Es ist interessant, dass es hier zu einer Normalisierung der intrazellulären Replikation kommt, was dahingehend ausgelegt werden kann, dass das *yhiP*-System die Sensitivität gegenüber AMPs wieder abschwächt, indem es durch sein Fehlen die Wirksamkeit der AMPs beeinträchtigt. Möglicherweise dient das *yhiP*-System zum Transport von bestimmten kleinen AMPs oder als Interaktionspunkt für AMPs für die

Etablierung einer Pore. Letztlich können nur durch weitere Untersuchungen zusätzliche Informationen generiert werden, die konkrete Rückschlüsse erlauben. Das *yejABEF*-Operon, welches ebenfalls eine Rolle bei der Abwehr antimikrobiell wirkender Peptide spielt (Eswarappa *et al.*, 2008), bewirkte eine zunehmende Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation. Da unter intravakuolären Bedingungen die Deletion der $\Delta sapABCDF$ bzw. $\Delta yejABEF$ eine mehr oder weniger starke Beeinträchtigung hervorriefen, muss dies dahin ausgelegt werden, dass antimikrobiell wirkende Peptide vorhanden sind, was bereits von Groisman *et al.* (1992) vermutet wurde. Wenn die beiden Systeme eine Rolle bei der Abwehr dieser Peptide einnehmen, stellt sich die Frage, woher diese Peptide stammen und ob diese aufgrund der ihnen entgegenwirkenden Systeme ($\Delta sapABCDF$ bzw. $\Delta yejABEF$) eventuell als Nährstoffquelle dienen könnten. Es gibt verschiedene Mechanismen, die Bakterien nutzen, um sich gegen AMPs zu wappnen. Dazu zählen beispielsweise das Heraustransportieren der AMPs oder die proteolytische Spaltung durch membranständige Proteasen (Eswarappa *et al.*, 2008). Es bleibt zu vermuten, welche Rolle Oberflächen-assoziierte Proteasen wie die durch *pgtE* kodierte (Ramu *et al.*, 2007) für die intrazelluläre Nährstoffakquirierung spielen. Interessant in diesem Zusammenhang wäre z.B. eine $\Delta pgtE$ -Mutante in Kombination mit dem $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ -Deletionshintergrund. Sollte sich bei dieser Mutante der intrazelluläre Phänotyp hinsichtlich seiner Replikation verschlechtern, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf die Richtigkeit der Annahme, dass die Funktion der Oberflächen-assoziierte Protease die Substrate der Peptidaufnahmesysteme stellt und somit der intravakuoläre AMP-Anteil gezielt für die Nährstoffversorgung genutzt wird.

10.8 Die *para*-Aminobenzoat Problematik

Ein anderer Bereich der hier vorliegenden Arbeit beinhaltete die Untersuchung der Rolle von *para*-Aminobenzoat (PABA) auf das Wachstumsverhalten von $\Delta aroA$ -Deletionen. Wie im Einleitungsteil bereits beschrieben, werden seit den frühen achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts $\Delta aroA$ -Deletion in Vakzinierungsstämmen eingebracht und als sicher deklariert, da sie den gewünschten Effekt der Vakzinierung erzeugen (Hoiseth & Stocker, 1981; Stoker *et al.*, 1983; Dougan *et al.*, 1988; Griffin & Barrow, 1993; Tan *et al.*, 1997; Alam *et al.*, 2009). In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass letztlich PABA allein, im verwendeten *in vitro*-Versuchsmodell, ausschlaggebend für die Fähigkeit der Referenzstamm-gleichen intravakuolären Replikation ist. Sowohl im Histidin-auxotrophen als auch revertant prototrophen Hintergrund konnte der replikationsfördernde Effekt nachgewiesen werden und bestätigt die gemachten Beobachtungen (Hoiseth & Stocker, 1981, Hölzer & Hensel, 2012). Interessant dabei war das Ergebnis, dass es anscheinend bei den Histidin-revertanten Stämmen zu einem wesentlich stärkeren fördernden Effekt kam als im Histidin-auxotrophen Hintergrund. Da in beiden Untersuchungen immer auf einen

unbehandelten Referenzstamm normiert wurde, bleibt festzuhalten, dass beide Referenzstammhintergründe dem gleichen Trend folgten, aber in unterschiedlich starker Ausprägung. Wie man aus der Analyse bezüglich der Auxotrophie für Histidin oder revertanter Stämme ableiten kann, ergab sich kein Wachstumsunterschied hinsichtlich der intrazellulären Replikation. Diesbezüglich können die Ergebnisse des revertanten Referenzstammes (Stamm 3946) dahingehend ausgelegt werden, dass die gesteigerte intrazelluläre Replikation der mit PABA behandelten Stämme mit der effizienteren Aufnahme von PABA zu tun hat. Im Histidin-auxotrophen Referenzstamm muss Histidin als freie Aminosäure oder als Peptid aufgenommen werden. Es ist denkbar, dass PABA mit einem für die Histidin-Aufnahme relevanten System um die Aufnahme konkurriert. Im revertanten Stamm findet dies nicht statt, was ein effizienteres Wachstum ermöglichen würde. Ein interessantes Beispiel eines solchen Transportsystems stellt das durch *abgT* bzw. *abgAB* kodierte in *E. coli* dar (Carter *et al.*, 2007). Dieses System ermöglicht die Aufnahme von *para*-Aminobenzoyl-Glutamat (Carter *et al.*, 2007) und dessen intrazelluläre Spaltung zu *para*-Aminobenzoat (Carter *et al.*, 2007). Allerdings steht dieser Behauptung eine andere Überlegung entgegen. Bezüglich der Aufnahme von PABA kann aufgrund seiner molekularen Struktur vermutet werden, dass es ähnlich wie Sulfonamid-Antibiotika (sehr ähnliche Struktur) die Membranen durch Diffusion (Zarfl *et al.*, 2008) passiert und somit auf ein Transportsystem nicht angewiesen ist. Ob letztlich ein bestimmtes Transportsystem für die Aufnahme verantwortlich ist oder nicht, könnten nur Deletions-Studien hervorbringen.

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt der Untersuchungen war, dass der gleiche intrazelluläre Phänotyp, der bei der Δ *aroA*-Deletion beobachtet wurde, auch bei allen Mutanten bestätigt werden konnte, die Deletionen im *para*-Aminobenzoat-Biosyntheseweg trugen. Durch die Zugabe von PABA glich sich der intrazelluläre Phänotyp dem des Referenzstammes wieder an. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass nicht das Fehlen von Chorismat oder 2,3-Dihydroxybenzoat oder das Unvermögen aromatische Aminosäuren, bedingt durch die Deletion von *aroA*, zu synthetisieren, zu dem führte, was Hoiseth & Stocker (1981) als Wachstumsdefekt *in vitro* sowie *in vivo* beobachteten. Sondern vielmehr die beobachtete Wachstumsinhibierung dahingehend interpretiert werden muss, dass der Folathaushalt durch das Fehlen von PABA so gravierend beeinträchtigt war, dass die Replikationsleistung rapide abnahm. Dies wiederum unterstreicht die Wichtigkeit dieser Beobachtung, denn durch Zugabe von PABA zu Tierfutter und dem Einsatz von Δ *aroA*-Deletion Vakzinierungsstämmen muss davon ausgegangen werden, dass es zu gravierender Durchseuchung des vakzinierten Tierbestandes kommt. Unter dem Link: http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/02_Futtermittel/01_Zusatzstoffe_70_524/futt_ermittel_zusatzstoffe_vitamine.pdf?blob=publicationFile&v=3 (Stand: 28.02.2013) findet sich eine Auflistung aller durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und

Lebensmittelsicherheit chemisch eindeutig beschriebenen Vitamine, Provitamine und ähnlicher Substanzen. Dazu zählt auch PABA (S. 10, oberer Link), welches weder in seiner Dosierung, noch auf die Tierart oder das Futtermittel eine gesetzlich geregelte Begrenzung erfährt. Somit muss dringend darauf verwiesen werden, dass Δ aroA-Deletionen nur durch zusätzliche Deletionen abgesichert werden können und dass stets eine Überprüfung des generierten Stammes unter Zuführung von PABA stattfinden muss.

Untersuchungen von Dougan *et al.* (1988) und Chatfield *et al.* (1992) zeigten bereits deutlich, dass zusätzlich eingefügte Deletionen zur Δ aroA-Mutation eine sinnvolle und nötige Ergänzung zur Generierung von sicheren Vakzinierungstämmen sind. Aus genetischen Gesichtspunkten heraus ist es eine Notwendigkeit, attenuierte Stämme zu erzeugen, deren Mutationen genau definiert sind und dadurch genau beschreibbar bleiben. Zur Vakzinierung eingesetzte Stämme, die durch undefinierte Mutationen attenuiert wurden, bergen grundsätzlich das Risiko, durch verschiedenste bekannte und unbekannte Einflüsse zu revertieren und somit erneut ihre ursprüngliche Pathogenität zurückzuerlangen Dougan *et al.*, 1988. Auch aus diesem Grund ist es sinnvoll, die *aroA*-Deletion mit weiteren genau definierten Deletionen bzw. nach den Vorschlägen von Chatfield *et al.*, 1992 zu erzeugen und einzusetzen.

Auch konnte durch Wachstumsversuche auf flüssigem Minimalmedium, welches nur mit Serum supplementiert wurde, gezeigt werden, dass die Δ aroA-Mutante stark verlangsamtes aber kontinuierliches Wachstum aufwies. Dies ist ein deutlicher Indikator dafür, dass *para*-Aminobenzoat im Serum vorhanden ist. Es lässt sich in der Zusammenfassung der gesammelten Daten vermuten, dass es sich bei dem Wachstumsdefekt der Δ aroA-Mutante um eine direkte Folge der gestörten Folat-Synthese handelt, da PABA, wie bereits in der Einleitung erwähnt, einen essentieller Bestandteil des Folatmoleküls darstellt.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass in Abgleich mit den auf M9-Fest- und Flüssigmedium gemachten Beobachtungen intrazellulär genug PABA vorhanden ist, um eine 50%ige Replikationsleistung im Vergleich zum Wildtyp in nicht supplementierter Zellkultur zu gewährleisten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Behauptung, dass die unterbundene Folat-Synthese allein für die Reduktion der intrazellulären Replikation der Δ aroA-Mutanten verantwortlich ist. Vergleicht man die Rolle von extrazellulärem PABA für die Δ aroA-Mutanten (vgl. Abb. 28) als auch für die Δ pabABC-Mutanten (vgl. Abb. 29), so fällt auf, dass die intrazelluläre Replikation beider Hintergründe auf Wildtypniveau verläuft. Diese Beobachtung spricht für die Richtigkeit dieser Annahme.

10.9 Die Rolle der verzweigt-kettigen Aminosäuren

Bei der Analyse der mit den verzweigt-kettigen Aminosäuren in Verbindung stehenden Biosynthesewege bzw. Transportsysteme wurden bei verschiedenen Deletionen Replikationsveränderungen beobachtet. Sowohl Deletionen, die Gene der Biosynthese als auch des Transportes betrafen, konnten positiv als auch negativ verlaufende Beeinträchtigungen feststellen lassen. Bezogen auf die Biosynthese konnte bei der Deletionsmutante $\Delta leuABCD$, bei der die Synthese von Leucin unterbrochen vorlag und somit die Mutante an wirtseigene Leucin-Vorkommen gebunden war, beobachtet werden, dass es zu einer leichten Wachstumsverbesserung kam, welche sich immer noch im Toleranzbereich bewegte. Es ist bekannt, dass eine Deletion, die die Promotor- und Operatorfunktion des *leuABCD*-Operons beeinträchtigt und zu einer Auxotrophie für Leucin führt (Graf & Burns, 1973; Quay *et al.*, 1975), keinen regulatorischen oder funktionellen Einfluss auf die Etablierung des Leucin-spezifischen Transportsystems LIV-I ausübt und somit die Versorgung mit Leucin nicht beeinträchtigt. Des Weiteren wurde vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen der positiven Regulation des Leucin-Operons und einem global agierenden Regulator, dem Leucin-ansprechenden regulatorischen Protein (Leucin-responsive regulatory protein) Lrp, gibt (Lin *et al.*, 1992), aber dies nicht direkt geschieht (Calvo & Matthews, 1994; Landgraf *et al.*, 1999). Da Lrp als global agierender Regulator (Calvo & Matthews, 1994; Newmann & Lin, 1995; Chen *et al.*, 1997, Cho *et al.*, 2008) dient, der die Expression verschiedenster biosynthetischer (Newman *et al.*, 1992), aber auch Transport-relevanter Systeme wie das *oppABCD*-Operon (Cho *et al.*, 2008), in positiv oder negativ regulatorischer Weise affiziert, kann vermutet werden, dass die beobachtete leichte Wachstumsverbesserung einem solchen regulativen Mechanismus geschuldet ist.

Bei der $\Delta ilvE$ -Deletion konnte beobachtet werden, dass es zu einem intrazellulären Replikationsdefizit kam. Auch hier mag man vermuten, dass es sich um ein durch den globalen Regulator Lrp hervorgerufenen Phänomen handelt, denn *ilvE* ist in *E. coli* durch Lrp direkt reguliert (Cho *et al.*, 2008). Fehlt der Antagonist des Regulators, steigt dessen „freie“ Konzentration. Es wurde vermutet, dass die *in vivo* Konzentration von Lrp einen regulativen Einfluss hat (Ernsting *et al.*, 1993; Calvo & Matthews, 1994), was möglicherweise der Grund für die in der Studie gemachten Beobachtungen ist. Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass es ebenfalls zu Wachstumsverbesserungen der $\Delta ilvBN$ $\Delta ilvGM$ $\Delta ilvIH$ - bzw. $\Delta ilvBN$ $\Delta ilvGM$ $\Delta ilvIH$ $\Delta leuABCD$ -Mutanten kam, die ihrerseits kombinierte Deletionen in genetischen Bereichen trugen, die durch Lrp in *E. coli* bzw. *S. Typhimurium* kontrolliert werden. So bei *ilvIH* (Wang & Calvo, 1993; Marasco *et al.*, 1994) und *leuABCD* (Lin *et al.*, 1992; Calvo & Matthews, 1994).

Im Vergleich zu der Deletionsmutante der Transaminase B (*ilvE*) fällt auf, dass es anscheinend einen Mangel an Leucin und Isoleucin auf intrazellulärer Ebene gibt, der durch intravakuoläre Vorkommen nicht ganz ausgeglichen werden kann (vgl. Abb. 30). Im Abgleich mit den Ergebnissen der Stämme 5434 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH$) und 5778 ($\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD$), die beide auf M9-Medium verifizierte strikte Auxotrophien für Valin, Isoleucin und Leucin aufwiesen, fällt auf, dass es sich bei dem $\Delta ilvE$ -Phänotyp um ein regulatorisch bedingtes Phänomen handeln muss, da durch die auxotrophen Stämme (5434, 5778) der Zugang zu den benötigten Aminosäuren bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 30).

Auch konnte indirekt in *E. coli* Δlrp -Mutanten gezeigt werden, dass die durch *livJ* und *livKHMGF* kodierte Komponenten konstitutiv unter Vorhandensein von Leucin exprimiert wurden, während im Wildtyp dies nur bei Leucin-Mangel der Fall war (Haney *et al.*, 1992). Dieses Ergebnis legt eine Regulation durch Lrp nahe (Haney *et al.*, 1992; Calvo & Matthews, 1994). Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten $\Delta brnQ$ - bzw. $\Delta livJ \Delta livKHMGF \Delta brnQ$ -Mutanten fielen durch eine leichte bis stärkere Verbesserung der intrazellulären Replikation auf, was dahingehend interpretiert werden kann, dass der Wegfall der zu reprimierenden Gene möglicherweise wieder mit erhöhter Lrp-Konzentration einhergeht bzw. die beeinträchtigte Regulation einen positiven Einfluss auf die intrazelluläre Replikation ausübt. Es konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass Lrp auch auf die Expression des *oppABCDF*-Operon einwirkt (Platko *et al.*, 1990). Möglicherweise resultiert dies unter intrazellulären Bedingungen in einem leichten Replikationsdefizit, wie es bei der $\Delta ilvBN \Delta ilvGM \Delta ilvIH \Delta leuABCD \Delta livJ \Delta livKHMGF \Delta brnQ$ -Mutante beobachtet wurde. Es wurde gezeigt, dass Lrp einen reprimierenden Einfluss auf das *oppABCDF*-Operon ausübt (Platko *et al.*, 1990). Dadurch können die erhobenen Daten dahingehend ausgelegt werden, dass die Einschränkung der Peptidaufnahme durch die Lrp-bedingte Reprimierung der *oppABCDF*-Expression in dem Unvermögen der Mutante mündet, Di- und Oligo-Peptide als Aminosäure bzw. Stickstoff- und Kohlenstoffquelle effizient zu nutzen.

Um einerseits die These zu stützen, dass intravakuolär u.a. Peptide durch *S. Typhimurium* metabolisiert werden und andererseits, um zu zeigen, dass es möglich ist, durch artifizielle/synthetische-Peptide intravakuoläre *Salmonella* zu beeinträchtigen, wurden Versuche unternommen, mittels induzierbaren Überexpressionsplasmiden Poly-Valin-Peptide herzustellen und diese nach Aufreinigung auf deren Wirksamkeit hin zu überprüfen. Dies sollte, wie in den Teilen Einleitung, Material und Methoden beschrieben, dazu genutzt werden, die $\Delta ilvGM$ -Mutante aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber steigender Valin-Konzentration und der damit verbundenen induzierten Hemmung der Isoleucin-Biosynthese am Wachstum auf extra- als auch auf intrazellulärer Ebene zu hindern.

Es konnten aus induzierter Überexpression stammende Peptide isoliert werden, die aber in *in vitro*-Versuchen keine inhibierenden Effekte hervorriefen. Als Schlussfolgerung aus

den erhobenen Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass die isolierten Peptide trotz Enterokinase-Behandlung durch die zur Verfügung stehenden Peptidaufnahmesysteme nicht in das Zellinnere transportiert werden konnten. Auch ist an dieser Stelle, wie im Einleitungsteil bereits aufgeführt, auf die begrenzte Aufnahme/Transportkapazität (2-6 Aminosäuren) der vorhandenen Peptidtransportsysteme zu verweisen, die *Salmonella* zur Verfügung stehen (Payne & Mashall, 2001). Unter dieser Betrachtung ist es denkbar, dass die angebotenen Peptide (27 Aminosäuren) nicht aufgenommen werden konnten. Dies bleibt jedoch rein spekulativ, da theoretisch Peptide bis zu einer Größe von 16 Aminosäuren durch das Omp-System transportiert werden können (Payne & Mashall, 2001). Diese müssten dann aber im periplasmatischen Raum durch dort ansässige Proteasen/Peptidasen eine weitere Proteolyse erfahren, um letztlich in das Zytosol überführt werden zu können. Leider ist die Informationslage in diesem Bereich immer noch sehr eingeschränkt.

10.10 Beeinflussung der intravakuolären Replikation durch artifizielles Peptid

Um dennoch auf intravakuolär Ebene zu zeigen, dass *Salmonella* durch synthetisch erzeugte Peptide beeinträchtigt werden können, wurden Penta- und Tri-Valin-Oligopeptide eingesetzt. Das Penta-Valin-Peptid konnte nicht in Lösung gebracht werden, was höchstwahrscheinlich auf die räumliche Struktur des Peptids und der damit verbundenen Hydrophobizität zurückzuführen ist. Das Tri-Valin-Peptid konnte jedoch in verschiedensten Lösungsmitteln aufgenommen werden, auch in definiertem Zellkulturmedium ohne Isoleucin und Valin, welche aufgrund der geringsten Parameterveränderung Anwendung in den *in vitro*-Versuchen fand.

Wie aus den Ergebnissen der M9-Plattentests hervor ging, konnte die $\Delta ilvGM$ -Mutante erfolgreich am Wachstum durch die Zugabe von Tri-Valin-Peptid gehindert werden, was als Grundvoraussetzung für die *in vitro*-Experimente galt. Die als verantwortlich geltenden Peptidaufnahmesysteme, durch die Tri-Valin-Peptid in das Zytoplasma von *S. Typhimurium* übertreten kann, sind die durch *ydgR (tpp)* und *oppABCDF* kodierten Transportsysteme. Interessanteweise arbeitet das durch *ydgR (tpp)* kodierte System wesentlich spezifischer und richtet sich nach hydrophoben Bestandteilen der Peptidstruktur speziell im N-terminalen Bereich für Methionin und Valin (Payne, 1983; Gibson *et al.*, 1984; Payne, 1995). Auch konnte gezeigt werden, dass im Zellkulturversuch keine zytotoxischen Effekte durch die Zugabe von Tri-Valin-Peptid induziert wurden. Da alle Ergebnisse unter einem zehn prozentigen Wert lagen, kann davon ausgegangen werden, dass das Peptid keinen bzw. nur sehr geringen Einfluss auf die Membranstabilität der Wirtszelle ausübt und so nicht zytotoxisch wirkt. Um dies jedoch untersuchen zu können, müsste eine $\Delta ilvGM \Delta oppABCDF \Delta ydgR$ -Mutante erzeugt werden. Diese Mutante sollte dann nicht mehr

inhibierbar sein, sofern die deletierten Aufnahmesysteme tatsächlich den Transport übernehmen.

Im *in vitro*-Versuch wurden sowohl bei Experimenten mit der freien Aminosäure Valin als auch mit Tri-Valin-Peptid selbst hohe bis sehr hohe signifikante Wachstums-Beeinträchtigungen erzielt. Dies verifiziert die Ergebnisse der $\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ -Mutante dahingehend, dass im Falle der mit Tri-Valin-Peptid gemachten *in vitro*-Versuche ein Zugang zu extrazellulär, im Wirtszellmedium vorliegenden Oligopeptiden besteht. Interessant ist auch der Befund, dass keine vollständige Inhibierung auf intravakuolärer Ebene erzielt werden konnte. Dies lässt sich nur durch das Vorhandensein von Isoleucin erklären. Wäre der Anteil an Isoleucin intravakuolär höher, würde man keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Referenzstamm und Mutante sehen. Grund für diese Aussage waren Beobachtungen, die in Versuchen auf Standardzellkulturmedium gemacht wurden, in dem Isoleucin vorhanden war und bei dem es keine intrazelluläre Beeinträchtigung der $\Delta ilvGM$ -Mutante unter Zugabe von Tri-Valin-Peptid gab, da die *de novo* Biosynthese von Isoleucin nicht mehr benötigt war (Daten nicht gezeigt). Indirekt ist dies auch eine Möglichkeit zur Bestimmung des intravakuolären Isoleucin-Spiegels. Dazu müsste man in entsprechend vordefiniertem Medium Konzentrationsverdünnungen der Aminosäure Isoleucin anlegen und parallele Kulturen, die aus der für die Infektion verwendeten Ausgangskultur stammen, innokulieren. Ausgehend von der Wachstumsrate, der Isoleucin-Konzentration und der ausplattierten Verdünnungsstufe nach 24 Stunden, könnte man ermitteln, bei welcher Isoleucin-Konzentration die gleiche CFU auftritt und somit indirekt die intravakuoläre Isoleucin Konzentration bestimmen. Das Isoleucin intravakuolär vorhanden ist, ist auch dahingehend interessant, da es höchstwahrscheinlich aufgrund der Ermangelung an Isoleucin auf der gesamten Versuchsebene zum schrittweisen Abbau von Kompartimenten innerhalb der Wirtszelle kommt. Was mit Autophagie-assoziierten Prozessen (siehe Einleitung) einhergeht, die die freie Aminosäure dem Zytosol wieder zuführen. Isoleucin selbst zählt zu den essentiellen Aminosäuren, bezogen auf die eukaryontische Seite der Wirtszellen, was somit eine Konkurrenzsituation zwischen Wirt und Pathogen entstehen lässt. Auch muss hier auf die Inhibierende Wirkung von hohen Valin-Konzentrationen auf die Acetylhydroxysäuresynthasen und die Akkumulation von α -Ketobutyrat hingewiesen werden. In hohen Konzentrationen kann dies einen toxischen bzw. regulatorischen Effekt hervorrufen wie es schon zuvor für die C1-Stoffwechsellmutanten mit den Deletionskombinationen $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA$ und $\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl\text{-}tdh \Delta ltaA \Delta ilvA$ im Diskussionsteil auf den Seiten 122-123 diskutiert wurde.

Wie im Einleitungsteil bereits dargestellt wurde, verfügen intestinale Epithelzellen über verschiedene Mechanismen, Nährstoffe aufzunehmen. Auch wurde im Einleitungsteil darauf hingewiesen, dass sich die Orientierung der Transportsysteme nicht ändert, was die

Nährstoffakquirierung auf intrazellulärer Ebene in der SCV in physiologischer Hinsicht erschwert. Somit bleibt zu vermuten, welcher Aufnahmemechanismus letztendlich dafür verantwortlich ist, dass Tri-Valin-Peptid in die SCV gelangte. Der Transport von Tri-Valin-Peptid in das Wirtszellinnere durch Systeme wie den PepT1-Transporter (Daniel, 2004; Pieri *et al.*, 2010) ist nachvollziehbar. Es stellt sich jedoch die Frage, wie das im Wirtszell-Zytosol befindliche Tri-Valin-Peptid in den Mengen in die SCV transportiert wurde, dass Wachstums-reduzierende Effekte beobachtet werden konnten. Dazu müssten hochaffine Transportsysteme in der SCV-Membran etabliert sein, die die Aufnahme ermöglichen. Viel wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, dass durch endozytotische Prozesse Tri-Valin-Peptid in das Wirtszell-Zytosol aufgenommen wurde und es zu Fusionen dieser endozytotischen Vesikel bzw. Lysosomen mit der SCV kam, was den Zugang zu Isoleucin (evt. aus Lysosomen) erklären würde. Hierbei stellt sich aber auch die Frage, ob das Tri-Valin-Peptid tatsächlich ausschlaggebend ist für die gemachte Beobachtung auf intrazellulärer Ebene. Denn unter der Annahme einer Maturation von endozytotischen Vesikeln mit Tri-Valin-Peptid hin zum späten Endosom/Lysosom würden die Tri-Valin-Peptide im Lysosom selbst zerlegt und somit der Anteil an freiem Valin steigen. Kommt es jetzt zur Fusion zwischen SCV und späten Endosom/Lysosomen, könnte der gleiche intrazelluläre Effekt beobachtet werden. Dies zeigen die Versuche mit der freien Aminosäure Valin im Zellkulturmedium der Wirtszelle. Hierbei ist aber zu bedenken, in wie weit bereits sehr kleine Peptide wie das Tri-Valin-Peptid im Lysosom durch die dort vorherrschenden Hydrolasen weiter zerlegt werden.

Aus Untersuchungen mit Makrophagen von Vertebraten weiß man, dass die Degradation von Peptiden mit einer bestimmten Größe (13-17 Aminosäuren) wichtig ist für die Interaktion mit Klasse II MHC-Molekülen, die für die T-Zellen Präsentation eingesetzt werden (Rudensky *et al.*, 1991; McCurley & Mellman, 2010). Makrophagen betreiben also eine sehr stringente Degradationskontrolle der internalisierten Antigenstrukturen (Delamarre *et al.*, 2005; McCurley & Mellman, 2010). Es ist bekannt, dass Klasse II MHC-Moleküle auch in intestinalen Epithelzellen, bei entsprechender Stimulation durch bakterielle Zell-Produkte oder inflammatorische Cytokine, zum Einsatz kommen (Hershberg & Mayer, 2000; Beers *et al.*, 2005). Weiterführend konnte auch gezeigt werden, dass die lysosomale Protease Cathepsin-S die Prozessierung des Klasse II MHC-Molekül vermittelten Antigenpräsentation organisiert (Beers *et al.*, 2005). Es ist durchaus nachvollziehbar, dass auch hier eine Kontrolle der Peptiddegradation stattfindet, um Antigenstruktur-Information effizient präsentieren zu können. Dies wiederum würde einer Degradation des Tri-Valin-Peptids bis auf die Aminosäureebene widersprechen und die These unterstützen, dass nicht freies Valin, sondern das Tri-Valin-Peptid selbst den Wachstums-reprimierenden Effekt hervorrief.

Die Idee der effizienten intrazellulären Bekämpfung von *Salmonella* über Peptide, die wie gezeigt intravakuolär zugänglich/vorhanden sind, stellt zukünftige Bemühungen für die Generierung von toxisch wirkenden Peptiden vor große Herausforderungen. Einerseits wird dies durch die Peptidgröße selbst bestimmt, denn das durch *oppABCDF* kodierte Transportsystem können maximal Peptide, die aus zwei bis sechs Aminosäuren bestehen, transportieren (Payne & Mashall, 2001). Andererseits stellen der ungeklärte Peptid-Zugang zur SCV sowie die Wirkung auf den Wirt weitere Probleme dar. Es gibt viele verschiedene Peptid-basierende, antimikrobiell wirkende Toxine (Payne, 1995). Ein wichtiger Ansatzpunkt ist die Klärung des Transportes in die Bakterienzelle, denn meist geht die Aufnahme mit einer anschließenden Degradation des Peptids einher (Payne, 1995). Es wurden in der Vergangenheit viele Versuche unternommen, gezielt synthetische Peptid-Pro-Toxine zu generieren und Mechanismen zu beschreiben, die den bakteriellen Aufnahmemechanismus mit der Wirkung verbinden. Als Beispiel dienen der als „*peptide prodrug transport*“ bezeichnete Mechanismus, der in Verbindung mit dem von Ames *et al.* (1973) und Payne (1995) beschriebenen „illegalen Transport“ (*illicit transport*) steht. Andere Termini/Mechanismen sind unter den Namen „*warhead delivery*“ (Ringrose, 1980) oder „*smugglins*“ (Payne, 1976; Payne, 1995) in der betreffenden Literatur aufzufinden. Dabei werden Prozesse beschrieben, bei denen die aufzunehmenden Molekülverbindungen aus mindestens zwei Teilen bestehen, die nach dem Eintritt in die Zelle voneinander getrennt werden, wobei ein Teil toxisch wirkt (Payne, 1995).

Um auf den Peptidzugang einzugehen, ist es höchstwahrscheinlich, dass es Interaktion mit endozytischen Vesikeln bzw. mit Kompartimenten der Endo- und Exozytoseprozesse gibt. Hierbei drängt sich die Frage auf, wie man gezielt eine solche Interaktion lenkt und ob hierbei der Einsatz von Mikrosphären für den intrazellulären Transport des Pro-Peptid-Toxins sinnvoll wäre. Argumente, die eine solche Vorgehensweise stützen würden, zeigen Untersuchungen von Haining *et al.* (2004). Dort wurde ein Influenza A Matrix-Protein in Mikropartikel/Mikrosphären aus Dipalmitoylphosphatidylcholine und pH-sensitivem Polymethacrylat (Eudragit E100) eingekapselt und für *in vitro*- als auch *in vivo*-Experimente genutzt. Basierend auf der Identifizierung spezieller zellulärer Mechanismen (Rodriguez *et al.*, 1999; Houde *et al.*, 2003; Haining *et al.*, 2004) bei denen Antigenstrukturen, eingeschlossen in Phagosomen direkt am Maturationsweg von MHC Klasse I Molekülen beteiligt sind (Haining *et al.*, 2004), sollte versucht werden, die Präsentation von Vakzin-Peptid (Influenza A Matrix-Protein) beladenen MHC Klasse I Molekülen an der Oberfläche der Zelle zu erhöhen und dadurch eine verstärkte CD8⁺T-Zellen vermittelte Reaktion zu generieren.

Interessant wären weiterführende Untersuchungen mit für *Salmonella* toxisch wirkenden Peptid-Toxinen wie Lindenbein (Molloy *et al.*, 1972). Andere Peptid-Toxine wie Alafosfalin (Perry *et al.*, 2002) oder Valclavam (Rohl *et al.*, 1987) sind weniger wirksam oder schädigen auch eukaryotische Zellen und sind somit ungeeignet. Das geeignete toxisch wirkende Pro-Peptid müsste ebenfalls in Mikrospheren aus Dipalmitoylphosphatidylcholine und pH-sensitivem Polymethacrylat (Eudragit E100) durch Sprühtrocknung (Haining *et al.*, 2004) eingebracht werden. Nach der Aufnahme der Mikrosphäre in die Wirtszelle (Makrophagen, eventuell auch Epithelzellen) würde es zu Fusionen zwischen Kompartimenten des endozytotischen Systems und den Mikrospheren kommen. Da diese pH-abhängig ihren Inhalt freisetzen, reichert man somit gezielt einen als sehr wahrscheinlich anzusehenden Nährstoffzugang von *Salmonella* mit toxischem Propeptid an. Diese würden, wie die Ergebnisse des Tri-Valin-Peptids und der für Phenylalanin-auxotrophen Mutanten zeigten, auch auf intrazellulärer Ebene durch *Salmonella* aufgenommen bzw. metabolisiert. Letztlich müssen weitere Untersuchungen vorangetrieben werden, um Alternativen zu herkömmlichen Therapiemöglichkeiten zu etablieren und um dem Auftreten von Resistenzen entgegenzutreten.

10.11 Auswirkungen der Unterbindung des Glycerol-Transportes

Auch die Unterbindung des Glycerol-Transportes durch Deletion von $\Delta glpF$ bzw. $\Delta glpT$ wirkte sich nicht negativ auf die Replikation aus. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Doppeldeletion eine leichte Verbesserung der intrazellulären Replikation im Vergleich zum Referenzstamm aufwies, welche sich aber immer noch im empirischen Toleranzbereich bewegte. Dies steht in deutlichem Kontrast zu den in *Listeria monocytogenes* gemachten Beobachtungen, dass die Unterbindung des Glycerol-Transports zur Beeinträchtigung der intrazellulären Replikationsleistung führt (Joseph *et al.*, 2006 und 2008; Eisenreich *et al.*, 2010). Somit müssen neben Glycerol auch andere Substrate vorhanden sein. Da *Salmonella* über verschiedene Transportsysteme für Kohlenwasserstoffverbindungen wie Mannose, Laktose und Glycerol verfügt, diese aber über eine regulatorisch organisierte Hierarchie arbeiten, ist die leicht erhöhte Replikationsleistung möglicherweise einem regulatorisch Mechanismus geschuldet. Es ist bekannt, dass der Glycerol-Transport an andere Aufnahmesysteme wie z.B. das Phosphotransferase-System (PTS) gekoppelt ist (Saier *et al.*, 1978; Nelson & Postma, 1984; Nelson & Schuitema, 1986, Saier, 1989) und auch Einfluss auf deren enzymatische Aktivität sowie Expression nimmt (Saier & Feucht, 1975). Es ist denkbar, dass durch die Deletion der auf der inneren Membran liegenden Systeme die Regulationshierarchie beeinflusst wird und es zur Aktivierung/Etablierung anderer Transportsysteme kommt, was in der Verbesserung der Replikationsleistung mündet. In einem Sammelartikel von Deutscher *et al.* (2006) wird auf die breite Verkettung der in der

Regulationshierarchie arbeitenden Systeme in Gram-negativen Enterobakterien hingewiesen. So wirken sich der Phosphorylierungsgrad des EIIA^{Glu}-Proteins des PTS, die Aktivität der Adenylat-Cyclase sowie die intrazellulären Konzentrationen an Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat sowohl direkt auf die Nährstoffaufnahme als auch auf die Expression aus. Im Abgleich mit den von *Listeria monocytogenes* gemachten Beobachtungen, muss darauf verwiesen werden, dass bestimmte Virulenzmechanismen auch an die intrazelluläre Nährstoffzugänglichkeit geknüpft sind. So wurde durch Chico-Calero *et al.*, 2002 gezeigt, dass ein Hexose-Phosphattransporter (Hpt) von *L. monocytogenes* intrazelluläre Replikationsfähigkeit entschieden beeinflusst. *Salmonella* hingegen tritt nur unter bestimmten Bedingungen in das Zytosol über und verbleibt normalerweise membrangebunden. Es bleibt zu vermuten, dass unter den dort vorherrschenden Bedingungen das Fehlen der besagten Glycerol-Transportsysteme aufgrund der verfügbaren Nährstoffe die Replikationsfähigkeit nur auf regulatorischer Ebene beeinflusst und nicht wie bei *L. monocytogenes* zum Unvermögen, die Hauptnährstoffquelle zu akquirieren.

10.12 Zusätzliche Ergebnisse die Aminosäure und Peptidzugang stützen

Zusätzlich durchgeführte Analysen nach Beendigung der praktischen Arbeiten unterstützen die These der intravakuolären Verfügbarkeit von Aminosäuren bzw. Peptiden (vgl. Anhang 14.2 A-D) und werden im Folgenden kurz beleuchtet.

Die Deletion von *glnA* (Glutamin-Synthetase) (vgl. Anhang 14.2 A), bewirkte hingegen eine Beeinträchtigung der intrazellulären Replikation. Was dahingehend ausgelegt werden kann, dass der intravakuoläre Vorrat an Glutamat, ob als freie Aminosäure oder in Peptidform, nicht komplett ausreicht um auch den Glutamin-Bedarf zu decken. Erst durch die Zugabe von Glutamat zum Zellkulturmedium war es möglich die Replikationsleistung der Δ *glnA*- (Glutamin-Synthetase) Mutante wieder auf Wildtypniveau zu erhöhen. Auch die Unterbindung der Glutamat- und Glutamin-Biosynthese durch die Deletion von *gdhA* (Glutamat-Dehydrogenase) in Kombination mit *gltBD* (Asparagin-Synthetase-B) (vgl. Anhang 14.2 B), wirkte sich nicht auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit aus. Was erneut zeigt, dass der strikte Bedarf an Glutamat auf intrazellulärer Ebene soweit kompensiert werden kann, dass Wildtypgleiches intrazelluläres Wachstum möglich ist.

Die Deletionen von *asnA* (Asparagin-Synthetase-A) und *asnB* (Asparagin-Synthetase-B) (vgl. Anhang 14.2 C) mündeten hinsichtlich der intrazellulären Replikation nicht in einer totalen Replikationsinhibierung sondern sie zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die Δ *glnA*-Deletionsmutante. Aspartat konnte nicht mehr in Asparagin umgeformt werden. Dennoch zeigt es sich, dass die Mutante auf intrazellulärer Ebene Replikation aufwies. Zwar stark verlangsamt aber stetig. Was wiederum zusätzlich die These stützt, dass die benötigte Aminosäure entweder in freier oder in Peptidform vorliegen muss. Die Zugabe

von Asparagin zum Zellkulturmedium ermöglichte es der $\Delta asnA \Delta asnB$ -Mutante wieder auf Wildtypniveau zu replizieren. Dies zeigt, dass die intrazellulären Vorräte stetig verfügbar aber in ihrer verfügbaren Menge limitiert sind.

Wie im Anhang unter 14.2 D ersichtlich, erfuhr die $\Delta aspC \Delta tyrB$ -Mutante eine deutliche Beeinträchtigung der Replikation, wuchs aber dennoch stetig weiter. Da bei der Mutante die Biosynthese von Phenylalanin, Tyrosin und Aspartat direkt unterbunden wurde (vgl. Abb. 3 und 7), stellt das stetige intrazelluläre Wachstum ein weiteres deutliches Indiz dafür dar, dass ein intrazellulärer Zugang zu freien Aminosäuren oder Peptiden besteht. Anscheinend sind die intrazellulären Wachstumsraten nahezu vergleichbar und nur die Anzahl der intrazellulären *Salmonella* bedingt, dass sich beide Graphen unterscheiden. Auch die Lysin-Biosynthese wurde durch die Deletion von *lysA* (Diaminopimela-Decarboxylase) im letzten Syntheseschritt direkt unterbunden. Auch hier zeigt sich kein Unterschied zum Wildtyp, was wiederum die These unterstützt, dass auch ein Zugang zu dieser essentiellen proteinogenen Aminosäure besteht (vgl. Anhang 14.2 D). All diese Ergebnisse stützen sehr deutlich die These der Verfügbarkeit von Aminosäuren und / oder Peptiden innerhalb der SCV.

11. Zusammenfassung

Hintergrund

Der Zoonose-Erreger *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serovar Typhimurium ist neben dem Serovar *Enteritidis* verantwortlich für den Hauptanteil von non-typhoiden Salmonelosen weltweit mit jährlich mehreren Millionen Fällen und tausenden Toten (Hohmann, 2001; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Intensiver Einsatz von Antibiotika sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin sowie in der Tierhaltung führten in den vergangenen Dekaden zu einem rasanten Anstieg multiresistenter *Salmonella* Stämme wie z.B. Stamm DT104 (Clockaert & Schwarz, 2001). Generierung alternativer Bekämpfungsstrategien sowie die Etablierung sicherer Vakzinierungsstämmen sind daher sowohl von großem humanitären als auch ökonomischem und ökologischem Interesse. Die intrazelluläre Replikation des Pathogens ist an die vorhandenen Nährstoffe bzw. adaptierte Biosyntheseleistung geknüpft. Eine gezielte Unterbrechung der Nährstoffquelle(n) bzw. von essentiellen Biosynthesewegen würde eine effektvolle Alternative zur herkömmlichen Antibiotikatherapie erschließen und neue Erkenntnisse für die Generierung von Vakzinierungsstämmen liefern. Die Beobachtung, dass der zur Vakzinierung eingesetzte Stamm SL1344 Δ *aroA* durch die Zugabe von *para*-Aminobenzoessäure zur Diät der gewählten Versuchstiere eine erneute Hochvirulenz hervorrief (Stocker *et al.*, 1983), führte zu der Annahme, dass intrazellulär persistierende *Salmonella* Typhimurium Zugang zu extrazellulären Nährstoffen haben müssen. Dies warf drei grundsätzliche Fragen auf, die in dieser Studie untersucht werden sollten: Ist die *de novo*-Biosynthese von Aminosäuren essentiell für die intrazelluläre Replikation? Welche Rolle spielen Aminosäuren bzw. Peptide für das intrazelluläre Wachstum? Besteht die Möglichkeit, intrazelluläre *Salmonella* Typhimurium durch die Zugabe artifizierender Peptide zu beeinträchtigen?

Methoden

Um die Rolle der *de novo*-Aminosäure-Biosyntheseleistung bzw. von Peptiden und ihre intrazelluläre Verfügbarkeit untersuchen zu können, wurden rund 130 Mutanten erzeugt, bei denen diverse Aminosäure-Biosynthesewege bzw. -Transportsysteme unterbrochen bzw. deletiert vorlagen. Der Einfluss dieser rund 200 Mutationen (Einzeln/Kombination) wurde durch *in vitro*-Infektionsversuche an humanen intestinalen Epithelzellen (LoVo) mittels Invasions- und Replikations-Assays analysiert. Dabei wurde die Auswirkung der Deletion auf die intrazelluläre Replikation mit der des Wildtypstammes verglichen.

Ergebnisse / Interpretation

In der vorliegenden Studie konnte erstmals in umfassender Weise gezeigt werden, dass, entgegen der herrschenden Lehrmeinung (Haraga *et al.*, 2008), die *de novo*-Biosyntheseleistung von Aminosäuren keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation innerhalb der verwendeten Zelllinie hat. Des Weiteren konnten Beweise dafür gesammelt werden, dass intrazelluläre *S. Typhimurium* Zugang zu freien Aminosäuren haben bzw. dass Peptide das Nährstoffspektrum erweitern könnten. Es konnte ebenfalls erstmals gezeigt werden, dass es generell möglich ist, die intrazelluläre Replikation von *Salmonella* Typhimurium über die Zugabe von artifiziellen Peptiden zu beeinträchtigen. Weiterführend wurde der biosynthetische Zusammenhang des Δ aroA-Phänotyps unter Einsatz des weit verbreiteten und flächendeckend genutzten Tierfutterergänzungsmittels „*para*-Aminobenzoesäure (PABA)“ analysiert. Die erzeugten Daten können zukünftige genutzt werden um alternative Behandlungsmethoden gegen *Salmonella*-Infektionen zu etablieren.

12. Summary

Background

The zoonotic pathogen *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serovar Typhimurium, is together with serovar Enteritidis, responsible for the majority of non-typhoid salmonellosis annually worldwide with millions of cases and thousands of deaths (Hohmann, 2001; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Excessive use of antibiotics in both human and veterinary medicine and in animal husbandry in recent decades led to a rapid rise of multidrug-resistant *S. Typhimurium* strains like strain *S. Typhimurium* DT104 (Cloeckaert & Schwarz, 2001). The generation of alternative control strategies and the establishment of safe vaccination strains are therefore of great humanitarian, economic and ecological interests. Intracellular replication of the pathogen is linked to the available nutrients or adaptation of the pathogen to intracellular metabolism. Targeted disruption of the nutrient source or of essential biosynthetic pathways could open up alternatives to conventional antibiotic therapy and provide new insights for the generation of vaccination strains. The observation that the SL1344 Δ aroA-vaccine regained virulence *in vivo* by the addition of *para*-aminobenzoic acid to the diet of the selected experimental animals (Stocker *et al.*, 1983) led to the assumption that intracellular persistent *Salmonella* must have access to intra- or extracellular nutrients. This raised three fundamental questions that were addressed in this study: Is the *de novo* biosynthesis of amino acids essential for intracellular replication? What is the role of amino acids or peptides for intracellular growth? Can intracellular *Salmonella* be affected or accessed by the addition of artificial peptides?

Methods

To investigate the role of *de novo* amino acid biosynthesis, of peptides and their intracellular availability approximately 130 mutants were generated in which various amino acid biosynthetic pathways and transport systems were deleted. The influence of these approximately 200 mutations (single / combined) was analyzed by *in vitro* infection experiments on human intestinal epithelial cells (LoVo) with invasion / replication assays. The effect of the deletion(s) on the intracellular replication was compared with that of the wild type strain.

Results/Interpretation

I have shown in a systematic study that, contrary to the prevailing view (Haraga *et al.*, 2008), the *de novo* biosynthesis of amino acids has little or no effect on the intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium in human intestinal epithelial cells. I acquired new evidence that intracellular *S. Typhimurium* have access to both free amino acids and peptides, which extend the nutrient spectrum within host cells. It could also be shown for the first time that it is possible to target intracellular *Salmonella* through the addition of external, artificial peptides. Furthermore, the role of the *aroA* mutation, a widely used basis for generation of vaccine strains, was analyzed in detail with regard to its connection with the biosynthesis of *para*-amino benzoic acid (PABA), a compound found in animal feed supplements. The data generated in this study provide a significant contribution supporting future studies toward understanding the intracellular growth of *Salmonella* as well as generation of alternative treatments of *Salmonella* infections.

13. Literaturliste

- Abouhamad, W. N., & Manson, M. D. (1994). The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression. *Mol Microbiol*, *14*(5), 1077-1092.
- Abrahams, G. L. & Hensel, M. (2006). Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol*, *8*(5), 728-37.
- Abu Kwaik, Y. (1996). The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol*, *62*(6), 2022-2028.
- Ahmer, B. M., Tran, M., & Heffron, F. (1999). The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol*, *181*(4), 1364-1368.
- Adibi, S.A. & Kim, Y. S. (1981). Physiology of the Gastrointestinal Tract. Ed: Johnson L. (Raven: New York), (Vol: 2) 1073-1095.
- Aiastui, A., Pucciarelli, M. G. & Garcia-del Portillo, F. (2010). *Salmonella enterica* serovar typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun* *78*(6), 2700-13.
- Alam, J., Singh, B. R., Hansda, D., Singh, V. P., & Verma, J. C. (2009). Evaluation of *aroA* deletion mutant of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Abortusequi for its vaccine candidate potential. *Indian J Exp Biol*, *47*(11), 871-879.
- Altmeyer, R. M., McNern, J. K., Bossio, J. C., Rosenshine, I., Finlay, B. B., & Galan, J. E. (1993). Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol Microbiol*, *7*(1), 89-98.
- Alpers, D. (1987). Physiology of the Gastrointestinal Tract. Ed.: L. Johnson, (Raven: New York), (Vol: 2) 1469-1487.
- Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., Lopez, M., Bernardo, A., et al. (2011). *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, *157*(Pt 12), 3268-3281.
- Ames, B. N., Ames, G. F., Young, J. D., Tsuchiya, D., & Lecocq, J. (1973). Illicit transport: the oligopeptide permease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *70*(2), 456-458.
- Ames, G. F. (1964). Uptake Of Amino Acids By *Salmonella* Typhimurium. *Arch Biochem Biophys*, *104*, 1-18.
- Ames, G. F., & Lever, J. (1970). Components of histidine transport: histidine-binding proteins and hisP protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *66*(4), 1096-1103.
- Ames, G. F., & Lever, J. E. (1972). The histidine-binding protein J is a component of histidine transport. Identification of its structural gene, *hisJ*. *J Biol Chem*, *247*(13), 4309-4316.
- Ames, G. F., & Roth, J. R. (1968). Histidine and aromatic permeases of *Salmonella typhimurim*. *J Bacteriol*, *96*(5), 1742-1749.
- Appelberg, R. (2006). Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J Leukoc Biol*, *79*(6), 1117-1128.
- Bai, J.P., & Amidon, G.L. (1992). Structural specificity of mucosal-cell transport and metabolism of peptide drugs: implication for oral peptide drug delivery. *Pharmaceutical research* *9*(8), 969-978.
- Bakowski, M. A., Braun, V., & Brumell, J. H. (2008). *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*, *9*(12), 2022-2031.
- Balana-Fouce, R., Calvo-Alvarez, E., Alvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Perez-Pertejo, Y., & Reguera, R. M. (2012). Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol*, *181*(2), 85-93.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., & Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, *92*(3), 367-380.
- Bäumler, A. J. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol*, *5*(8), 318-322.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, *64*(5), 1862-1865.

- Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., Meyer, T. F., Mann, M. & Bumann, D. (2006). Robust Salmonella metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature*, 440(7082), 303-307.
- Beers, C., Burich, A., Kleijmeer, M. J., Griffith, J. M., Wong, P. & Rudensky, A. Y. (2005). Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo. *J Immunol*, 174(3), 1205-1212.
- Berg, C. M., Whalen, W. A., & Archambault, L. B. (1983). Role of alanine-valine transaminase in *Salmonella typhimurium* and analysis of an *avtA::Tn5* mutant. *J Bacteriol*, 155(3), 1009-1014.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P. & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*, 12(9), 2385-97.
- Berger, K. H., & Isberg, R. R. (1993). Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, 7(1), 7-19.
- Bertrand, S., Rimhanen-Finne, R., Weill, F. X., Rabsch, W., Thornton, L., Perevoscikovs, J., van Pelt, W. & Heck, M. (2008). *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro Surveill*, 13(24), 1-6.
- Beuzon, C. R., Meresse, S., Unsworth, K. E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E. & Holden, D. W. (2000). *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J*, 19(13), 3235-3249.
- Beuzon, C. R., Salcedo, S. P., & Holden, D. W. (2002). Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology*, 148(Pt 9), 2705-2715.
- Birmingham, C. L., & Brumell, J. H. (2006). Autophagy recognizes intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in damaged vacuoles. *Autophagy*, 2(3), 156-158.
- Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T., & Brumell, J. H. (2006). Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J Biol Chem*, 281(16), 11374-11383.
- Bollheimer, L. C., Buettner, R., Kullmann, A., & Kullmann, F. (2005). Folate and its preventive potential in colorectal carcinogenesis. How strong is the biological and epidemiological evidence? *Crit Rev Oncol Hematol*, 55(1), 13-36.
- Bowden, S. D., Rowley, G., Hinton, J. C. & Thompson, A. (2009). Glucose and glycolysis are required for the successful infection of macrophages and mice by *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun*, 77(7), 3117-3126.
- Brady, R. A. & Csonka, L. N. (1988). Transcriptional regulation of the proC gene of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 170(5), 2379-2382.
- Brenner, M. & Ames, B. N. (1971). The histidin operon and its regulation, in *Metabolic Pathways* Chap. 5, *Metabolic regulation.*, Ed.: Vogel, H. J., Academic Press, Inc., New York
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, 38(7), 2465-2467.
- Broer, S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev*, 88(1), 249-286.
- Brown, G. M. & Williamson, J. M. (1987). Biosynthesis of Folic Acid, Riboflavin Thiamine, and Phantothenic Acid, Chap. 34(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Brumell, J. H., & Grinstein, S. (2004). *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol*, 7(1), 78-84.
- Brumell, J. H., Tang, P., Mills, S. D., & Finlay, B. B. (2001). Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Salmonella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic*, 2(9), 643-653.

- Brumell, J. H., Tang, P., Zaharik, M. L., & Finlay, B. B. (2002). Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infect Immun*, 70(6), 3264-3270.
- Bueno, S. M., Riquelme, S., Riedel, C. A. & Kalergis, A. M. (2012). Mechanisms used by virulent *Salmonella* to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity. *Immunology* 137(1), 28-36.
- Bumann, D. (2009). System-level analysis of *Salmonella* metabolism during infection. *Curr Opin Microbiol*, 12(5), 559-567.
- Burns, D. M., Burger, M. J., & Beacham, I. R. (1995). Silent genes in bacteria: the previously designated 'cryptic' *ilvHI* locus of '*Salmonella typhimurium* LT2' is active in natural isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 131(2), 167-172.
- Calvo, J. M. & Matthews, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 58(3), 466-490.
- Calvo, R. A., & Calvo, J. M. (1967). Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of *Salmonella typhimurium*. *Science*, 156(3778), 1107-1109.
- Carter, E. L., Jager, L., Gardner, L., Hall, C. C., Willis, S. & Green, J. M. (2007). *Escherichia coli* *abg* genes enable uptake and cleavage of the folate catabolite p-aminobenzoyl-glutamate. *J Bacteriol*, 189(9), 3329-34.
- Chan, K., Baker, S., Kim, C. C., Detweiler, C. S., Dougan, G., & Falkow, S. (2003). Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol*, 185(2), 553-563.
- Chatfield, S. N., Strahan, K., Pickard, D., Charles, I. G., Hormaeche, C. E., & Dougan, G. (1992). Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog*, 12(2), 145-151.
- Chen, C. F., Lan, J., Korovine, M., Shao, Z. Q., Tao, L., Zhang, J. & Newman, E. B. (1997). Metabolic regulation of *Irp* gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 143 (Pt 6), 2079-2084.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1), 9-14.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W. & Vazquez-Boland, J. A. (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 431-436.
- Cho, B. K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S. & Palsson, B. O. (2008). Genome-scale reconstruction of the *Lrp* regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(49), 19462-19467.
- Clark, D. P. & Cronan J. E. JR (1996). Two-Carbon Compounds and Fatty Acids as Carbonsources, Chap. 21(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Cloekaert, A., & Schwarz, S. (2001). Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Vet Res*, 32(3-4), 301-310.
- Cohen, G. N., & Rickenberg, H. V. (1956). Concentration spécifique reversible des aminoacids chez *Escherichia coli*. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 91(5), 693-720.
- Cohen, G. N. & Saint-Girons, I. (1987). Biosynthesis of Threonine, Lysine, and Methionine, Chap. 28(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umberger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Cooke, F. J., Ginwalla, S., Hampton, M. D., Wain, J., Ross-Russell, R., Lever, A., et al. (2009). Report of neonatal meningitis due to *Salmonella enterica* serotype Agona and review of breast milk-associated neonatal *Salmonella* infections. *J Clin Microbiol*, 47(9), 3045-3049.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), 242-248.
- Coutinho, M. F., Prata, M. J., & Alves, S. (2012). Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab*, 105(4), 542-550.
- Csonka, L. N. (1988). Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation, and cellular retention of proline. *J Bacteriol*, 170(5), 2374-2378.
- Csonka, L. N., Ikeda, T. P., Fletcher, S. A. & Kustu, S. (1994). The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the proU operon. *J Bacteriol*, 176(20), 6324-6333.
- Csonka, L. N. & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol*, 45, 569-606.
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273(5274), 501-503.
- Daniel, J., Dondon, L., & Danchin, A. (1983). 2-Ketobutyrate: a putative alarmone of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 190(3), 452-458.
- Daniel, H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Review Physiol*, 66, 361-384.
- Daniel, J., Joseph, E., & Danchin, A. (1984). Role of 2-ketobutyrate as an alarmone in *E. coli* K12: inhibition of adenylate cyclase activity mediated by the phosphoenolpyruvate: glyucose phosphotransferase transport system. *Mol Gen Genet*, 193(3), 467-472.
- Das, P., Lahiri, A., Sen, M., Iyer, N., Kapoor, N., Balaji, K. N., & Chakravorty, D. (2010). Cationic amino acid transporters and *Salmonella Typhimurium* ArgT collectively regulate arginine availability towards intracellular *Salmonella* growth. *PLoS One*, 5(12), e15466.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6640-6645.
- Dauga, C., Zabrovskaia, A., & Grimont, P. A. (1998). Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol*, 36(10), 2835-2843.
- Davis, B. D. (1951). Inhibition of *Escherichia coli* by *p*-aminobenzoic acid and its reversal by *p*-hydroxybenzoic acid. *J Exp Med*, 94(3), 243-254.
- Davis, B. D. (1953). Autocatalytic growth of a mutant due to accumulation of unstable phenylalanine precursor. *Science*, 118(3061), 251-252.
- Davis, R.W., Botstein, D., Roth, J. R. (1980). *Advanced Bacterial Genetics: A Manual for Genetic Engineering* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), 201-203.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307(5715), 1630-4.
- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(4), 939-1031.
- Dev, I. K., & Harvey, R. J. (1984). Regulation of synthesis of serine hydroxymethyltransferase in chemostat cultures of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 259(13), 8394-8401.
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 15(8), 305-309.
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4), 295-299.
- Dice, J. F., & Chiang, H. L. (1989). Peptide signals for protein degradation within lysosomes. *Biochem Soc Symp*, 55, 45-55.

- Dimier, I. H., & Bout, D. T. (1997). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells. *Immunol Cell Biol*, 75(5), 511-514.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78, 857-902.
- Dougan, G., Chatfield, S., Pickard, D., Bester, J., O'Callaghan, D., & Maskell, D. (1988). Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. *J Infect Dis*, 158(6), 1329-1335.
- Drecktrah, D., Knodler, L. A., Howe, D., & Steele-Mortimer, O. (2007). *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic*, 8(3), 212-225.
- Drewinko, B., Romsdahl, M. M., Yang, L. Y., Ahearn, M. J., & Trujillo, J. M. (1976). Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res*, 36(2 Pt 1), 467-475.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., Alfredsson, G. A., Barker, R., & Old, D. C. (1975). A new biotyping scheme for *Salmonella typhimurium* and its phylogenetic significance. *J Med Microbiol*, 8(1), 149-166.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., & Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol*, 8(6), 401-412.
- Elsinghorst, E. A., Baron, L. S., & Kopecko, D. J. (1989). Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(13), 5173-5177.
- Epelbaum, S., LaRossa, R. A., VanDyk, T. K., Elkayam, T., Chipman, D. M., & Barak, Z. (1998). Branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: a quantitative analysis. *J Bacteriol*, 180(16), 4056-4067.
- Ernsting, B. R., Denninger, J. W., Blumenthal, R. M. & Matthews, R. G. (1993). Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *J Bacteriol*, 175(22), 7160-7169.
- Erickson, H. R. (1995). Peptide Metabolism at the Brush-Border Membranes, Chap. 2 in *Peptide-Based Drug Design "Controlling Transport and Metabolism"* Ed.: Taylor M. D. & Amidon G.L., (1995) USA, American Chemical Society, Washington, DC
- Erickson, R.H., & Kim, Y.S. (1990). Digestion and absorption of dietary protein. *Annual review of medicine* 41, 133-139.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J. C. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47(1), 103-18.
- Eskelinen, E. L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*, 27(5-6), 495-502.
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 13(3), 137-145.
- Eswarappa, S. M., Panguluri, K. K., Hensel, M., & Chakravorty, D. (2008). The *yejABEF* operon of *Salmonella* confers resistance to antimicrobial peptides and contributes to its virulence. *Microbiology*, 154(2), 666-678.
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., & Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(14), 5189-5193.
- Figueroa-Bossi, N., & Bossi, L. (2004). Resuscitation of a defective prophage in *Salmonella* cocultures. *J Bacteriol*, 186(12), 4038-4041.
- Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., & Bossi, L. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol*, 39(2), 260-271.
- Finlay, B. B., Starnbach, M. N., Francis, C. L., Stocker, B. A., Chatfield, S., Dougan, G. & Falkow, S. (1988). Identification and characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. *Mol Microbiol*, 2(6), 757-766.

- Foley, S. L., Nayak, R., Hanning, I. B., Johnson, T. J., Han, J., & Ricke, S. C. (2011). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol*, 77(13), 4273-4279.
- Foster, J. W. & Spector, M. P. (1995). How Salmonella survive against the odds. *Annu Rev Microbiol*, 49, 145-174.
- Friedrich, M. (1982). [The intestinal phase of peptide absorption]. *Nahrung*, 26(10), 887-901.
- Galan, J. E., & Curtiss, R., 3rd. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(16), 6383-6387.
- Garcia, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C., & Lasa, I. (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol*, 54(1), 264-277.
- Garcia-del Portillo, F. (2001). *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect*, 3(14-15), 1305-1311.
- Garcia-del Portillo, F., & Finlay, B. B. (1994). *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infect Immun*, 62(10), 4641-4645.
- Garcia-del Portillo, F., & Finlay, B. B. (1995 a). Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol*, 129(1), 81-97.
- Garcia-del Portillo, F., & Finlay, B. B. (1995 b). The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol*, 3(10), 373-380.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., & Finlay, B. B. (1993). Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun*, 61(10), 4489-4492.
- Garcia-del Portillo, F., Nunez-Hernandez, C., Eisman, B., & Ramos-Vivas, J. (2008). Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol*, 11(1), 46-52.
- Garcia-del Portillo, F., Zwick, M. B., Leung, K. Y., & Finlay, B. B. (1993). *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22), 10544-10548.
- Garcia-Quintanilla, M., & Casadesus, J. (2011). Virulence plasmid interchange between strains ATCC 14028, LT2, and SL1344 of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Plasmid*, 65(2), 169-175.
- Gelfand, D. H. & Steinberg, R. A. (1977). *Escherichia coli* mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. *J Bacteriol*, 130(1), 429-440.
- Gibson, M. M., Ellis, E. M., Graeme-Cook, K. A., & Higgins, C. F. (1987). OmpR and EnvZ are pleiotropic regulatory proteins: positive regulation of the tripeptide permease (tppB) of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet*, 207(1), 120-129.
- Gibson, M. M., Price, M., & Higgins, C. F. (1984). Genetic characterization and molecular cloning of the tripeptide permease (tpp) genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 160(1), 122-130.
- Ginocchio, C., Pace, J., & Galan, J. E. (1992). Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13), 5976-5980.
- Glansdorf, N. (1987). Biosynthesis of Arginine and Polyamines, Chap. 21(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umberger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Glansdorf, N. (1996). Biosynthesis of Arginine and Polyamines, Chap. 25(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature reviews. Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2), 202-212.

- Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., & Sela, S. (2011). *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 250-257.
- Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10), 713-726.
- Gonzalez-Escobedo, G., Marshall, J. M., & Gunn, J. S. (2011). Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: understanding the carrier state. *Nat Rev Microbiol*, 9(1), 9-14.
- Goodell, E. W., & Higgins, C. F. (1987). Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 169(8), 3861-3865.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J. (1989). Comparison of *Escherichia coli* K-12 outer membrane protease OmpT and *Salmonella typhimurium* E protein. *J Bacteriol*, 171(5), 2903-5.
- Gorvel, J. P., & Méresse, S. (2001). Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect*, 3(14-15), 1299-1303.
- Götz, A., Eylert, E., Eisenreich, W., & Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *PLoS One*, 5(5), e10586.
- Graf, L. H., Jr. & Burns, R. O. (1973). The supX-leu-500 mutations and expression of the leucine operon. *Mol Gen Genet*, 126(4), 291-301.
- Gray, G.M. (1986). The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology and Diseases (Raven: New York) Ed.: Go. V.L.W. 375-386.
- Gray, J. T., & Fedorka-Cray, P. J. (2001). Long-term survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 114(9-10), 370-374.
- Gray, J. T., & Fedorka-Cray, P. J. (2001). Survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis* in swine feces. *J Food Prot*, 64(7), 945-949.
- Green, J. M., Nichlos, B. P., & Matthews, R. G. (1996). Folate Biosynthesis, Reduction, and Polyglutamylolation, Chap. 41(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Greenberg, B., & Klowden, M. (1972). Enteric bacterial interactions in insects. *Am J Clin Nutr*, 25(12), 1459-1466.
- Greene, R. C. (1996). Biosynthesis of Methionine, Chap. 33(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Griffin, H. G., & Barrow, P. A. (1993). Construction of an aroA mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum: its effectiveness in immunization against experimental fowl typhoid. *Vaccine*, 11(4), 457-462.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J. (1989). Comparison of *Escherichia coli* K-12 outer membrane protease OmpT and *Salmonella typhimurium* E protein. *J Bacteriol*, 171(5), 2903-2905.
- Groisman, E. A., & Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol*, 5(9), 343-349.
- Groisman, E. A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M., Lipps, C. J. & Heffron, F. (1992). Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(24), 11939-11943.
- Gruenberg, J., & Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 7(4), 552-563.
- Gu, G., Hu, J., Cevallos-Cevallos, J. M., Richardson, S. M., Bartz, J. A., & van Bruggen, A. H. (2011). Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants. *PLoS One*, 6(11), e27340.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic*, 8(4), 311-330.

- Hagervall, T. G., Jonsson, Y. H., Edmonds, C. G., McCloskey, J. A., & Bjork, G. R. (1990). Chorismic acid, a key metabolite in modification of tRNA. *J Bacteriol*, 172(1), 252-259.
- Haining, W. N., Anderson, D. G., Little, S. R., von Bergwelt-Baildon, M. S., Cardoso, A. A., Alves, P., Kosmatopoulos, K., Nadler, L. M., Langer, R. & Kohane, D. S. (2004). pH-triggered microparticles for peptide vaccination. *J Immunol*, 173(4), 2578-2585.
- Haney, S. A., Platko, J. V., Oxender, D. L., & Calvo, J. M. (1992). Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(1), 108-115.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*, 6(1), 53-66.
- Harder, D., Stolz, J., Casagrande, F., Obrdlik, P., Weitz, D., Fotiadis, D., et al. (2008). DtpB (YhiP) and DtpA (TppB, YdgR) are prototypical proton-dependent peptide transporters of *Escherichia coli*. *Febs J*, 275(13), 3290-3298.
- Hatch, T. P. (1975). Competition between *Chlamydia psittaci* and L cells for host isoleucine pools: a limiting factor in chlamydial multiplication. *Infect Immun*, 12(1), 211-220.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R. J., Ahmad, N., Rhen, M. & Hinton, J. C. (2008). During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* 10(4), 958-84.
- Heaton, J. C., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J Appl Microbiol*, 104(3), 613-626.
- Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294(2-3), 95-102.
- Hershberg, R. M. & Mayer, L. F. (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today*, 21(3), 123-128.
- Higgins, C. F., Haag, P. D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G., & Ames, G. F. (1982). Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. Typhimurium*. *Nature*, 298(5876), 723-727.
- Higgins, C. F., & Hardie, M. M. (1983). Periplasmic protein associated with the oligopeptide permeases of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 155(3), 1434-1438.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Whalley, K., & Jamieson, D. J. (1985). Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. *Embo J*, 4(4), 1033-1039.
- Hiles, I. D., Powell, L. M., & Higgins, C. F. (1987). Peptide transport in *Salmonella typhimurium*: molecular cloning and characterization of the oligopeptide permease genes. *Mol Gen Genet*, 206(1), 101-109.
- Hobbie, S., Chen, L. M., Davis, R. J., & Galan, J. E. (1997). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 159(11), 5550-5559.
- Hohmann, E. L. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*, 32(2), 263-269.
- Hoiseth, S. K., & Stocker, B. A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 291(5812), 238-239.
- Holden, D. W. (2002). Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic*, 3(3), 161-169.
- Hölzer, S. U., & Hensel, M. (2012). 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.
- Hormaeche, C. E., Joysey, H. S., Desilva, L., Izhar, M., & Stocker, B. A. (1991). Immunity conferred by Aro- *Salmonella* live vaccines. *Microb Pathog*, 10(2), 149-158.

- Hormaeche, C. E., Mastroeni, P., Harrison, J. A., Demarco de Hormaeche, R., Svenson, S., & Stocker, B. A. (1996). Protection against oral challenge three months after i.v. immunization of BALB/c mice with live Aro *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* vaccines is serotype (species)-dependent and only partially determined by the main LPS O antigen. *Vaccine*, *14*(4), 251-259.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D. & Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, *425*(6956), 402-406.
- Huang, J., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, *6*(15), 1837-1849.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(2), 379-433.
- Jackson, J., Williams, L. S., & Umbarger, H. E. (1974). Regulation of synthesis of the branched-chain amino acids and cognate aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthetases of *Escherichia coli*: a common regulatory element. *J Bacteriol*, *120*(3), 1380-1386.
- Jaconi, M. E., Lew, D. P., Carpentier, J. L., Magnusson, K. E., Sjogren, M., & Stendahl, O. (1990). Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol*, *110*(5), 1555-1564.
- Jain, V., Kumar, M., & Chatterji, D. (2006). ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol*, *44*(1), 1-10.
- Jamieson, D. J., & Higgins, C. F. (1984). Anaerobic and leucine-dependent expression of a peptide transport gene in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, *160*(1), 131-136.
- Jamieson, D. J., & Higgins, C. F. (1986). Two genetically distinct pathways for transcriptional regulation of anaerobic gene expression in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, *168*(1), 389-397.
- Jepson, M. A., & Clark, M. A. (2001). The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect*, *3*(14-15), 1183-1190.
- Johnston, H. M. & Roth, J. R. (1979). Histidine mutants requiring adenine: selection of mutants with reduced *hisG* expression in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, *92*(1), 1-15.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T. M. & Goebel, W. (2006). Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol*, *188*(2), 556-568.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schar, J., Umeha, K. R., Luo, Q., Muller-Altrock, S. & Goebel, W. (2008). Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, *190*(15), 5412-5430.
- Jules, M., & Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett*, *581*(15), 2829-2838.
- Kaiser, P., & Hardt, W. D. (2011). *Salmonella typhimurium* diarrhea: switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense. *Curr Opin Immunol*, *23*(4), 456-463.
- Katagiri, M., & Sato, R. (1953). Accumulation of phenylalanine by a phenylalanineless mutant of *Escherichia coli*. *Science*, *118*(3061), 250-251.
- Kielkopf, C. L., & Burley, S. K. (2002). X-ray structures of threonine aldolase complexes: structural basis of substrate recognition. *Biochemistry*, *41*(39), 11711-11720.
- Kikuchi, G. (1973). The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem*, *1*(2), 169-187.
- Kleeb, A. C., Edalat, M. H., Gamper, M., Haugstetter, J., Giger, L., Neuenschwander, M., Kast, P. & Hilvert, D. (2007). Metabolic engineering of a genetic selection system with tunable stringency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*(35), 13907-12.
- Klose, K. E., & Mekalanos, J. J. (1997). Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun*, *65*(2), 587-596.

- Knodler, L. A., Bestor, A., Ma, C., Hansen-Wester, I., Hensel, M., Vallance, B. A. & Steele-Mortimer, O. (2005). Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Infect Immun*, 73(10), 7027-7031.
- Knodler, L. A., & Steele-Mortimer, O. (2003). Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic*, 4(9), 587-599.
- Koesling, J., Lucas, B., Develioglou, L., Aebischer, T., & Meyer, T. F. (2001). Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* against *H. pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine*, 20(3-4), 413-420.
- Kornfeld, S., & Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 483-525.
- Kramer, W., Girbig, F., Gutjahr, U., Kowalewski, S. (1995). The Intestinal Oligopeptide Transporter, Molekular Characterization and Substrate Specificity, Chap. 7 in *Peptide-Based Drug Design "Controlling Transport and Metabolism"* Ed.: Taylor M. D. & Amidon G. L., (1995) USA, American Chemical Society, Washington, D. C.
- Kredich, N. M. (1987). Biosynthesis of Cysteine, Chap. 27(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umberger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Kredich, N. M. (1996). Biosynthesis of Cysteine, Chap. 31(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Kroger, C., Dillon, S. C., Cameron, A. D., Papenfort, K., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., et al. (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(20), 1277-1286.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1), 16-34.
- Kumar, Y., & Valdivia, R. H. (2009). Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe*, 5(6), 593-601.
- Kundra, R., & Kornfeld, S. (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem*, 274(43), 31039-31046.
- Kustu, S. G., & Ames, G. F. (1973). The hisP protein, a known histidine transport component in *Salmonella typhimurium*, is also an arginine transport component. *J Bacteriol*, 116(1), 107-113.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Landgraf, J. R., Levinthal, M., & Danchin, A. (1994). The role of H-NS in one carbon metabolism. *Biochimie*, 76(10-11), 1063-1070.
- LaRossa, R. A., & Smulski, D. R. (1984). *ilvB*-encoded acetolactate synthase is resistant to the herbicide sulfometuron methyl. *J Bacteriol*, 160(1), 391-394.
- LaRossa, R. A., Van Dyk, T. K., & Smulski, D. R. (1987). Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 169(4), 1372-1378.
- Lee, C. A., Jones, B. D., & Falkow, S. (1992). Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5), 1847-1851.
- Lee, H.J. (1995). Biopharmaceutical Properties and Pharmacokinetics of Peptide and Protein Drugs, Chap. 4 in *Peptide-Based Drug Design "Controlling Transport and Metabolism"* Ed.: Taylor M. D. & Amidon G.L., (1995) USA, American Chemical Society, Washington, DC

- Leisinger, T. (1987). Biosynthesis of Prolin, Chap. 22(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Leisinger, T. (1996). Biosynthesis of Prolin, Chap. 26(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Lennox, E. S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1(2), 190-206.
- Leung, K. Y., & Finlay, B. B. (1991). Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24), 11470-11474.
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4), 463-477.
- Lin, R., D'Ari, R. & Newman, E. B. (1992). Lambda placMu insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J Bacteriol*, 174(6), 1948-1955.
- Lin, E. C. C. (1987). Dissimilatory Pathways for Sugar, Polyols, and Carboxylates, Chap. 18(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Lin, E. C. C. (1996). Dissimilatory Pathways for Sugar, Polyols, and Carboxylates, Chap. 20(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Linehan, S. A. & Holden, D. W. (2003). The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunol Lett* 85(2), 183-92.
- Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S., & Yamada, H. (1998). Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 255(1), 220-226.
- Liu, X., Lu, R., Xia, Y., & Sun, J. (2010). Global analysis of the eukaryotic pathways and networks regulated by *Salmonella typhimurium* in mouse intestinal infection in vivo. *BMC Genomics*, 11, 722.
- Lu, L., & Walker, W. A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr*, 73(6), 1124S-1130S.
- Maciel, B. M., Dias, J. C., Romano, C. C., Sriranganathan, N., Brendel, M., & Rezende, R. P. (2011). Detection of *Salmonella* Enteritidis in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. *Genet Mol Res*, 10(4), 2578-2588.
- Madan, R., Rastogi, R., Parashuraman, S., & Mukhopadhyay, A. (2012). *Salmonella* Acquires Lysosome Associated Membrane Protein 1 (Lamp1) On Phagosomes From Golgi Via Sipc Mediated Recruitment Of Host Syntaxin 6. *J Biol Chem*, 287(8), 5574-87.
- Mahajan, C. M., Bhorchi, G., & Bhakoo, O. N. (1968). Neonatal meningitis due to *Salmonella typhimurium*. Report of a case. *Indian J Pediatr*, 35(247), 391-393.
- Majeski, A. E., & Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2435-2444.
- Malik, Z. A., Denning, G. M., & Kusner, D. J. (2000). Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med*, 191(2), 287-302.

- Manson, M. D., Blank, V., Brade, G., & Higgins, C. F. (1986). Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. *Nature*, 321(6067), 253-256.
- Marasco, R., Varcamonti, M., La Cara, F., Ricca, E., De Felice, M. & Sacco, M. (1994). In vivo footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvH* promoter region of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 176(17), 5197-5201.
- Marcus, J. P., & Dekker, E. E. (1993). Threonine formation via the coupled activity of 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A lyase and threonine dehydrogenase. *J Bacteriol*, 175(20), 6505-6511.
- Marra, A., Blander, S. J., Horwitz, M. A., & Shuman, H. A. (1992). Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(20), 9607-9611.
- Marsman, M., Jordens, I., Kuijl, C., Janssen, L., & Neefjes, J. (2004). Dynein-mediated vesicle transport controls intracellular *Salmonella* replication. *Mol Biol Cell*, 15(6), 2954-2964.
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K., & Andrews, N. W. (2000). Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol*, 148(6), 1141-1149.
- Martinez-Moya, M., de Pedro, M. A., Schwarz, H., & Garcia-del Portillo, F. (1998). Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Res Microbiol*, 149(5), 309-318.
- Martin-Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M. L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., et al. (2006). Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell*, 17(1), 498-510.
- Matthews, D.M. (1991). Protein Absorption: Development and Present State of the Subject Vol 1 (John Wiley & Sons: New York).
- Mayor, S. & Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8), 603-612.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., et al. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852-856.
- McCurley, N. & Mellman, I. (2010) Monocyte-derived dendritic cells exhibit increased levels of lysosomal proteolysis as compared to other human dendritic cell populations. *PLoS One*, 5(8), e11949.
- McFarland, W. C., & Stocker, B. A. (1987). Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog*, 3(2), 129-141.
- McGinnis, E., & Williams, L. S. (1971). Regulation of synthesis of the aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthetases for the branched-chain amino acids of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 108(1), 254-262.
- Mercado-Lubo, R., Leatham, M. P., Conway, T., & Cohen, P. S. (2009). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. *Infect Immun*, 77(4), 1397-1405.
- Mills, S. D., & Finlay, B. B. (1994). Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb Pathog*, 17(6), 409-423.
- Mintz, C. S., Chen, J. X., & Shuman, H. A. (1988). Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes. *Infect Immun*, 56(6), 1449-1455.
- Miold, S., Ehrbar, K., Weissmuller, A., Prager, R., Tschape, H., Russmann, H., et al. (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. *J Bacteriol*, 183(7), 2348-2358.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075.

- Molloy, B. B., Lively, D. H., Gale, R. M., Gorman, M. & Boeck, L. D. (1972). A new dipeptide antibiotic from *Streptomyces collinus*, Lindenbein. *J Antibiot (Tokyo)*, 25(2), 137-140.
- Mukherjee, K., Siddiqi, S. A., Hashim, S., Raje, M., Basu, S. K., & Mukhopadhyay, A. (2000). Live *Salmonella* recruits N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J Cell Biol*, 148(4), 741-753.
- Nelson, S. O. & Postma, P. W. (1984). Interactions in vivo between III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the glycerol and maltose uptake systems of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem*, 139(1), 29-34.
- Nelson, S. O., Schuitema, A. R. & Postma, P. W. (1986). The phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium*. The phosphorylated form of III_{Glc}. *Eur J Biochem*, 154(2), 337-341.
- Neuhard, J. & Nygaard, P. (1987). Purines and Pyrimidines, Chap. 29(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Neuhard, J. & Kelln, R. A. (1996). Biosynthesis and Conversions of Pyrimidines in Chap. 35(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C.C.E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Nevola, J. J., Stocker, B. A., Laux, D. C., & Cohen, P. S. (1985). Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect Immun*, 50(1), 152-159.
- Newman, E. B. & Lin, R. (1995). Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol*, 49, 747-775.
- Niles, W. D. & Malik, A. B. (1999). Endocytosis and exocytosis events regulate vesicle traffic in endothelial cells. *J Membr Biol*, 167(1), 85-101.
- Newman, E. B. & McFall, E. (1996). Amino Acids as Carbon Sources, Chap. 22(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Novikova, M., Metlitskaya, A., Datsenko, K., Kazakov, T., Kazakov, A., Wanner, B., et al. (2007). The *Escherichia coli* Yej transporter is required for the uptake of translation inhibitor microcin C. *J Bacteriol*, 189(22), 8361-8365.
- Nunn, W. D. (1987). Two-Carbon Compounds and Fatty Acids as Carbonsources, Chap. 19(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Nygaard, P. & Zalkin, H. (1996). Biosynthesis of Purine Nukleotides in Chap. 34(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- O'Callaghan, D., Maskell, D., Liew, F. Y., Easmon, C. S., & Dougan, G. (1988). Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun*, 56(2), 419-423.
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*, 52, 259-274.
- Onyango, D. M., Wandili, S., Kakai, R., & Waindi, E. N. (2009). Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. *J Infect Dev Ctries*, 3(2), 99-104.
- Pace, J., Hayman, M. J., & Galan, J. E. (1993). Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. Typhimurium*. *Cell*, 72(4), 505-514.

- Parra-Lopez, C., Baer, M. T., & Groisman, E. A. (1993). Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *Embo J*, 12(11), 4053-4062.
- Parra-Lopez, C., Lin, R., Aspedon, A., & Groisman, E. A. (1994). A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *Embo J*, 13(17), 3964-3972.
- Patte, J. C. (1996). Biosynthesis of Threonin and Lysine, Chap. 32(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Payne, J. W. (1980). Transport and Utilisation of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Related Substrates. in *Microorganisms and Nitrogen Sources*. Ed.: Payne, J. W., Norwich, John Wiley & Sons Ltd. Copyright 1980.
- Payne, J. W. (1983). Peptide transport in bacteria: methods, mutants and energy coupling. *Biochem Soc Trans* 11(6): 794-798.
- Payne, J. W., & Smith, M. W. (1994). Peptide transport by micro-organisms. *Adv Microb Physiol*, 36, 1-80.
- Payne, J. W. (1995). Bacterial Peptide Permeases as a Drug Delivery Target. *Peptide-Based Drug Design "Controlling Transport and Metabolism"* ed. Taylor M. D. & Amidon G.L. USA, American Chemical Society, Washington, DC (1995) 15, 342-367.
- Payne, J. W. & Marshall N. J. (2001). Peptide Transport. in *Microbial Transport Systems*. Ed. Winkelmann, G., BRD, WILEY-VCH Verlag GmbH D-69469 Weinheim, 2001. Chap. 6, 139-164
- Perry, J. D., Riley, G., Gould, F. K., Perez, J. M., Boissier, E., Ouedraogo, R. T. & Freydiere, A. M. (2002). Alafosfalin as a selective agent for isolation of salmonella from clinical samples. *J Clin Microbiol*, 40(11), 3913-3916.
- Pi, J., Wookey, P. J., & Pittard, A. J. (1991). Cloning and sequencing of the pheP gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173(12), 3622-3629.
- Pieri, M., Christian, H. C., Wilkins, R. J., Boyd, C. A. & Meredith, D. (2010). The apical (hPepT1) and basolateral peptide transport systems of Caco-2 cells are regulated by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G136-43.
- Pittard, A. J. (1987). Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids, Chap. 24(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Pittard, A. J. (1996). Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids, Chap. 28(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Pizarro-Cerda, J., & Tedin, K. (2004). The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol*, 52(6), 1827-1844.
- Platko, J. V., Willins, D. A. & Calvo, J. M. (1990). The *ilvH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *J Bacteriol*, 172(8), 4563-4570.
- Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., & Gheesling, L. L. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, 155(7), 568-570.
- Potrykus, K. & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol*, 62, 35-51.
- Primerano, D. A., & Burns, R. O. (1982). Metabolic basis for the isoleucine, pantothenate or methionine requirement of *ilvG* strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 150(3), 1202-1211.
- Quay, S., & Christensen, H. N. (1974). Basis of transport discrimination of arginine from other basic amino acids in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 249(21), 7011-7017.

- Quay, S. C., Oxender, D. L., Tsuyumu, S., & Umbarger, H. E. (1975). Separate regulation of transport and biosynthesis of leucine, isoleucine, and valine in bacteria. *J Bacteriol*, 122(3), 994-1000.
- Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L. G. & Bäuml, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun*, 70(5), 2249-2255.
- Radtke, A. L., Delbridge, L. M., Balachandran, S., Barber, G. N., & O'Riordan, M. X. (2007). TBK1 protects vacuolar integrity during intracellular bacterial infection. *PLoS Pathog*, 3(3), e29.
- Raffatellu, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, S. P., Paixao, T. A., Butler, B. P., Chu, H., Santos, R. L., Berger, T., Mak, T. W., Tsois, R. M., Bevins, C. L., Solnick, J. V., Dandekar, S. & Baumler, A. J. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe*, 5(5), 476-486.
- Raghunathan, A., Reed, J., Shin, S., Palsson, B., & Daefler, S. (2009). Constraint-based analysis of metabolic capacity of *Salmonella typhimurium* during host-pathogen interaction. *BMC Syst Biol*, 3, 38.
- Rahmanian M, Claus DR, Oxender DL. (1973). Multiplicity of leucine transport systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 116(3),1258-1266.
- Rajashekar, R., & Hensel, M. (2011). Dynamic modification of microtubule-dependent transport by effector proteins of intracellular *Salmonella enterica*. *Eur J Cell Biol*, 90(11), 897-902.
- Ramu, P., Tanskanen, R., Holmberg, M., Lahteenmaki, K., Korhonen, T. K. & Meri, S. (2007). The surface protease PgtE of *Salmonella enterica* affects complement activity by proteolytically cleaving C3b, C4b and C5. *FEBS Lett*, 581(9), 1716-1720.
- Rathman, M., Sjaastad, M. D., & Falkow, S. (1996). Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun*, 64(7), 2765-2773.
- Ratzkin, B. & Roth, J. (1978). Cluster of genes controlling proline degradation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 133(2), 744-754.
- Ravnikar, P. D., & Somerville, R. L. (1987). Genetic characterization of a highly efficient alternate pathway of serine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 169(6), 2611-2617.
- Reddy, A., Caler, E. V., & Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106(2), 157-169.
- Reddy, J. V., Burguete, A. S., Sridevi, K., Ganley, I. G., Nottingham, R. M. & Pfeffer, S. R. (2006). A functional role for the GCC185 golgin in mannose 6-phosphate receptor recycling. *Mol Biol Cell* 17(10), 4353-63.
- Reis, R. S., & Horn, F. (2010). Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog*, 2(1), 8.
- Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). Ammonia Assimilation and the Biosynthesis of Glutamine, Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine, Chap. 20(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Rex, J. H., Aronson, B. D., & Somerville, R. L. (1991). The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. *J Bacteriol*, 173(19), 5944-5953.
- Ringrose, P. S. (1980). Peptides as Antimicrobial Agents. *Microorganisms and Nitrogen Sources*. J. W. Payne (1980) (4,7), 641-692.
- Roark, E. A., & Haldar, K. (2008). Effects of lysosomal membrane protein depletion on the *Salmonella*-containing vacuole. *PLoS One*, 3(10), e3538.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, 1(6), 362-368.

- Rohl, F., Rabenhorst, J. & Zahner, H. (1987). Biological properties and mode of action of clavams. *Arch Microbiol*, 147(4), 315-320.
- Roy, D., Liston, D. R., Idone, V. J., Di, A., Nelson, D. J., Pujol, C., Bliska, J. B., Chakrabarti, S. & Andrews, N. W. (2004). A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science*, 304(5676), 1515-1518.
- Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A. & Janeway, C. A., Jr. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*, 353(6345), 622-7.
- Saarinen, M., Ekman, P., Het, Q., Ikeda, M., Virtala, M., Yu, D. T., Arvilommi, H. & Granfors, K. (2002). Elimination of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in intestinal epithelial cells by mechanisms other than nitric oxide. *J Med Microbiol*, 51(1), 13-19.
- Saarinen, M., Pelliniemi, L. J., & Granfors, K. (1996). Survival and degradation of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in intestinal epithelial cells in vitro. *J Med Microbiol*, 45(6), 463-471.
- Saier, M. H., Jr. (1989). Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol Rev*, 53(1), 109-120.
- Saier, M. H., Jr., Straud, H., Massman, L. S., Judice, J. J., Newman, M. J. & Feucht, B. U. (1978). Permease-specific mutations in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* that release the glycerol, maltose, melibiose, and lactose transport systems from regulation by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol*, 133(3), 1358-1367.
- Saier, M. H., Jr. & Feucht, B. U. (1975). Coordinate regulation of adenylate cyclase and carbohydrate permeases by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 250(17), 7078-80.
- Saka, H. A., & Valdivia, R. H. (2010). Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment. *Curr Opin Microbiol*, 13(1), 4-10.
- Salcedo, S. P., & Holden, D. W. (2003). SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *Embo J*, 22(19), 5003-5014.
- Salcedo, S. P., & Holden, D. W. (2005). Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr Opin Microbiol*, 8(1), 92-98.
- Sanderson, K. E., & Roth, J. R. (1988). Linkage map of *Salmonella typhimurium*, edition VII. *Microbiol Rev*, 52(4), 485-532.
- Santos, R. L., & Bäumlner, A. J. (2004). Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294(4), 225-233.
- Schenten, D., & Medzhitov, R. (2011). The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv Immunol*, 109, 87-124.
- Schmieger, H. (1972). Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet*, 119(1), 75-88.
- Schneider, J., & Wendisch, V. F. (2011). Biotechnological production of polyamines by bacteria: recent achievements and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91(1), 17-30.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2), 509-513.
- Shannon, K. P., & Rowbury, R. J. (1975). Mode of growth and division of *Salmonella typhimurium*. *Z Allg Mikrobiol*, 15(6), 447-456.
- Sharon, N., Eshdat, Y., Silberblatt, F. J., & Ofek, I. (1981). Bacterial adherence to cell surface sugars. *Ciba Found Symp*, 80, 119-141.
- Shaw, K. J., & Berg, C. M. (1980) (a). Substrate channeling: alpha-ketobutyrate inhibition of acetohydroxy acid synthase in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 143(3), 1509-1512.
- Shaw, K. J., Berg, C. M., & Sobol, T. J. (1980). *Salmonella typhimurium* mutants defective in acetohydroxy acid synthases I and II. *J Bacteriol*, 141(3), 1258-1263.

- Shen, R. S., Smith, R. V., Davis, P. J. & Abell, C. W. (1984). Inhibition of dihydropteridine reductase from human liver and rat striatal synaptosomes by apomorphine and its analogs. *J Biol Chem*, 259(14), 8994-9000.
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990-995.
- Simmonds, S. (1950). The metabolism of phenylalanine and tyrosine in mutant strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 185(2), 755-762.
- Slaghuis, J., Goetz, M., Engelbrecht, F., & Goebel, W. (2004). Inefficient replication of *Listeria innocua* in the cytosol of mammalian cells. *J Infect Dis*, 189(3), 393-401.
- Smit, J., Kamio, Y., & Nikaido, H. (1975). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. *J Bacteriol*, 124(2), 942-958.
- Smith, A. C., Cirulis, J. T., Casanova, J. E., Scidmore, M. A., & Brumell, J. H. (2005). Interaction of the *Salmonella*-containing vacuole with the endocytic recycling system. *J Biol Chem*, 280(26), 24634-24641.
- Smith, B. P., Reina-Guerra, M., Stocker, B. A., Hoiseth, S. K., & Johnson, E. (1984). Aromatic-dependent *Salmonella dublin* as a parenteral modified live vaccine for calves. *Am J Vet Res*, 45(11), 2231-2235.
- Smith, N. H., Beltran, P., & Selander, R. K. (1990). Recombination of *Salmonella* phase 1 flagellin genes generates new serovars. *J Bacteriol*, 172(5), 2209-2216.
- Soldati, T., & Schliwa, M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12), 897-908.
- Sopitthummakun, K., Thongpanchang, C., Vilaivan, T., Yuthavong, Y., Chaiyen, P., & Leartsakulpanich, U. (2012). Plasmodium serine hydroxymethyltransferase as a potential anti-malarial target: inhibition studies using improved methods for enzyme production and assay. *Malar J*, 11, 1-194.
- Stauffer, G. V. (1987) Biosynthesis of Serin and Glycine, Chap. 26(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Stauffer, G. V. (1996). Biosynthesis of Serin, Glycin and One-Carbon Units, Chap. 30(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H.E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Stecher, B., Barthel, M., Schlumberger, M. C., Haberli, L., Rabsch, W., Kremer, M. & Hardt, W. D. (2008). Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol*, 10(5), 1166-1180.
- Stecher, B., Chaffron, S., Kappeli, R., Hapfelmeier, S., Friedrich, S., Weber, T. C., Kirundi, J., Suar, M., McCoy, K. D., von Mering, C., Macpherson, A. J. & Hardt, W. D. (2010). Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog*, 6(1), e1000711.
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C. & Hardt, W. D. (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(10), 2177-2189.
- Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol*, 11(1), 38-45.
- Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H., & Finlay, B. B. (1999). Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol*, 1(1), 33-49.
- Steele-Mortimer, O., St-Louis, M., Olivier, M., & Finlay, B. B. (2000). Vacuole acidification is not required for survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within cultured macrophages and epithelial cells. *Infect Immun*, 68(9), 5401-5404.

- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V. & Davis, R. W. (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282(5389), 754-759.
- Stocker, B. A., Hoiseth, S. K., & Smith, B. P. (1983). Aromatic-dependent "*Salmonella* sp." as live vaccine in mice and calves. *Dev Biol Stand*, 53, 47-54.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1), 113-130.
- Sundquist, M., Rydstrom, A., & Wick, M. J. (2004). Immunity to *Salmonella* from a dendritic point of view. *Cell Microbiol*, 6(1), 1-11.
- Surber, M. W. & Maloy, S. (1998). The PutA protein of *Salmonella typhimurium* catalyzes the two steps of proline degradation via a leaky channel. *Arch Biochem Biophys*, 354(2), 281-287.
- Swanson, J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8), 639-649.
- Tam, M. A., Rydstrom, A., Sundquist, M., & Wick, M. J. (2008). Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol Rev*, 225, 140-162.
- Tan, S., Gyles, C. L., & Wilkie, B. N. (1997). Evaluation of an *aroA* mutant *Salmonella typhimurium* vaccine in chickens using modified semisolid Rappaport Vassiliadis medium to monitor faecal shedding. *Vet Microbiol*, 54(3-4), 247-254.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. & Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406(6798), 902-906.
- Taylor, G.L & Amidon M. D. (1995) *Peptide-Based Drug Design "Controlling Transport and Metabolism"*. American Chemical Society, Washington, DC 1995
- Tchawa Yimiga, M., Leatham, M. P., Allen, J. H., Laux, D. C., Conway, T., & Cohen, P. S. (2006). Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in BALB/c mice. *Infect Immun*, 74(2), 1130-1140.
- Tedin, K., & Blasi, U. (1996). The RNA chain elongation rate of the lambda late mRNA is unaffected by high levels of ppGpp in the absence of amino acid starvation. *J Biol Chem*, 271(30), 17675-17686.
- Terlecky, S. R., & Dice, J. F. (1993). Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J Biol Chem*, 268(31), 23490-23495.
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., & Bäumlner, A. J. (2011). *Salmonella*, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol*, 15 (1), 108-114.
- Thompson, A., Rolfe, M. D., Lucchini, S., Schwerk, P., Hinton, J. C., & Tedin, K. (2006) (a). The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem*, 281(40), 30112-30121.
- Thompson, A., Rowley, G., Alston, M., Danino, V., & Hinton, J. C. (2006) (b). *Salmonella* transcriptomics: relating regulons, stimulons and regulatory networks to the process of infection. *Curr Opin Microbiol*, 9(1), 109-116.
- Thurston, T. L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., & Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol*, 10(11), 1215-1221.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 1), 521-524.
- Tischler, A. D., & McKinney, J. D. (2010). Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Curr Opin Microbiol*, 13(1), 93-99.
- Torras-Llort, M., Torrents, D., Soriano-Garcia, J. F., Gelpi, J. L., Estevez, R., Ferrer, R., Palacin, M. & Moreto, M. (2001). Sequential amino acid exchange across b(0,+)-like system in chicken brush border jejunum. *J Membr Biol*, 180(3), 213-220.

- Umbarger, H. E. (1987). Biosynthesis of Branched-Chain Amino Acids, Chap. 23(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Umbarger, H. E. (1996). Biosynthesis of Branched-Chain Amino Acids, Chap. 27(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Van Dyk, T. K., & LaRossa, R. A. (1986). Sensitivity of a *Salmonella typhimurium aspC* mutant to sulfometuron methyl, a potent inhibitor of acetolactate synthase II. *J Bacteriol*, 165(2), 386-392.
- Van Dyke, R. (1989). Gastrointestinal Disease, Pathophysiology, Diagnosis, Management, (Saunders: Philadelphia, PA) Eds: Sleisenger, M. & Fordtran, J., 4; 1062-1088
- Vance, R. E., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*, 6(1), 10-21.
- Vasudevan, S. G., Paal, B. & Armarego, W. L. (1992). Dihydropteridine reductase from *Escherichia coli* exhibits dihydrofolate reductase activity. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 373(10), 1067-1073.
- Virgilio, R., & Cordano, A. M. (1981). Naturally occurring prototrophic strains of *Salmonella typhi*. *Can J Microbiol*, 27(12), 1272-1275.
- Vogel, J. (2009). A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol*, 71(1), 1-11.
- Wang, Q. & Calvo, J. M. (1993). Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvH*. *J Mol Biol*, 229(2), 306-318.
- Wang, R. F., & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 100, 195-199.
- Watson, P. R., Galyov, E. E., Paulin, S. M., Jones, P. W., & Wallis, T. S. (1998). Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect Immun*, 66(4), 1432-1438.
- Whalen, W. A., & Berg, C. M. (1982). Analysis of an *avtA::Mu d1(Ap lac)* mutant: metabolic role of transaminase C. *J Bacteriol*, 150(2), 739-746.
- Williamson, R. M. & Oxender, D. L. (1995). Molecular Biology of Amino Acid, Peptide, and Oligopeptide Transport Chap. 1 in *Peptide-Based Drug Design "Controlling Transport and Metabolism"* Ed.: Taylor M. D. & Amidon G.L., (1995) USA, American Chemical Society, Washington, D. C.
- Winkler, M. E. (1987). Biosynthesis of Histidin, Chap. 25(1) in *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., & Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1987), 1+2., American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Winkler, M. E. (1996). Biosynthesis of Histidin, Chap. 29(1) in *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, Ed.: Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, C. C. E., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, S. W., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., Neidhardt, F. C., (1996), 1+2, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsois, R. M., Roth, J. R. & Bäumlner, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 467(7314), 426-429.
- Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*, 22(1), 43-61.
- Wood, J. M. (1988). Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J Membr Biol*, 106(3), 183-202.

- Wray, C., & Sojka, W. J. (1978). Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res Vet Sci*, 25(2), 139-143.
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335, 1-32.
- You, Y., Rankin, S. C., Aceto, H. W., Benson, C. E., Toth, J. D., & Dou, Z. (2006). Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Appl Environ Microbiol*, 72(9), 5777-5783.
- Zarfl, C., Matthies, M. & Klasmeier, J. (2008). A mechanistical model for the uptake of sulfonamides by bacteria. *Chemosphere*, 70(5), 753-60.
- Zhang, S., Adams, L. G., Nunes, J., Khare, S., Tsolis, R. M., & Bäumlér, A. J. (2003). Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infect Immun*, 71(8), 4795-4803.

14. Anhang

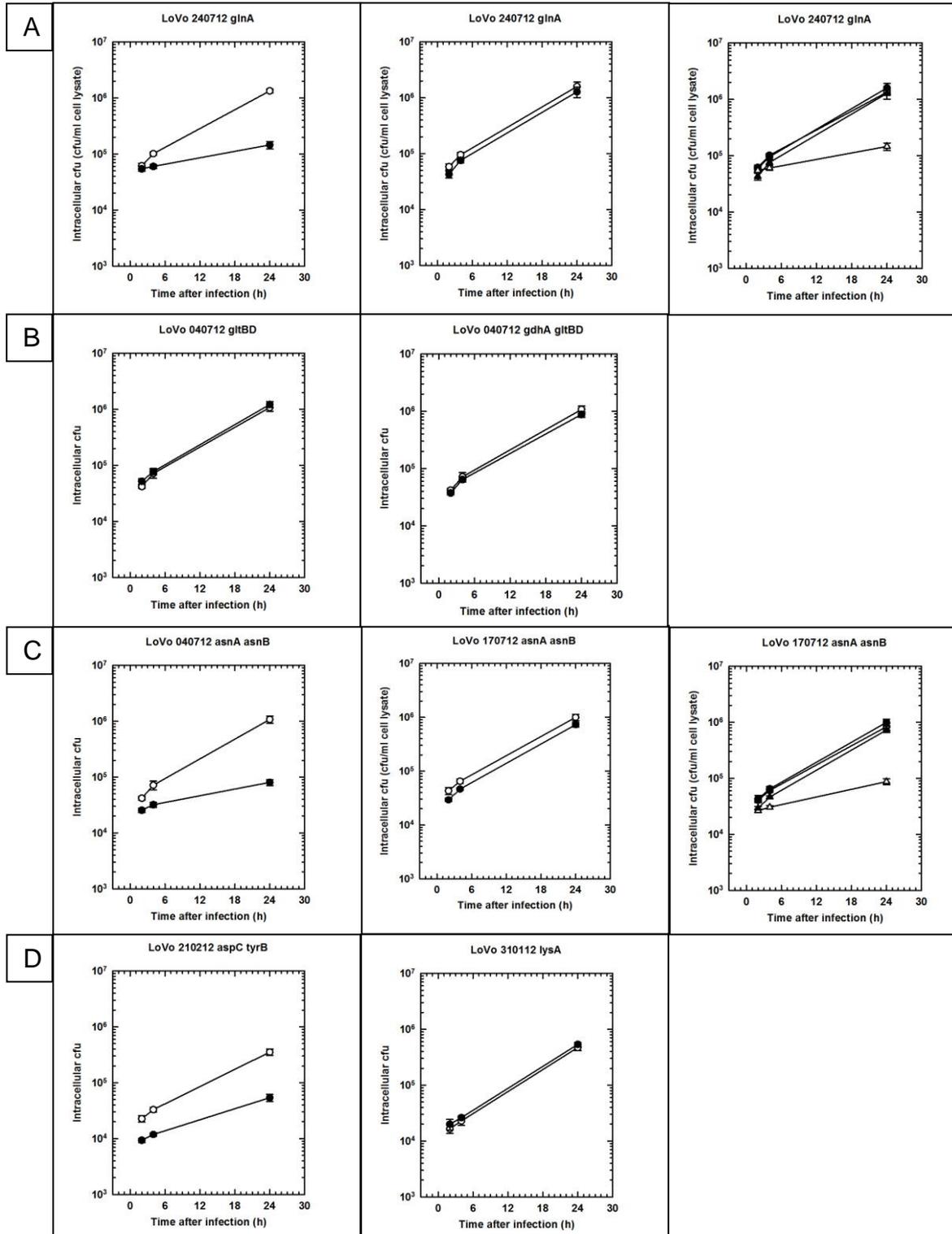
14.1 Tab. 13: Ergebnisübersicht

Stamm/Genotyp	MW	STW	p-Wert
Histidin Biosynthese			
6144 (<i>S.Typhimurium</i> 4/74)	0,91	0,2	< 0,01
3946 (<i>his</i> +(Thr87))	0,88	0,14	> 0,05
6098 ($\Delta hisBCD$)	0,9	0,21	< 0,01
6510 (<i>his</i> + (Thr87) $\Delta hisBCD$)	0,77	0,14	> 0,05
C1-Stoffwechsel			
5176 ($\Delta gcvA$)	0,96	0,13	> 0,05
5178 ($\Delta gcvB$)	0,85	0,13	> 0,05
5180 ($\Delta gcvR$)	0,94	0,15	< 0,05
5182 ($\Delta gcvTHP$)	1,1	0,35	< 0,05
5832 ($\Delta glyA$)	0,3	0,04	> 0,05
6626 ($\Delta glyA$)	0,3	0,05	> 0,05
5836 ($\Delta serA$)	1,1	0,43	> 0,05
5908 (<i>his</i> + $\Delta serA$)	0,95	0,15	< 0,05
5732 ($\Delta thrBC$),	0,92	0,14	< 0,01
5912 (<i>his</i> + $\Delta thrBC$)	1,1	0,21	< 0,01
5160 (Δtdh)	1,1	0,16	< 0,05
5162 ($\Delta kbl-tdh$)	1,1	0,38	< 0,05
5904 (<i>his</i> + $\Delta kbl-tdh$)	0,92	0,09	> 0,05
6054 ($\Delta ltaA$)	0,97	0,26	> 0,05
6948 ($\Delta ilvA$)	1,1	0,21	< 0,05
6182 ($\Delta aspC$)	0,81	0,18	> 0,05
5772 ($\Delta serA \Delta thrBC$)	0,85	0,29	> 0,05
6562 ($\Delta serA \Delta kbl-tdh$)	0,79	0,1	< 0,01
6576 ($\Delta thrBC \Delta kbl-tdh$)	0,91	0,4	> 0,05
6950 ($\Delta serA \Delta ilvA$)	0,96	0,14	> 0,05
6952 ($\Delta thrBC \Delta ilvA$)	0,96	0,12	> 0,05
6954 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta ilvA$)	1,1	0,18	> 0,05
6240 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh$)	0,81	0,14	> 0,05
6142 (<i>his</i> + $\Delta serA \Delta kbl-tdh \Delta ltaA$)	0,71	0,26	> 0,05
7006 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ilvA$)	0,87	0,19	< 0,001
7000 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta ltaA \Delta ilvA$)	0,82	0,17	> 0,05
6246 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA$)	0,49	0,19	< 0,001
6956 ($\Delta serA \Delta thrBC \Delta kbl-tdh \Delta ltaA \Delta ilvA$)	0,85	0,1	> 0,05
5606 ($\Delta cycA \Delta sdaC \Delta sstT$)	0,95	0,28	> 0,05
5612 ($\Delta cycA \Delta sdaC \Delta sstT \Delta tdcC$)	0,84	0,28	< 0,001
Cystein/Methionin Biosynthese			
6152 ($\Delta cysK$)	1,01	0,15	> 0,05
6156 ($\Delta cysM$)	0,85	0,25	< 0,001
6148 (<i>metE</i>)	0,97	0,11	> 0,05
6160 (<i>metH</i>)	1,01	0,12	> 0,05
6310 ($\Delta metE \Delta metH$)	0,85	0,18	> 0,05
Prolin/Arginin Biosynthese & Transport			
6500 ($\Delta proC$)	1,3	0,75	< 0,001
6420 ($\Delta proB$)	1,1	0,18	> 0,05
7062 ($\Delta argE$)	0,94	0,22	> 0,05
6426 ($\Delta proC \Delta proB$)	0,83	0,32	< 0,001
6788 ($\Delta argT$)	0,94	0,11	< 0,01
5398 ($\Delta argG \Delta argE$)	1,1	0,19	> 0,05
7064 ($\Delta proB \Delta argE$)	1,1	0,16	< 0,001
7066 ($\Delta proC \Delta argE$)	1,1	0,11	< 0,01
7068 ($\Delta proB \Delta proC \Delta argE$)	0,91	0,54	> 0,05

Tab. 13: Ergebnisübersicht Fortführung

Stamm/Genotyp	MW	STW	p-Wert
Aromatische Aminosäure Biosynthese & Transport			
7230 (Δ aroA)	0,55	0,05	> 0,05
6190 (Δ pheA)	0,96	0,2	> 0,05
5954 (Δ pheP)	1,0	0,1	> 0,05
5418 (Δ tyrA Δ tyrB)	0,93	0,2	> 0,05
5762 (Δ tyrA Δ tyrB Δ trpBA)	1,02	0,15	> 0,05
5768 (Δ tyrA Δ tyrB Δ trpBA Δ pheA)	1,1	0,2	> 0,05
5588 (Δ aroP Δ pheP)	1,1	0,3	< 0,01
5668 (Δ aroP Δ pheP Δ tyrP)	1,1	0,2	< 0,01
5674 (Δ aroP Δ pheP Δ tyrP Δ mtr)	0,96	0,1	> 0,05
6220 (Δ aroP Δ pheP Δ tyrP Δ mtr Δ pheA)	0,96	0,27	> 0,05
6292 (Δ aroP Δ pheP Δ tyrP Δ mtr Δ pheA Δ trpBA)	0,47	0,29	< 0,05
Hinweis auf intrazelluläre Peptidverwertung			
2958/pWSK29	0,82	0,15	> 0,05
2958/pWSJFaroPI	1,1	0,19	< 0,01
6220 (Δ aroP Δ pheP Δ tyrP Δ mtr Δ pheA)	0,96	0,27	> 0,05
6220/pWSK29	1,2	0,25	> 0,05
6220/pWSJFaroPI	1,04	0,25	> 0,05
Peptidtransportsysteme			
5202 (Δ dppABCDF Δ oppABCDF)	1,1	0,16	< 0,05
5208 (Δ dppABCDF Δ oppABCDF Δ ydgR)	1,2	0,08	> 0,05
5500 (Δ dppABCDF Δ oppABCDF Δ ydgR Δ sapABCDF)	0,8	0,2	> 0,05
5556 (Δ dppABCDF Δ oppABCDF Δ ydgR Δ sapABCDF Δ yhiP)	0,97	0,18	> 0,05
5618 (Δ dppABCDF Δ oppABCDF Δ ydgR Δ sapABCDF Δ yhiP Δ yejABEF)	0,5	0,14	< 0,001
aroA und para-Aminobenzoat			
2958 (hisG46 rpsL (PABA))	1,0	0,12	> 0,05
7230 (Δ aroA)	0,38	0,16	< 0,001
7230 (Δ aroA) (PABA)	0,99	0,16	> 0,05
3946 (his+(Thr87) (PABA))	1,23	0,1	< 0,001
7254 (his+ Δ aroA)	0,64	0,1	> 0,05
7254 (his+ Δ aroA) (PABA)	1,43	0,2	< 0,01
para-Aminobenzoat Biosynthese			
6464 (his+ Δ pabA)	0,50	0,15	< 0,001
6470 (his+ Δ pabA Δ pabB)	0,47	0,14	< 0,001
6476 (his+ Δ pabA Δ pabB Δ pabC)	0,45	0,17	< 0,001
6464 (his+ Δ pabA) (PABA)	0,93	0,17	< 0,05
6470 (his+ Δ pabA Δ pabB) (PABA)	0,94	0,14	< 0,05
6476 (his+ Δ pabA Δ pabB Δ pabC) (PABA)	0,85	0,15	> 0,05
Verzweigtkettige Aminosäuren			
5488 (Δ leuABCD)	1,2	0,4	< 0,05
6630 (Δ ilvE)	0,7	0,3	> 0,05
6094 (Δ avtA)	1,0	0,2	< 0,05
5434 (Δ ilvBN Δ ilvGM Δ ilvIH)	1,3	0,4	> 0,05
5778 (Δ ilvBN Δ ilvGM Δ ilvIH Δ leuABCD)	1,4	0,4	> 0,05
5952 (Δ brnQ)	1,2	0,26	> 0,05
5596 (Δ livJ Δ livKHMGF Δ brnQ)	1,5	0,76	> 0,05
6226 (Δ ilvBN Δ ilvGM Δ ilvIH Δ leuABCD Δ livJ)	0,9	0,24	< 0,01
6282 (Δ ilvBN Δ ilvGM Δ ilvIH Δ leuABCD Δ livJ Δ livKHMGF)	1,0	0,2	> 0,05
6322 (Δ ilvBN Δ ilvGM Δ ilvIH Δ leuABCD Δ livJ Δ livKHMGF Δ brnQ)	0,8	0,44	< 0,001
Poly Valin Peptid			
2958 (Valin)	0,78	0,4	< 0,01
2958 (TriValin Peptid)	1,1	0,2	< 0,01
5722 (Δ ilvGM)	0,98	0,2	> 0,05
5722 (Δ ilvGM) (Valin)	0,3	0,1	< 0,001
5722 (Δ ilvGM) (TriValin Peptid)	0,4	0,1	< 0,001
Glyceroltransport			
6382 (Δ glpF)	1,0	0,17	> 0,05
6496 (Δ glpT)	1,0	0,15	> 0,05
6388 (Δ glpF Δ glpT)	1,2	0,2	> 0,05

14.2 Ergebnisse die Aminosäureunabhängigkeit bzw. Peptidzugang stützen



▲ Abb.: 35 Exemplarische Darstellung (Invasions/Replikations Assays) von Mutanten die nach Abschluss der praktischen Arbeiten untersucht wurden (Dr. Tedin). Die Untersuchungen bestätigen den Zugang zu freien Aminosäuren im Zellkulturmedium (A & B). Und unterstützen die These, dass bei Mangel von bestimmten Aminosäuren im Zellkulturmedium immer noch verlangsamtes bzw. Wildtyp gleiches intrazelluläres Wachstum stattfindet (C & D) (Interpretation: mögliche Verwendung von Peptiden?).

14.3 Tab.14: Verwendeten Mutagenese- und Testoligonukleotidprimer:

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Testoligonukleotidprimer			
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	(<i>kan</i>) ^r	Datsenko & Wanner, 2000
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	(<i>kan</i>) ^r	Datsenko & Wanner, 2000
Histidin-Biosynthese			
HISDH1P1	GCCGGATAAGGCGGAACCCTGTGATGGAGTAAA GACCATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>hisD</i>	Diese Arbeit
HISDF	CGTTGATATTTTGGGTTCTG	<i>hisD</i>	Diese Arbeit
HISDR	GTACCAGGTTGCGGACATTT	<i>hisD</i>	Diese Arbeit
HISBH2P2	TTGGCGCAGCCGGTGTCAAGGATGACGACGTTC ATCACAGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>hisB</i>	Diese Arbeit
HISBF	TACGGTCGGCACCCGCCAGG	<i>hisB</i>	Diese Arbeit
HISBR	CCACGGCGGATTTTACCGAG	<i>hisB</i>	Diese Arbeit
Glycin-Biosynthese / CH3-Translokation			
GLYAH1P1	ATTTTATTGTTAGCTGAGTCAGGAGATGCGGATG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>glyA</i>	Diese Arbeit
GLYAH2P2	CGCCATCGGGCCATTTTCACAACACAAGCGCTTA CATATGAATATCCTCCTTAG	<i>glyA</i>	Diese Arbeit
GLYAF	AGTCCCACGGACTGCCTTTT	<i>glyA</i>	Diese Arbeit
GLYAR	GGCGCATAAGTAATGCCCGA	<i>glyA</i>	Diese Arbeit
GCVTH1P1	GTTGTTAGCCCCGCTAATTCAACGAGGAAAAGA TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>gcvT</i>	Diese Arbeit
GCVTH2P2	GCTCATCAATTAATCTCCAAAAAAGGATGAATCA CATATGAATATCCTCCTTAG	<i>gcvT</i>	Diese Arbeit
GCVTF	TCGTGGCGAAGATTTCCCAT	<i>gcvT</i>	Diese Arbeit
GCVTR	TTGCTGTATTTTCAGTTCTGC	<i>gcvT</i>	Diese Arbeit
GCVPH1P1	GATTCACGACGTTTTAGGAACCATCGCCCATG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>gcvP</i>	Diese Arbeit
GCVPH2P2	AGCGCCTTTAGAAGACAGTCGAATCAGTAAATTA CATATGAATATCCTCCTTAG	<i>gcvP</i>	Diese Arbeit
GCVPF	CACCGGGCAATTGAGTTAGA	<i>gcvP</i>	Diese Arbeit
GCVPR	TGCATCCGACACAAACAAAGC	<i>gcvP</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
DNA-Synthese			
THYAH1P1	ATATCGCCGCGCCCGCCGAGCAACACGTTTCCTG AGGAACCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>thyA</i>	Diese Arbeit
THYAH2P2	ATGACGTCGGTTATGGCAGGATCGTCAGCGCTT AGATAGCGACCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>thyA</i>	Diese Arbeit
THYAF	GCGATCATGATGGTTTGGGC	<i>thyA</i>	Diese Arbeit
THYAR	GGAATGCGCGCCGAAGATTG	<i>thyA</i>	Diese Arbeit
Serin / Threonin-Biosynthese			
SERAH1P1	CAACATCAGATGGCAAAAAAGACAGGATCGGGG AAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>serA</i>	Diese Arbeit
SERAH2P2	GGGCAGGTCATCTCCTGCCATTTAGCGGAAATT ACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>serA</i>	Diese Arbeit
SERAF	TGAAGGACGGATGCAAATCC	<i>serA</i>	Diese Arbeit
SERAR	GTTGAGGCAGGGAAACCAGA	<i>serA</i>	Diese Arbeit
THRBH1P1	CTGTTACGGACCCTCTCATGGAAGTTAGGAGTTT AACATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>thrB</i>	Diese Arbeit
THRBF	CGGCGGCGGGCGTGTGGCC	<i>thrB</i>	Diese Arbeit
THRBR	GACGGCCTGCGCAAAGCTGA	<i>thrB</i>	Diese Arbeit
THRCH2P2	GTAAGCGACAGCGCCACCGGGCGCAATGGTTAT TGGCGGGTCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>thrC</i>	Diese Arbeit
THRCF	GAAGGCTTCGTTTCATATTTG	<i>thrC</i>	Diese Arbeit
THRCR	GCCTACAAATCGACACCACC	<i>thrC</i>	Diese Arbeit
Threonin-Katabolismus			
TDHH1P1	GGTAAACAACACTGGGCGTGATTGCCTGAGGATGT AAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>tdh</i>	Diese Arbeit
TDHH2P2	GCAACTCGAATTATTTGGGTATATACATATTAAT CCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>tdh</i>	Diese Arbeit
TDHF1	GCGGTAGACGCGTTCACGCG	<i>tdh</i>	Diese Arbeit
TDHR1	CCTGGGGACTCACTCCCTTG	<i>tdh</i>	Diese Arbeit
KBLH1P1	GTGCTGAAATTTGCCAGTCTGGAGAATCGCAAT GCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>kbl</i>	Diese Arbeit
KBLH2P2	CGCTTTCAGTTTGGATAACGCTTTCATCTTACATC CTCACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>kbl</i>	Diese Arbeit
KBLF1	CGTATCAACGTATCGCTTTG	<i>kbl</i>	Diese Arbeit
KBLR1	GTCGGTCATCCAGATGCCCT	<i>kbl</i>	Diese Arbeit
ILVAH1P1	GGTGCGCGATAAATCGAAATTGGGAGGTTGATG ATGGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ilvA</i>	Diese Arbeit
ILVAH2P2	CCCGAAAACTAAACGCTGAATTAACCCGCCAGA AAGAACCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ilvA</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Threonin-Katabolismus			
ILVAF	CCTGGCGACCAGCGCCGATA	<i>ilvA</i>	Diese Arbeit
ILVAR	AGATAATATCTGGATATCAG	<i>ilvA</i>	Diese Arbeit
ILVAR2	TAACGATATGGTGAGCCGAG	<i>ilvA</i>	Diese Arbeit
LTAAH1P1	CAGTGCACATCACCTTTTTAAAATCCAGGGATGTG CCATGATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ltaA</i>	Diese Arbeit
LTAAH2P2	GCGCCGAGAACCAGAATGCGTTGCGCCACGTTG CTCTCCTTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ltaA</i>	Diese Arbeit
LTAAF	GAAAACGAACTGGCTAAGGT	<i>ltaA</i>	Diese Arbeit
LTAAR	TGCTGGCCGATATAGCCGCT	<i>ltaA</i>	Diese Arbeit
Alanin-, Serin-, Glycin-, Threonin-Transport			
CYCAH1P1	GAGCCCGCACAAACACAGACAGGTACAGGAAGAA AAACATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>cycA</i>	Diese Arbeit
CYCAH2P2	TAAGCGCCAGCGCCACCGGGCAAACAATTAAC GCATTCCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>cycA</i>	Diese Arbeit
CYCAF	CGTATCATAGACCAAAGGCC	<i>cycA</i>	Diese Arbeit
CYCAR	GCCTCCAAATCAACGTTACG	<i>cycA</i>	Diese Arbeit
SDACH1P1	GACCAGCAACCTGATTTTTAGCATCCTCCAGGAG AAATAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>sdaC</i>	Diese Arbeit
SDACH2P2	GAGAAGCGCCGCGGTAAGCGGCGCTAAAGGACT TAGCTGAACAGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>sdaC</i>	Diese Arbeit
SDACF	GGTCTTTTTTTCATTGGATTA	<i>sdaC</i>	Diese Arbeit
SDACR	ATAGGGCATCCATTGCGGTT	<i>sdaC</i>	Diese Arbeit
SSTTH1P1	CAGGGGATGACCAGCAACACAATAACAAGGAATA TGAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>sstT</i>	Diese Arbeit
SSTTH2P2	CGGATGGCATAACGCCATCCGGCATCGATAATCA CTTAGCTCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>sstT</i>	Diese Arbeit
SSTTF	GAAAGATGCGCCGTAAGAGC	<i>sstT</i>	Diese Arbeit
SSTTR	TGGGAGATTCAGATCTATCG	<i>sstT</i>	Diese Arbeit
TDCCH1P1	GTTTAGTTGACGCTTAATCTTTTCGTGAGGATAG GATATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>tdcC</i>	Diese Arbeit
TDCCH2P2	GCGCCCTGGGGCGGACGCAGGCTAAACGTGAG GATTAGAACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>tdcC</i>	Diese Arbeit
TDCCF	TTCTCGGGTATCACAAATTA	<i>tdcC</i>	Diese Arbeit
TDCCR	GCCTCCGTGATGTCAGCCT	<i>tdcC</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Cystein / Methionin-Biosynthese			
CYSKH1P1	GGAAGGTATCCCAATTTTCATACAGTTAAGGACAG GCCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>cysK</i>	Diese Arbeit
CYSKH2P2	AGGTGCTTTTTTACGCGTTTTTAACATGCTGGCAT CACTGTTGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>cysK</i>	Diese Arbeit
CYSKF	ATATCTGGCTGGAAGGTATG	<i>cysK</i>	Diese Arbeit
CYSKR	AGCAGGCCACAAAAAAGCAC	<i>cysK</i>	Diese Arbeit
CYSMH1P1	GCTACGCATACCGGGCTTTTTTACGAGCTGAAAA CGTGAATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>cysM</i>	Diese Arbeit
CYSMH2P2	GTTGCCTGTGTTTATCCCAATCAGCTGAACTCATT AGTTTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>cysM</i>	Diese Arbeit
CYSMF	ATTTGTATAGTTATCGCTCG	<i>cysM</i>	Diese Arbeit
CYSMR	ATTCCCGCTTGTCAAAGGCG	<i>cysM</i>	Diese Arbeit
METHH1P1	CAGTATGGCTCGTTACGTGGAGCGTTGTCGGGA GCGAGTGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>metH</i>	Diese Arbeit
METHH2P2	GCCTTGATGTTGTAAGGAAAAGTGACGATTTTAT GAATCACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>metH</i>	Diese Arbeit
METHF	ACTGATAAGGCGCTTGCGCC	<i>metH</i>	Diese Arbeit
METHR	AGAGACAAGGCACCCAATGA	<i>metH</i>	Diese Arbeit
METEH1P1	GTTTTACTTTTCAGATTCAATAAAATAAGAGAGGAA GTAAAATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>metE</i>	Diese Arbeit
METEH2P2	CGCATTGCTGCCGATAAACGCAGCGGCCAGGA TGGGTTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>metE</i>	Diese Arbeit
METEF	TGCAAGCCGAACTATTTAGA	<i>metE</i>	Diese Arbeit
METER	CGTACCCGTCAAAGGGTAG	<i>metE</i>	Diese Arbeit
Verzweigtkettige Aminosäure-Biosynthese			
ILVEH1P1	CATCACAACAAATCCGCGCCTGAGCGCAAAAAGGA AGAAAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ilvE</i>	Diese Arbeit
ILVEH2P2	GACGCAAATTATTTTGGGAAAATATTAATTTTATTT ATTATGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ilvE</i>	Diese Arbeit
ILVEF	GATCTGCCAGAGCGCTGCCA	<i>ilvE</i>	Diese Arbeit
ILVER	TCGCTGCGTTACCGCCTTCC	<i>ilvE</i>	Diese Arbeit
ILVGH1P1	AATTCTGTTTCTCAAGATTTACGACGGGATGTAA CTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ilvG</i>	Diese Arbeit
ILVGF	GCAGAGCGTGAATAACAGCA	<i>ilvG</i>	Diese Arbeit
ILVGR	GTAAAACACGTTCTAAGGTT	<i>ilvG</i>	Diese Arbeit
ILVMH2P2	CGTCGTCATTTTTCTTCCTTTTGGCGCTCAGGCGC GGATTTGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ilvM</i>	Diese Arbeit
ILVMF	TGTCTGGCCGTTGGTGCCGC	<i>ilvM</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Verzweigkettige Aminosäure-Biosynthese			
ILVMR	TCTCGCCATTGAACCAAATA	<i>ilvM</i>	Diese Arbeit
ILVBH1P1	CTTCCCGGAACGTCGGCTCAGAATAAAAGGAATG GAGCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ilvB</i>	Diese Arbeit
ILVBF	CGGGGTTTTTTGTTTAAGAC	<i>ilvB</i>	Diese Arbeit
ILVBR	AGGATGGTTGCGAACGGTCA	<i>ilvB</i>	Diese Arbeit
ILVNH2P2	AAAGTCATCACGCCTGATTTCGAAAGTGAATAAC TACTCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ilvN</i>	Diese Arbeit
ILVNF	AAAGTGTATCCGATGGTGCC	<i>ilvN</i>	Diese Arbeit
ILVNR	CCGTTCACTGTCGGAATGGT	<i>ilvN</i>	Diese Arbeit
ILVIH1P1	GGTCGTCTGATCGCTTATCGATCAAGGCGTAAAG CAGGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ilvI</i>	Diese Arbeit
ILVIF	GAAATGTTGTCTGGAGCCGA	<i>ilvI</i>	Diese Arbeit
ILVIR	TAACCCGCGATAACGCCCCA	<i>ilvI</i>	Diese Arbeit
ILVHH2P2	ACGCACGCGCGTCGTCATCCGGCGAATCTGCTC AGCGCATCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ilvH</i>	Diese Arbeit
ILVHF	GCAGATTCGCGGGGGCGGGA	<i>ilvH</i>	Diese Arbeit
ILVHR	GCCAGATATCAGCCAGTAGA	<i>ilvH</i>	Diese Arbeit
LEUAH2P1	TGCCTGACGCAAGGCGCCCCTGGAGACAAGGAC CACATCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>leuA</i>	Diese Arbeit
LEUAF	GCCGTTGCGCGGGTTTTTTTT	<i>leuA</i>	Diese Arbeit
LEUAR	CCATGACTTCCGGGCCGATA	<i>leuA</i>	Diese Arbeit
LEUDH2P2	CCCGGTAAGGCGTCAAGGGTTACCGCATAAATGC CGGTTGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>leuD</i>	Diese Arbeit
LEUDF	CCGCTGCCGCGTTACCGGC	<i>leuD</i>	Diese Arbeit
LEUDR	AGAATATAATGGCAACCGGG	<i>leuD</i>	Diese Arbeit
AVTAH1P1	TATCCACTTTGACAGACAGTTTCGATAGATCACCC GTTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>avtA</i>	Diese Arbeit
AVTAH2P2	CTGCATGATGGCCGAATAACCGTCAGCCTTCAC GCCACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>avtA</i>	Diese Arbeit
AVTAF	CCCGCCATTTGTAGCGTTAT	<i>avtA</i>	Diese Arbeit
AVTAR	CGCCTCTATTCTCAACCTTT	<i>avtA</i>	Diese Arbeit
verzweigkettige Aminosäure-Transporter			
BRNQH1P1	TGTTTACAACATCACCATCCACAGGCAGTAAGACT TTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>brnQ</i>	Diese Arbeit
BRNQH2P2	TTAAGCCCCGTGGTGTACACATATGTCAGCGATT TTAGTGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>brnQ</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
verzweigt-kettige Aminosäure-Transporter			
BRNQF	TCCGGGAAAGGCAAAAATTT	<i>brnQ</i>	Diese Arbeit
BRNQR	TCAACACAATAAAAAACCAC	<i>brnQ</i>	Diese Arbeit
LIVJH1P1	ACGTAACAACCAGAATAATGGGGATTATCAGGAT GAATATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>livJ</i>	Diese Arbeit
LIVJH2P2	CCAACGCACCTGCAGCGCGAAAGGCGCCAGAAA ATCACTTCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>livJ</i>	Diese Arbeit
LIVJF	CTGAACAATAACACCACAAC	<i>livJ</i>	Diese Arbeit
LIVJR	TAAGTGACCGGGGTTGAATA	<i>livJ</i>	Diese Arbeit
LIVKH1P1	CAAAACATATAACATCACGAATGGGGATACAGGC ACATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>livK</i>	Diese Arbeit
LIVKF	GTCTGCTTTTTAACCAGCAA	<i>livK</i>	Diese Arbeit
LIVKR	TAAGGTAACCTTTTTAAACC	<i>livK</i>	Diese Arbeit
LIVFH2P2	CACGCGCTTCCCCCTGGCACAGTCTAACCGCC CAGATAGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>livF</i>	Diese Arbeit
LIVFF	CGCCGGAAGAGATCCGCAAC	<i>livF</i>	Diese Arbeit
LIVFR	GAAAAATTTTACCGCTTGCC	<i>livF</i>	Diese Arbeit
para-Aminobenzoensäure-Biosynthese			
PABAH1P1	CTGAGTAAAATAGTGCGGTTCTACTCACCCGGAG CCGCCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>pabA</i>	Diese Arbeit
PABAH2P2	AATATGAATAAAAAATCACTCAATAGCAACCACAA ATCAACGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>pabA</i>	Diese Arbeit
PABAF	CGATAAGCGAAGCTCGCGAA	<i>pabA</i>	Diese Arbeit
PABAR	ATGCCAGTGAAATTATAATC	<i>pabA</i>	Diese Arbeit
PABBH1P1	GGCGGTAAGCCAGTAGTGTTGTAACGAGTCAGGA ATGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>pabB</i>	Diese Arbeit
PABBH2P2	GATCGAGCGTCAGACGGCTGGTATCCACGTATTA GTTCTCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>pabB</i>	Diese Arbeit
PABBF	TTAGCGCTAATTATTTACAG	<i>pabB</i>	Diese Arbeit
PABBR	GCGCAAAAGCTGAAAGCGCG	<i>pabB</i>	Diese Arbeit
PABCH1P1	TCCTGCCACACTAACAGGCGACGGATAAGGAGC CACTATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>pabC</i>	Diese Arbeit
PABCH2P2	AACGCCTGACAATTTTTTTCATAACTAATTCGGATG CTCACACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>pabC</i>	Diese Arbeit
PABCF	CACCTCTTGTCTGCGTTAT	<i>pabC</i>	Diese Arbeit
PABCR	CCACGGCAATACCCAGCACA	<i>pabC</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Aomatische Aminosäure-Biosynthese			
PHEAH1P1	GGAGGCCTTTTTATTGATAACAAAAAGGCAACA CTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>pheA</i>	Diese Arbeit
PHEAH2P2	GTCGCAGGGATGAAGAAAAGCCGTTTTATTGAAC GTCAGGCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>pheA</i>	Diese Arbeit
PHEAF	GAACAAGAAGGCCTCCCCCA	<i>pheA</i>	Diese Arbeit
PHEAR	CGCCATCTTCACCCTGCAGG	<i>pheA</i>	Diese Arbeit
TYRAH1P1	GAGCGGCCAGCTGGCGGTGCGCGTCGCATAAGA GGTTGTTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>tyrA</i>	Diese Arbeit
TYRAH2P2	AGCCAGCAAAGCTGGCTTTTAGTATAGATGTCAT CATTATGGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>tyrA</i>	Diese Arbeit
TYRAF	CGTGAAATTCATAAAGATTT	<i>tyrA</i>	Diese Arbeit
TYRAR	CATAACGGTTCCTTAAACGA	<i>tyrA</i>	Diese Arbeit
TYRBH1P1	GTTATTTCTGCCCTCTGTAAACCTGGAGAACCAT CGCGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>tyrB</i>	Diese Arbeit
TYRBH2P2	GGAGGGCACTGTTATCGCCGTCCGGCCTGAATAT TACATGACCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>tyrB</i>	Diese Arbeit
TYRBF	TCTCGTCCTTCCGGTTTATT	<i>tyrB</i>	Diese Arbeit
TYRBR	GATGATCACAACAGCTATTG	<i>tyrB</i>	Diese Arbeit
TRPBAH1P1	CAGTTTTTCAGACACTGCGCGCATATTAAGGAAAA AACATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>trpBA</i>	Diese Arbeit
TRPBAH2P2	CATTAAGCCGCCAGCGTTATGCTGACGGCTTAAC CCGTTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>trpBA</i>	Diese Arbeit
TRPBF	CAAAGATGCTCGTCTTCTGGC	<i>trpB</i>	Diese Arbeit
TRPBR	GGACAAAAGCGCCTTCCCGG	<i>trpB</i>	Diese Arbeit
TRPAF	CCGCGGAGATAAAGACATCT	<i>trpA</i>	Diese Arbeit
TRPAR	ATTCTGGTTCGGCGCCAGCC	<i>trpA</i>	Diese Arbeit
AROAH1P1	TCGGCGCGCCAGCCGTGACTGGCGCAACAGA AGACTTAGGCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>aroA</i>	Diese Arbeit
AROAH2P2	CTGTGGGGTTTTTATTTCTGTTTTTTGAGAGTTGA GTTTCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>aroA</i>	Diese Arbeit
AROAF	TTTTCATCCCCACGGCCAGT	<i>aroA</i>	Diese Arbeit
AROAR	ATAAAAATAGTGCGAATACG	<i>aroA</i>	Diese Arbeit
AROPHF	CATGTTTCAAAGCTTTAACTGTGCACAAATGTT	<i>aroP</i>	Diese Arbeit
AROPBR	CCGCTGATATGGATCCAATGGTTATACGTGGG	<i>aroP</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Aomatische Aminosäure-Biosynthese			
PHEPH1P1	CTCAATAAAAACGATACAGGGGTAGGACGTGAAA AACGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>pheP</i>	Diese Arbeit
PHEPH2P2	ATCGCATGAACATGGGATCGGGCAAAAAAGTTAA TGAGCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>pheP</i>	Diese Arbeit
PHEPF	CGGCAGCGAGAGCGAAATGT	<i>pheP</i>	Diese Arbeit
PHEPR	AGGGACATTGCGGCATTAAT	<i>pheP</i>	Diese Arbeit
TYRPH1P1	CGGATATCACCGTTCTTTGTTACCGGGGTAGTAG AAAGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>tyrP</i>	Diese Arbeit
TYRPH2P2	GTAATCTTTGCCTGGCGTTAACCTGGATCGGGCA GGAACCCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>tyrP</i>	Diese Arbeit
TYRPF	GTAATGCCTTACCCTGCGCC	<i>tyrP</i>	Diese Arbeit
TYRPR	CCATAGCGTGATGATTATCG	<i>tyrP</i>	Diese Arbeit
MTRH1P1	AGATAGTCACACTATAAATGACTGGAGAGAGAGC TGAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>mtr</i>	Diese Arbeit
MTRH2P2	GATGAAAACAGCTCATCCGGCTCGTTCAATTA GTACACCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>mtr</i>	Diese Arbeit
MTRF	CTGGTACAGTGCGAGCGTATT	<i>mtr</i>	Diese Arbeit
MTRR	TACCATTTGCGGGACTTGTG	<i>mtr</i>	Diese Arbeit
aromatische Aminosäure-Transport			
AROPH1P1	CTGTGGGGTTTTTATTTCTGTTTTTTGAGAGTTGAG TTTCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>aroP</i>	Diese Arbeit
AROPH2P2	TCGGCGCGCCAGCCCGTCTGACTGGCGCAACAGA AGACTTAGGCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>aroP</i>	Diese Arbeit
Asparagin-Biosynthese			
ASPCH1P1	TAGCGGATTTCCCTTCTGTAACATAATGGAACCT CGTCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>aspC</i>	Diese Arbeit
ASPCH2P2	TGCAGGCTTTTTTATCGGTCACGCCAGTCGGCAG CTTTTTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>aspC</i>	Diese Arbeit
ASPCF	GTAAATCTGCCGTTAACCTG	<i>aspC</i>	Diese Arbeit
ASPCR	CAGAATGAAAAAGCCTGCAC	<i>aspC</i>	Diese Arbeit
Arginin-Biosynthese			
ARGGH1P1	GATCTCATTATCAGTCAATCAAGCAGGGTTCTATT CTATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>argG</i>	Diese Arbeit
ARGGH2P2	GCTTTCGCGGCCTGTTGCATCAACGACGCGGGCT TATTTGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>argG</i>	Diese Arbeit
ARGGF	AACCTTCACTAAACGCTTCC	<i>argG</i>	Diese Arbeit
ARGGR	CCTGGGGTGATATTCACAAA	<i>argG</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Arginin-Biosynthese			
ARGHH1P1	CCGGCAGTGAAATTCGAAGAATTTAAGGAAGTCTA TTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>argH</i>	Diese Arbeit
ARGHH2P2	GCAGTATTGCCTGATGGCGCTATGCTTATAAGGC TTACAACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>argH</i>	Diese Arbeit
ARGHF	AGGCCGGATAAGCGTAGCGC	<i>argH</i>	Diese Arbeit
ARGHR	ACCCGGCGTCGCTGATGCTC	<i>argH</i>	Diese Arbeit
ARGEH1P1	CATGAATATTGATACTATCATGACCTGAGGTGTGT CAACAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>argE</i>	Diese Arbeit
ARGEH2P2	ATGACGCCACGCATCGGGCCTGCTATCTTTCTG TCTTTATGACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>argE</i>	Diese Arbeit
ARGEF	CTTTATGCTCAACGTTAATG	<i>argE</i>	Diese Arbeit
ARGER	CTTATCCGGCCTACAAGACG	<i>argE</i>	Diese Arbeit
Arginin-Transport			
ARGTH1P1	ACGTA AACATAAGAAAATGACGCCACTTGAGGG GTATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>argT</i>	Diese Arbeit
ARGTH2P2	ACCGTGATAGTTCCCCAGCGCGGCGGTTATCCC CTTCCCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>argT</i>	Diese Arbeit
ARGTF	GTCTGCAAACACACAACGCC	<i>argT</i>	Diese Arbeit
ARGTR	GTGCAAACATCTATTTTGC	<i>argT</i>	Diese Arbeit
Prolin-Biosynthese			
PROBH1P1	CATTTGGTCTTTATTTCTTATTTTGAACGGCAGAGA ATCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>proB</i>	Diese Arbeit
PROBH2P2	AGCAATGCCCATTTGTTCCAGCATATGCCTGTTCC TTATCGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>proB</i>	Diese Arbeit
PROBH3P1	CGTTCATTTGGTCTTTATTTCTTATTTTGAACGGCA GAGAATCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>proB</i>	Diese Arbeit
PROBH4P2	AGCAATGCCCATTTGTTCCAGCATATGCCTGTTCC TTATCGAGTCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>proB</i>	Diese Arbeit
PROBF	AGCCAGTCCTGCTAAAACGT	<i>proB</i>	Diese Arbeit
PROBR	CCAGCTTATACGACGCCGCT	<i>proB</i>	Diese Arbeit
PROCH1P1	ACCATTCCCATAACACACAAACATAGGGAGTGA CGAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>proC</i>	Diese Arbeit
PROCH2P2	CATGACGTCCAGCCGGGCTTCAGGATTTACTGAG CGCTCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>proC</i>	Diese Arbeit
PROCH3P1	TAACCATTCCCATAACACACAAACATAGGGAGTG ACGAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>proC</i>	Diese Arbeit
PROCH4P2	CATGACGTCCAGCCGGGCTTCAGGATTTACTGAGC GCCTCTGACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>proC</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Prolin-Biosynthese			
PROCF	GTTTTCAATCCGCGTTAAGC	<i>proC</i>	Diese Arbeit
PROCR	CAAAGCAAAGAATGCCGGAC	<i>proC</i>	Diese Arbeit
Glycerol-Transport			
GLPTH1P1	GTTTACCTCTAAATAAAATATGGGCCACGGAGGCT ACAATATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>glpT</i>	Diese Arbeit
GLPTH2P2	CGCCACGCTAAGGTTTTTCAGTGTGGTTTTTCATGT TATTAGCCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>glpT</i>	Diese Arbeit
GLPTF	TTGTTTGAACGAACTGCGGT	<i>glpT</i>	Diese Arbeit
GLPTR	ATGGTCATTCTGCCAACAT	<i>glpT</i>	Diese Arbeit
GLPFH1P1	GCATACCAATAATCATTACATACTCTTCAGGATCC GATTATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>glpF</i>	Diese Arbeit
GLPFH2P2	CAGATTACAGCGAAGCATTGTTGTGTGGTCCG GGTGGAGTCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>glpF</i>	Diese Arbeit
GLPFF	GTGGATGTCCATGACCTCCT	<i>glpF</i>	Diese Arbeit
GLPFR	TACCCTGGTCGAGCGCAACG	<i>glpF</i>	Diese Arbeit
Regulatoren <i>gcv</i>-Gene			
GCVRH1P1	GGCAATAAAAGCAAGCGACCAAAGCCGTTCTGAT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>gcvR</i>	Diese Arbeit
GCVRH2P2	CGGTGCGATATCACCGGCTTTCAGTGGATTGATT ACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>gcvR</i>	Diese Arbeit
GCVRF	CAAGTCCCTCAATGGTACGT	<i>gcvR</i>	Diese Arbeit
GCVRR	CCCCGTCTTGATCCGGCAAG	<i>gcvR</i>	Diese Arbeit
GCVAH1P1	GTTAAATTCATTCGACATTAAGTCCAGAGGCCATG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>gcvA</i>	Diese Arbeit
GCVAH2P2	ACGGCTGGTCATGGTCATACCCTAAGTTAATTACA TATGAATATCCTCCTTAG	<i>gcvA</i>	Diese Arbeit
GCVAF	CTAATAGGTTACATGTTGTT	<i>gcvA</i>	Diese Arbeit
GCVAR	ACCGCTGATAGCGGCGACAA	<i>gcvA</i>	Diese Arbeit
Leucin regulierbarer Regulator <i>Irp</i>			
LRPH1P1	GGCAGGAGTAGGGAAGGAATACAGAGAGACAATA ATAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>Irp</i>	Diese Arbeit
LRPH2P2	CTACAGCGATTTTGCACCTGTTCCGTGTTAGCGTG TCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>Irp</i>	Diese Arbeit
LRPF	GAACAGTGATGTGAGTAGAG	<i>Irp</i>	Diese Arbeit
LRPR	GTTGCTGTATGGATTAACAG	<i>Irp</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Di-und Oligopeptid-Transport			
YDGRH1P1	CCTGTTAATACGGGGCGTAAAAAAGAGGTAAAAG TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>ydgR</i>	Diese Arbeit
YDGRH2P2	AGTTAGCGGCCTGAATGTTGTTTCCCGGAAAATTA CATATGAATATCCTCCTTAG	<i>ydgR</i>	Diese Arbeit
YDGRF	GTCTGACTCATCACGCGCCA	<i>ydgR</i>	Diese Arbeit
YDGRR	GAGGTTTAAAGTATGGTAGTG	<i>ydgR</i>	Diese Arbeit
OPPAH1P1	ACCAGTAATTATAATGAGTGGAGTACAAACACAAT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>oppA</i>	Diese Arbeit
OPPAH3P1	GTA AAA ACCAGTAATTATAATGAGTGGAGTACAAA CACAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>oppA</i>	Diese Arbeit
Di-und Oligopeptid-Transport			
OPPAF	TACGTCGTATACCGAATCGA	<i>oppA</i>	Diese Arbeit
OPPAR	GGGAAAGTTATAGTGCGATG	<i>oppA</i>	Diese Arbeit
OPPFH2P2	GTA AAA ACCAGTAATTATAATGAGTGGAGTACAAA CACAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>oppF</i>	Diese Arbeit
OPPFH4P2	CTAAAAGAAGGGCTGACGAATTGTCAGCCCTTGC GATTATAACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>oppF</i>	Diese Arbeit
OPPFF	ACTTGAAGCGTTTAGTCCTG	<i>oppF</i>	Diese Arbeit
OPPFR	AAGAAAGTGACACGGTAACC	<i>oppF</i>	Diese Arbeit
DPPAH1P1	GCAAAAACAACATACATCACAATTGGAGCAGAAGAA TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>dppA</i>	Diese Arbeit
DPPAF	CCGGGCGGTAAAAGCCTTTG	<i>dppA</i>	Diese Arbeit
DPPAR	ACGCCGGATGGCGCTGCGCT	<i>dppA</i>	Diese Arbeit
DPPFH2P2	TTGATAAGGCGCAGCCGCCATCCGGCATAAAACG CAATTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>dppA</i>	Diese Arbeit
DPPFF	GGACGATGGACGTCAGTCAA	<i>dppF</i>	Diese Arbeit
DPPFR	AGGCCTACAGGTACGGTGTA	<i>dppF</i>	Diese Arbeit
SAPAH1P1	GCGATACACTTTGCAAATTGAACTTCAAAA ACTTA ACTATTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	<i>sapA</i>	Diese Arbeit
SAPAF1	TTACGTGGCGGGCCGAAGTG	<i>sapA</i>	Diese Arbeit
SAPFH2P2	CAGAGAATCGAACTGAGGGTATTTGTTTCGCTTAG CGATCCTTCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>sapF</i>	Diese Arbeit
SAPFR1	TTGCTGTTGGGCAGTCGCAT	<i>sapF</i>	Diese Arbeit
YHIPF2	TTCGCAGTACTCAGTACATC	<i>yhiP</i>	Diese Arbeit
YHIPR2	CATCGGTTTGATATTTATGC	<i>yhiP</i>	Diese Arbeit
YHIPF	TCGGCGCGTTTTGATATACG	<i>yhiP</i>	Diese Arbeit
YHIPR	CCTACGATTCTCAATTATTT	<i>yhiP</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Gen	Bem./Ref.
Di-und Oligopeptid-Transport			
YEJAF	TTATTCAGCGAAACGCCTGC	<i>yejA</i>	Diese Arbeit
YEJAR	CCATAGCGTGGGGATCACCA	<i>yejA</i>	Diese Arbeit
YEJFF	TGCTGATTTTTATCGGCGAA	<i>yejF</i>	Diese Arbeit
YEJFR	CTGAAAAATTTTCGGCGTGGC	<i>yejF</i>	Diese Arbeit

14.4 Bakterienstämme

Tab.15: Für diese Arbeit verwendetet und erzeugte bakterielle Stämme.

Stammnummer	Genotyp	Bemerkung
445	<i>E. coli</i> BL21 <i>bio lacZ</i> (Am) <i>recA strA trp</i> (Am) <i>uvrB</i> ; λ <i>bio252</i> <i>cl857</i> (Ts), λ <i>imm21</i> <i>placUV5-T7</i> gene 1.0:: <i>int</i> Δ <i>nin5</i> Sam7, pNO2680: <i>bla</i> λ pL- <i>rrnB</i>	Studier & Moffatt, 1986
4200	<i>S.Typhimurium</i> LT2-pKD46	K. Tedin
6144	<i>S.Typhimurium</i> 4/74	S. Bowden, Norwich UK
Histidin-Biosynthese		
2958	<i>S.Typhimurium</i> SL1344 <i>hisG46 rpsL</i>	Hoiseith & Stocker, 1981
3946	SL 1344 <i>his</i> +(Thr87) <i>rpsL</i>	T. Henry, Marseille FR
6098	Δ <i>hisBCD</i>	Diese Arbeit
6510	SL1344 <i>his</i> + <i>rpsL</i> Δ <i>hisBCD</i>	Diese Arbeit
Glycin-Biosynthese / CH3-Translokation		
5832	Δ <i>glyA</i>	Diese Arbeit
6626	4/74 Δ <i>glyA</i>	Diese Arbeit
5182	Δ <i>gcvTHP</i>	Diese Arbeit
DNA-Synthese		
7242	Δ <i>thyA</i>	Diese Arbeit
Serin / Threonin-Biosynthese / Threonin-Katabolismus		
5836	Δ <i>serA</i>	Diese Arbeit
5908	<i>his</i> + Δ <i>serA</i>	Diese Arbeit
5732	Δ <i>thrBC</i>	Diese Arbeit
5912	<i>his</i> + Δ <i>thrBC</i>	Diese Arbeit
5162	Δ <i>kbl-tdh</i>	Diese Arbeit
5904	<i>his</i> + Δ <i>kbl-tdh</i>	Diese Arbeit
5160	Δ <i>tdh</i>	Diese Arbeit
6054	Δ <i>ltaA</i>	Diese Arbeit
6948	Δ <i>ilvA</i>	Diese Arbeit
5772	Δ <i>serA</i> Δ <i>thrBC</i>	Diese Arbeit
6562	Δ <i>serA</i> Δ <i>kbl-tdh</i>	Diese Arbeit
6576	Δ <i>thrBC</i> Δ <i>kbl-tdh</i>	Diese Arbeit
6950	Δ Δ <i>serA</i> Δ <i>ilvA</i>	Diese Arbeit
6952	Δ <i>thrBC</i> Δ <i>ilvA</i>	Diese Arbeit
6954	Δ <i>serA</i> Δ <i>thrBC</i> Δ <i>ilvA</i>	Diese Arbeit

Serin / Threonin-Biosynthese / Threonin-Katabolismus (Fortsetzung)

6240	<i>ΔserA ΔthrBC Δkbl-tdh</i>	Diese Arbeit
7000	<i>ΔserA ΔthrBC ΔltaA ΔilvA</i>	Diese Arbeit
7006	<i>ΔserA ΔthrBC Δkbl-tdh ΔilvA</i>	Diese Arbeit
6142	<i>his+ rpsL ΔserA Δkbl-tdh ΔltaA</i>	Diese Arbeit
6246	<i>ΔserA ΔthrBC Δkbl-tdh ΔltaA</i>	Diese Arbeit
6956	<i>ΔserA ΔthrBC Δkbl-tdh ΔltaA ΔilvA</i>	Diese Arbeit

Alanin-, Serin-, Glycin-, Threonin-Transport

5606	<i>ΔcycA ΔsdaC ΔsstT</i>	Diese Arbeit
5612	<i>ΔcycA ΔsdaC ΔsstT ΔtdcC</i>	Diese Arbeit

Cystein / Methionin-Biosynthese

6152	<i>ΔcysK</i>	Diese Arbeit
6156	<i>ΔcysM</i>	Diese Arbeit
6148	<i>ΔmetE</i>	Diese Arbeit
6160	<i>ΔmetH</i>	Diese Arbeit
6310	<i>ΔmetE ΔmetH</i>	Diese Arbeit

Verzweigt-kettige Aminosäure-Biosynthese & Transport (Leucin, Isoleucin, Valin)

5952	<i>ΔbrnQ</i>	Diese Arbeit
6094	<i>ΔavtA</i>	Diese Arbeit
5488	<i>ΔleuABCD</i>	Diese Arbeit
6630	<i>ΔilvE</i>	Diese Arbeit
6186	<i>ΔilvGM</i>	Diese Arbeit
5722	<i>ΔilvGM</i>	Diese Arbeit
5434	<i>ΔlvBN ΔilvGM ΔilvIH</i>	Diese Arbeit
5778	<i>ΔilvBN ΔilvGM ΔilvIH ΔleuABCD</i>	Diese Arbeit
5596	<i>ΔlivJ ΔlivKHMGF ΔbrnQ</i>	Diese Arbeit
6226	<i>ΔilvBN ΔilvGM ΔilvIH ΔleuABCD ΔlivJ</i>	Diese Arbeit
6282	<i>ΔilvBN ΔilvGM ΔilvIH ΔleuABCD ΔlivJ ΔlivKHMGF</i>	Diese Arbeit
6322	<i>ΔilvBN ΔilvGM ΔilvIH ΔleuABCD ΔlivJ ΔlivKHMGF ΔbrnQ</i>	Diese Arbeit

Leucine-responsive Regulatory Protein (Lrp)

5916	<i>Δlrp</i>	Diese Arbeit
------	-------------	--------------

para-Aminobenzoensäure-Biosynthese

6464	<i>his+ rpsL ΔpabA</i>	Diese Arbeit
6470	<i>his+ rpsL ΔpabA ΔpabB</i>	Diese Arbeit
6476	<i>his+ rpsL ΔpabA ΔpabB ΔpabC</i>	Diese Arbeit

Aspartat-Asparagin-Glutamat-Glutamin-Biosynthese

6182	$\Delta aspC$	Diese Arbeit
7404	$\Delta aspC \Delta tyrB$	Diese Arbeit
7474	$\Delta asnA$	Diese Arbeit
7476	$\Delta asnB$	Diese Arbeit
7484	$\Delta asnA \Delta asnB$	Diese Arbeit
7518	$\Delta gltB$	Diese Arbeit
7520	$\Delta gltD$	Diese Arbeit
7522	$\Delta gltBD$	Diese Arbeit
7528	$\Delta glnA$	Diese Arbeit
7536	4/74 $\Delta glnA$	Diese Arbeit

Di-und Oligopeptid-Transport

5196	$\Delta ydgR$	Diese Arbeit
5202	$\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF$	Diese Arbeit
5208	$\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR$	Diese Arbeit
5500	$\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF$	Diese Arbeit
5556	$\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP$	Diese Arbeit
5618	$\Delta dppABCDF \Delta oppABCDF \Delta ydgR \Delta sapABCDF \Delta yhiP$ $\Delta yejABEF$	Diese Arbeit

Arginin-Prolin Biosynthese / Transport

6788	$\Delta argT$	Diese Arbeit
5398	$\Delta argG \Delta argH$	Diese Arbeit
7062	$\Delta argE$	Diese Arbeit
6420	$\Delta proB$	Diese Arbeit
6500	$\Delta proC$	Diese Arbeit
6426	$\Delta proB \Delta proC$	Diese Arbeit
7064	$\Delta proB \Delta argE$	Diese Arbeit
7068	$\Delta proB \Delta proC \Delta argE$	Diese Arbeit
7066	$\Delta proC \Delta argE$	Diese Arbeit

Aromatische Aminosäure Biosynthese & Transport (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin)

2312	<i>S. Typhimurium</i> SL3261 $aroA::\Delta Tn10(Tc^S)$	Hoiseth & Stocker, 1981
7230	$\Delta aroA$	Diese Arbeit
7254	$his+ \Delta aroA$	Diese Arbeit
6190	$\Delta pheA$	Diese Arbeit
5418	$\Delta tyrA \Delta tyrB$	Diese Arbeit
5762	$\Delta tyrA \Delta tyrB \Delta trpBA$	Diese Arbeit
5768	$\Delta tyrA \Delta tyrB \Delta trpBA \Delta pheA$	Diese Arbeit

Aromatische Aminosäure Biosynthese & Transport (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin)

(Fortsetzung)

5954	$\Delta pheP$	Diese Arbeit
5588	$\Delta aroP \Delta pheP$	Diese Arbeit
5668	$\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP$	Diese Arbeit
5674	$\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr$	Diese Arbeit
6220	$\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$	Diese Arbeit
2958 (pWSK29)	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 (pWSK29)	Diese Arbeit
6220 (pWSK29)	$\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ (pWSK29)	Diese Arbeit
2958 (pWSJFaroP1)	<i>S. Typhimurium</i> SL1344 (pWSJFaroP1)	Diese Arbeit
6220 (pWSJFaroP1)	$\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA$ (pWSJFaroP1)	Diese Arbeit
6292	$\Delta aroP \Delta pheP \Delta tyrP \Delta mtr \Delta pheA \Delta trpBA$	Diese Arbeit
Glycerol-Transport		
6382	$\Delta glpF$	Diese Arbeit
6496	$\Delta glpT$	Diese Arbeit
Glycerol-Transport		
6388	$\Delta glpF \Delta glpT$	Diese Arbeit
Regulatoren <i>gcv</i>-Gene		
5176	$\Delta gcvA$	Diese Arbeit
5178	$\Delta gcvB$	Diese Arbeit
5180	$\Delta gcvR$	Diese Arbeit

15. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CFU	koloniebildende Einheit (<i>colony-forming unit(s)</i>)
CoA	Coenzym A
Cues-Prozesse	Clathrin/Calveolin unabhängige endozytotischen Prozesse
CvA	Chaperon vermittelte Autophagie
DHB	2,3 Dihydroxybenzat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LAMP	Lysosom-Membran-assoziierte-Proteine
Lsg.	Lösung
M	Molar
mg	Milligramm
MFA	metabolic flux analysis (metabolische Umsatzanalyse)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	Multiplicity of Infection (Anzahl Bakterien pro Wirtszelle)
mTHF	methyliertes Tetrathydrofolat
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Nitritoxid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei Wellenlänge $\lambda=600$ nm
<i>p</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit
PABA	<i>para</i> -Aminobenzoat
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
Pmf	Proton motor force (Protonen motorische Kraft)
PRPP	Phosphoribosyl-pyrophosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SCV	<i>Salmonella</i> containing vacuole (<i>Salmonella</i> beinhaltende Vakuole)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sifs	<i>Salmonella</i> induzierten Filamente
SPI-1 u.2	<i>Salmonella pathogenic island 1 & 2</i>
Tab.	Tabelle

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TfnR	Transferin Rezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofolat
TLRs	Toll-like receptors
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T3SS	TypIII Sekretionssystem
U	Einheit (<i>unit</i>)
V-ATPase	Vakuoläre Protonenpumpe
vgl.	vergleiche
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

16. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Mittel angefertigt habe.

Hamburg,

Johannes Finke

17. verwendete Internetplattformen/adressen

<http://bionumbers.hms.harvard.edu/default.aspx>

<http://www.cfsph.iastate.edu/>

<http://www.copyright.com/>

<http://www.ecogene.org>

http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?org_name=br08901&query=&htext=br08901.keg&filedir=&highlight=00010&option=&extend=B2&uploadfile=&format=&wrap=&length=&open=B6&close=&hier=#B6

http://molbiol.ru/ger/scripts/01_04.html

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

<https://www.plagscan.com/>

<http://www.R-project.org>

18. Analyse auf Plagiarismus

Das Ergebnis der Plagiarismus Analyse wurde bei Prof. Dr. Wieler und Dr. Tedin als markiertes Word-Dokument und im pdf-Format hinterlegt.

Ergebnisse der Plagiarismus Analyse mittels <https://www.plagscan.com/> vom 2013-03-02, 17:06:45 Uhr

208 Treffer von 59 Quellen, von denen 59 Onlinequellen sind. *PlagLevel*: 1,7 %

343 Dokumente wurden wegen Ähnlichkeiten geprüft, scheinen aber ausreichend unterschiedlich zu sein.

19. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

